

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 798**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12N 15/56** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/FR2014/052984**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075391**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14821723 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 3071692**

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

30 Prioridad:

**22.11.2013 FR 1361509**

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

**21.09.2018**

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;**

**BENOIT, YVES;**

**PERSILLON, CÉCILE;**

**AYRINHAC, CÉLINE;**

**ULLMANN, CHRISTOPHE;**

**BONZOM, OLIVIER;**

**FORT, SÉBASTIEN;**

**ARMAND, SYLVIE;**

**PETIT, MAUD y**

**LENON, MARINE**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 682 798 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  $\beta$ -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, WO2012036810 y WO201010076388 con respecto a las endoglucanasas, las solicitudes WO2010029259, WO2010135836, WO2012044915, WO2011057140 o WO2010022518 con respecto a las  $\beta$ -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.

La solicitud WO2013028701 también describe variantes de glicósido hidrolasa GHG61.

La solicitud WO2008141131 describe proteínas que tienen una actividad celulolítica mejorada.

Gunseli Bayram Akcapinar *et al.* describen la producción de endonucleasa I de *Trichoderma reesei* en *Journal of Biotechnology*, vol. 159, n.º 1-2, mayo de 2012, páginas 61-68.

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 enzimas que tienen actividades enzimáticas diversas, entre otras, pero no exclusivamente, de tipo exoglucanasas, endoglucanasas, xilanasas y  $\beta$ -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  $\beta$ -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 (Szijjártó, 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. Sin embargo, producir grandes cantidades de enzimas con los organismos fermentativos y de este modo obtener una actividad importante puede resultar problemático y limita la viabilidad de estos enfoques.

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 EG1 de la secuencia SEQ ID NO: 2. EG1 corresponde a la endoglucanasa 1 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 de referencia EG1 (SEQ ID NO: 2).

La descripción se refiere por tanto a un polipéptido seleccionado 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 y SEQ ID NO: 26;
- 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 o SEQ ID NO: 26.

La invención se define en las reivindicaciones.

Preferentemente, el polipéptido según la invención se caracteriza por que su expresión en un organismo

fermentativo es al menos igual a la expresión de la proteína de referencia EG1 (SEQ ID NO: 2).

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

10 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.

15 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 EG1 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

20 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 de referencia EG1 (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;
- 25 - 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
- 30 (DO<sub>600</sub> 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;
- 35 - 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;
- 40 - 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.

45 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 EG1 de *T. reesei* ("salvaje"), las endoglucanasas putativas de *Chaetomium globosum* (C) y *Aspergillus fumigatus* (A), así como para los polipéptidos y nucleótidos de la invención y la descripción.

50 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 y SEQ ID NO: 25.

**TABLA 1**

Clones	Ácido nucleico	Polipéptido
EG1 (salvaje)	SEQ ID NO :1	SEQ ID NO :2
76B4	SEQ ID NO :3	SEQ ID NO :4
105F11	SEQ ID NO :5	SEQ ID NO :6
107H12	SEQ ID NO :7	SEQ ID NO :8
154E4	SEQ ID NO :9	SEQ ID NO :10
202C12	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO :12
272A9	SEQ ID NO :13	SEQ ID NO :14

Clones	Ácido nucleico	Polipéptido
278F10	SEQ ID NO :15	SEQ ID NO :16
293B2	SEQ ID NO :17	SEQ ID NO :18
309A11	SEQ ID NO :19	SEQ ID NO :20
11G8	SEQ ID NO :21	SEQ ID NO :22
92A12	SEQ ID NO :23	SEQ ID NO :24
240H12	SEQ ID NO :25	SEQ ID NO :26
Gen C	SEQ ID NO :27	SEQ ID NO :28
Gen A	SEQ ID NO :29	SEQ ID NO :30

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*, *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *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.

50 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 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.

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.

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.

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,  $\beta$ -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. Esta solución 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 de referencia EG1. Por "hongos filamentosos" se entiende especialmente *Trichoderma*, más preferentemente *T. reesei*.

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.

Después de la etapa de fermentación, 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:

- 5 - 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, para producir un mosto de fermentación;  
 - separación del biocombustible del mosto de fermentación.
- 10 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.

20 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 filamentosos. Preferentemente, el organismo fermentativo es una célula huésped como se ha descrito anteriormente.

25 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 al emplear menos enzima que antes, lo que presenta una ventaja desde el punto de vista económico.

#### 40 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 CMC al 1 % por la endoglucanasa de referencia EG1 y su mutante (154E4) secretados en el medio de cultivo por las cepas Sc $\alpha$ -EG1 y Sc $\alpha$ -154E4, respectivamente.

50 La FIGURA 2 es un gráfico que representa los resultados de HFS para el cóctel resultante de la cepa 145E4/8 (SEQ ID NO: 10), un cóctel de referencia producido por la cepa CL847  $\Delta$ EG1 ( $\Delta$ EG1) suplementado con  $\beta$ -glucosidasa y otro cóctel de referencia producido por la cepa CL847  $\Delta$ EG1 retransformada con el gen de referencia EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1) suplementado con  $\beta$ -glucosidasa.

55 La FIGURA 3 es un gráfico que presenta los resultados de HFS para el cóctel resultante de la cepa 11G8 (SEQ ID NO: 22), un cóctel de referencia producido por la cepa CL847  $\Delta$ EG1 ( $\Delta$ EG1) suplementado con  $\beta$ -glucosidasa y otro cóctel de referencia producido por la cepa CL847  $\Delta$ EG1 retransformada con el gen de referencia EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1) suplementado con  $\beta$ -glucosidasa.

60 La FIGURA 4 es un gráfico que presenta los resultados de SFS para los dos cócteles resultantes de las cepas 154E4/2 154 E4/8 (SEQ ID NO: 10), un cóctel de referencia producido por la cepa CL847  $\Delta$ EG1 ( $\Delta$ EG1) suplementado con  $\beta$ -glucosidasa y otro cóctel de referencia producido por la cepa CL847  $\Delta$ EG1 retransformada con el gen de referencia EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1) suplementado con  $\beta$ -glucosidasa.

65 La FIGURA 5 es un gráfico que presenta los resultados de SFS para los tres cócteles resultantes de las cepas 11G8, 11G8/12 y 11G8/13 (SEQ ID NO: 22), un cóctel de referencia producido por la cepa CL847  $\Delta$ EG1 ( $\Delta$ EG1)

suplementado con  $\beta$ -glucosidasa y otro cóctel de referencia producido por la cepa CL847  $\Delta$ EG1 retransformada con el gen de referencia EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1) suplementado con  $\beta$ -glucosidasa.

## Descripción detallada de la invención

5

### Ejemplos

#### **EJEMPLO 1: 1<sup>er</sup> giro por transposición en L**

10 La secuencia del gen de referencia EG1 de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 1) se sometió a un primer giro de transposición en L de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento EP1104457B1 con los genes de endoglucanasa putativa de *Chaetomium globosum* (SEQ ID NO: 29) y la endoglucanasa de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 29) que presenta cada uno un 64 % de identidad con el gen de referencia SEQ ID NO: 1.

#### **1 - Identificación sistemática de alto rendimiento**

15

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 referencia SEQ ID NO: 2..

20

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 transposición en L de la enzima recombinante de acuerdo con la invención y precultivados en medio LB de dichas colonias durante la noche a 37 °C;
- 25 - 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  $\mu$ 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;
- 30 - adición de 80  $\mu$ l de tampón citrato fosfato 0,1 M pH 5 que contiene 1 % de carboximetilcelulosa;
- incubación durante 17 h a 35 °C;
- centrifugación durante 10 minutos a 3.000 rpm;
- eliminación de 100  $\mu$ l de sobrenadante;
- adición de 100  $\mu$ l de reactivo DNS;
- 35 - incubación durante 10 minutos a 100 °C y luego durante 5 minutos en hielo;
- lectura de la DO a 540 nm en 120  $\mu$ 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 EG1 (SEQ ID NO: 2) que incluyen principalmente los clones 76B4, 105F11, 107H12, 154E4, 202C12, 272A9, 278F10, 293B2 y 309A11..

40

#### **2 - Determinación de la mejora de la actividad endoglucanasa**

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

45

Para estimar el kcat de los clones de las variantes seleccionadas en el primer giro de transposición en L con respecto a la enzima de referencia (SEQ ID NO: 2), 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;
- 50 - 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 horas;
- centrifugación durante cinco minutos a 7.900 rpm;
- 55 - resuspensión de los residuos celulares con tampón citrato fosfato 0,1 M a pH 5 que contiene 1 mg/ml de lisozima (DO<sub>600</sub> 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;
- 60 - centrifugación durante 30 minutos a 13.000 rpm;
- incubación de 100  $\mu$ l de sobrenadante de rotura con 100  $\mu$ l de tampón fosfato citrato 0,1 M a pH 5 que contiene 1 % de CMC durante 6 horas a 35 y 50 °C;
- eliminación de 100  $\mu$ l de reacción;
- adición de 100  $\mu$ l de reactivo DNS;
- 65 - 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 acuerdo con la invención, el cálculo de kcat se realiza de la siguiente manera:

- 5
- expresión de las DO a 540 nm en función de la cantidad de proteína de interés (en nM);
  - resta del valor del control negativo;
  - división por el coeficiente del intervalo patrón de glucosa (se revelan diferentes cantidades de glucosa con el DNS);
- 10
- división por el tiempo de reacción (360 minutos).

La TABLA 2 presenta el valor de los kcat así como el factor de mejora obtenidos para los clones 76B4, 105F11, 107H12, 154E4, 202C12, 236C11, 272A9, 278F10, 293B2 y 309A11 con respecto a la proteína de referencia EG1 (SEQ ID NO: 2) en las condiciones experimentales del ensayo de actividad en CMC.

15

**TABLA 2: Actividad endoglucanasa en CMC**

	Clon	35°C		50°C	
		Kcat (min <sup>-1</sup> )	Factor de mejora	Kcat (min <sup>-1</sup> )	Factor de mejora
<b>Clones del primer giro</b>	<b>76B4</b>	0,25	1	0,35	1,1
	<b>105F11</b>	1,13	4,7	1,24	4
	<b>107H12</b>	1,06	4,4	1,14	3,7
	<b>154E4</b>	1,27	5,3	3,39	10,9
	<b>202C12</b>	0,73	3	0,61	2
	<b>236C11</b>	0,12	5,3	0,05	0,2
	<b>272A9</b>	0,99	4,1	2,33	7,5
	<b>278F10</b>	0,95	4	1,06	3,4
	<b>293B2</b>	1,04	4,3	1,78	5,7
	<b>309A11</b>	1,07	4,5	0,6	1,9
<b>Proteína de referencia</b>	<b>EG1</b>	0,24	1	0,31	1

Los resultados muestran mejoras en la actividad enzimática significativas en comparación con la enzima de referencia SEQ ID NO: 2.

20

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

La mejora de la actividad de los clones 76B4, 105F11, 107H12, 154E4, 202C12, 236C11, 272A9, 278F10, 293B2 y 309A11 se confirmó en un segundo sustrato: celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC).

25

La determinación del kcat en este sustrato se efectúa de acuerdo con el mismo protocolo que el que se ha descrito anteriormente. El sustrato CMC se reemplaza con el sustrato PASC con la misma concentración.

30

La TABLA 3 presenta el valor de los kcat así como el factor de mejora obtenidos para los clones 76B4, 105F11, 107H12, 154E4, 202C12, 236C11, 272A9, 278F10, 293B2 y 309A11 con respecto a la proteína de referencia EG1 (SEQ ID NO: 2) en las condiciones experimentales del ensayo de actividad en PASC.

TABLA 3: Actividad endoglucanasa en PASC

	Clon	35°C		50°C	
		Kcat (min <sup>-1</sup> )	Factor de mejora	Kcat (min <sup>-1</sup> )	Factor de mejora
Clones del primer giro	76B4	0,0116	1,66	0,0127	1,81
	105F11	0,0099	1,41	0,0109	1,56
	107H12	0,0069	0,99	0,0068	0,97
	154E4	0,0101	1,44	0,0104	1,49
	202C12	0,0098	1,4	0,0097	1,39
	236C11	0,0102	1,46	0,0103	1,47
	272A9	0,0103	1,47	0,0099	1,41
	278F10	0,0094	1,34	0,0091	1,3
	293B2	0,0089	1,27	0,0088	1,26
	309A11	0,0102	1,46	0,0089	1,27
Proteína de referencia	EG1	0,007	1	0,007	1

Estos resultados muestran mejoras en la actividad enzimática significativas con respecto a la enzima de referencia EG1 (SEQ ID NO: 2).

5

#### **EJEMPLO 2: 2º giro de transposición en L**

Los genes mejorados 105F11, 154E4, 202C12, 272A9 y 309A10 278F10 (SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15, 19, respectivamente) obtenidos en el primer giro de evolución han sido posteriormente sometidos a un segundo giro de transposición en L (siempre de acuerdo con el procedimiento patentado descrito en el documento EP1104457B1). Con el fin de promover la reconstrucción en un esqueleto de la secuencia de *Trichoderma*, el gen de referencia EG1 (SEQ ID NO: 1) se reintrodujo como un gen parental para el segundo giro de transposición en L.

10

#### **1-Identificación sistemática de alto rendimiento**

15

Se realizó un ensayo de identificación sistemática de alto rendimiento como se ha descrito anteriormente en los clones obtenidos después de este segundo giro de transposición en L para seleccionar los mejores. El ensayo de actividad se redujo a 2 horas (en comparación con 17 horas para la identificación sistemática de los clones resultantes del primer giro de evolución) para tener en cuenta las mejoras obtenidas con el primer giro de transposición en L.

20

La actividad de los clones generados se compara con la actividad obtenida con el clon 154E4. Este clon, resultante del primer giro de transposición en L, es el que permitió obtener la mejor mejora de la actividad.

25

En estas condiciones de identificación sistemática, se descubrió una mejora de la actividad de endoglucanasa con respecto al clon de referencia 154E4 (SEQ ID NO: 10) en varios clones, en particular, los clones 11G8 y 240H12.

#### **2-Determinación de la mejora de la actividad endoglucanasa**

30

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

Para determinar el kcat, las actividades de los clones 11G8, 92A12 y 240H12 se midieron mediante el ensayo de actividad como se ha descrito anteriormente. La duración del ensayo de actividad se redujo a una hora de incubación con el sustrato para tener en cuenta las mejoras en estos clones.

35

La TABLA 4 presenta los valores de kcat así como el factor de mejora obtenidos para los clones 11G8, 92A12 y 240H12 con respecto al clon (SEQ ID NO: 10) en las condiciones experimentales.

**TABLA 4: Actividad endoglucanasa en CMC**

	Clon	35°C		50°C	
		Kcat (min <sup>-1</sup> )	Factor de mejora	Kcat (min <sup>-1</sup> )	Factor de mejora
Clones del segundo giro	11G8	804,7	1,8	944,2	1,9
	92A12	420	0,94	478,5	0,95
	240H12	488,6	1,1	590,8	1,2
Proteína de referencia	154E4	446,4	1	501,3	1

Los resultados muestran una mejora de actividad con respecto al clon de referencia 154E4 para los clones 11G8 y 240H12.

5

### 2-2/ En el sustrato de celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC)

La mejora de la actividad de los clones 11G8, 92A12 y 240H12 se confirmó posteriormente en un segundo sustrato: celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC).

10

Para determinar el kcat, la actividad de estos clones se midió a 35 y 50 °C mediante el ensayo de actividad como ha se descrito previamente con PASC como sustrato.

La TABLA 5 muestra los valores de kcat así como también el factor de mejora obtenido para los clones 11G8, 92A12 y 240H12 con respecto al clon 154E4 (SEQ ID NO: 10) en estas condiciones experimentales.

15

**TABLA 5: Actividad endoglucanasa en PASC**

	Clon	35°C		50°C	
		Kcat (min <sup>-1</sup> )	Factor de mejora	Kcat (min <sup>-1</sup> )	Factor de mejora
Clones del segundo giro	11G8	1,37	0,8	1,72	1,1
	92A12	1,36	0,81	1,7	1,04
	240H12	1,87	1,1	1,9	1,2
Proteína de referencia	154E4	1,68	1	1,63	1

La actividad del clon 11G8 no se mejora a 35 °C en este sustrato con respecto al clon 154E4 de referencia.

Por el contrario, la actividad del clon 11G8 se mejora a 50 °C. La actividad del clon 240H12 se mejora a 35 °C y 50 °C.

20

### EJEMPLO 3: Clonación de una variante de la endoglucanasa 1 resultante del primer giro de transposición en L en una cepa de *T. reesei* CL847 ΔEG1

25

La construcción del fragmento de ADN que se va a insertar en *T. reesei*, que contiene el clon 154E4 resultante del primer giro de transposición en L, se llevó a cabo mediante fusión por PCR. El fragmento de una longitud de aproximadamente 5,4 kb estaba constituido del gen de resistencia a la fleomicina de la secuencia codificante del clon 154E4 bajo el control del promotor y seguido por el terminador *cbh1*. Asimismo, el gen de referencia EG1 (SEQ ID NO: 1) de *T. reesei* se amplificó y fusionó entre el promotor y el terminador *cbh1*, dando como resultado una segunda construcción.

30

Los protoplastos de una cepa de *T. reesei* CL87 ΔEG1 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, a saber el fragmento de ADN que contiene o bien el gen 154E4 o bien EG1. Los transformantes se seleccionaron en medio selectivo PDA/sacarosa que contenía 30 µg/l de fleomicina. Se subcultivaron catorce clones de cada transformación. Después de tres subcultivos para aislar clones puros, se obtuvieron finalmente siete clones que tienen integrado el gen nativo y cinco clones que tienen integrado la variante 154E4 y que secretan un nivel de proteínas comparable a la cepa CL847.

### 1-Identificación sistemática de un ensayo de actividad en carboximetilcelulosa (CMC)

Los 11 clones se cultivaron en placas de 24 pocillos que contienen el siguiente medio:

800 µl de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 %, 4,2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,3 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,5 g de maíz macerado, 1 ml de Oligo Ferment, 11,6 g de ácido maleico, 10 g de SolkaFloc y 20 g de lactosa por litro de medio. El pH se ajustó a 5,8-6,0. Después de 5 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 CMC. 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 6 resume las actividades obtenidas con los clones que contienen la variante 154E4, en comparación con la cepa de referencia CL847, la cepa CL87 ΔEG1, y la cepa CL87 ΔEG1 retransformada con el gen de referencia EG1 (ΔEG1cEG1, media obtenida con los cuatro mejores transformantes).

**TABLA 6: Actividad endoglucanasa en CMC**

Clon	Actividad específica a 50 °C (µmol/mg/min)	Relación 154E4/AEG2cEG1 (50 °C)	Actividad específica a 35 °C (µmol/mg/min)	Relación 154E4/ΔEG2cEG1 (35 °C)
CL847	12,9 ± 3,1		9,7 ± 0,4	
ΔEG1	6,4 ± 0,4		-	
ΔEG1cEG1	16,8 ± 2,5		12,1 ± 1,0	
154E4/2	22,5 ± 2,9	1,3	12,7 ± 2,0	1,1
154E4/8	24,1 ± 1,9	1,4	12,5 ± 2,0	1,0
154E4/9	20,2 ± 3,9	1,2	7,4 ± 2,2	0,6

Los resultados muestran que las actividades de las variantes 154E4 son entre 1,2 y 1,4 veces superiores a la de los clones retransformados con el gen de referencia EG1 (SEQ ID NO: 1). La mejora es visible a 35 °C y 50 °C.

### 2-Clonación de la variante 11G8 obtenida después del segundo giro de transposición en L en una cepa de *T. reesei* CL847 ΔEG1 e identificación selectiva de los transformantes:

La variante 11G8 se clonó 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 BamH1/XhoI. Se utilizaron 5 µg de este vector para la transformación de la cepa de *T. reesei* CL847 ΔEG1. La transformación de los protoplastos se llevó a cabo en las mismas condiciones que para la variante 154E4. Al final del proceso de transformación y de tres subcultivos sucesivos realizados con el fin de obtener clones puros, se obtuvieron trece clones con una producción de proteínas similares a la cepa CL847 y se sometieron a identificación sistemática por medición de la actividad CMCasa. El ensayo de actividad es idéntico a la identificación sistemática de clones que contienen la variante 154E4 del primer giro de transposición en L. Seis clones que expresan la variante 11G8 muestran una actividad CMCasa mayor que la de la cepa ΔEG1cEG. Los dos mejores transformantes tienen una actividad aumentada en un 70 % con respecto a la cepa que expresa el gen de referencia EG1 (SEQ ID NO: 1).

La TABLA 7 resume las actividades obtenidas con los clones que contienen la variante 11G8, en comparación con la cepa de referencia CL847, la cepa CL847 ΔEG1, y la cepa CL847 ΔEG1 retransformada con el gen de referencia EG1 (ΔEG1cEG1, media obtenida con los cuatro mejores transformantes).

**TABLA 7: Actividad endoglucanasa en CMC**

Clon	Actividad específica a 50 °C (µmol/mg/min)	Relación 11G8/ΔEG1 cEG1 (50 °C)	Actividad específica a 35 °C (µmol/mg/min)	Relación 11G8/ΔEG1cEG1 (35 °C)
CL847	20,8 ± 0,8		11,8 ± 0,5	
ΔEG1	-		3,3 ± 1,1	

Clon	Actividad específica a 50 °C (µmol/mg/min)	Relación 11G8/ΔEG1 cEG1 (50 °C)	Actividad específica a 35 °C (µmol/mg/min)	Relación 11G8/ΔEG1cEG1 (35 °C)
<b>ΔEG1CEG 1</b>	13,2 ± 2,2		9,1 ± 0,7	
<b>11G8/6</b>	15,6 ± 1,8	1,2	10,0 ± 0,4	1,1
<b>11G8/7</b>	17,3 ± 0,7	1,3	10,8 ± 0,9	1,2
<b>11G8/9</b>	17,9 ± 0,4	1,4	11,9 ± 0,2	1,3
<b>11G8/10</b>	15,0 ± 0,3	1,1	13,9 ± 1,6	1,5
<b>11G8/12</b>	17,0 ± 0,1	1,3	15,7 ± 0,8	1,7
<b>11G8/13</b>	17,3 ± 1,2	1,3	15,6 ± 0,4	1,7

Los resultados muestran que las actividades de las variantes 11G8 son entre 1,1 y 1,7 veces superiores a la de los clones retransformados con el gen de referencia SEQ ID NO: 1. La mejora es visible a 35 °C y 50 °C.

#### 5 **Ejemplo 4: Expresión recombinante de endoglucanasa de referencia EG1 y de la variante mejorada 154E4 en *Saccharomyces cerevisiae***

##### **1- Producción de proteínas EG1 de referencia y 154E4 en el medio extracelular**

10 Los genes de endoglucanasa de *Trichoderma reesei* (EG1) y de la variante 154E4 se clonaron sin su péptido señal en el vector pESC-LeuαAmyc (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  
15 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 %.

20 Se utilizó un transformante para cada gen (Scα-EG1,y Scα-154E4) 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,  
25 150 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, las cepas Scα-EG1 y Scα-154E4 se utilizaron para sembrar (DO<sub>600</sub> 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.

30 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-lactosida**

35 La actividad endoglucanasa de los sobrenadantes de cultivo se midió por hidrólisis del sustrato p-nitrofenil-β-lactosida (pNPL) en un volumen de 700 µl en las siguientes condiciones:

- 50 mM de tampón de citrato a pH 5
- 2 mM de pNPL
- 40 - 605 µl y 90 µl del sobrenadante de cultivo de las cepas Scα-154E4
- incubación a 35 °C o 50 °C durante 30 min para la cepa Scα-EG1.

La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de carbonato de sodio 1 M a 100 µl de reacción de reacción. La concentración de para-nitrofenol (pNP) liberada por hidrólisis de pNPL 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).

45 La TABLA 8 presenta los resultados de la actividad endoglucanasa (AE en nmol.min<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup> de cultivo) en pNPL a 35 °C y 50 °C de los medios de cultivo de las cepas ScαEG1 y Scα154E4.

50

**TABLA 8: Actividad endoglucanasa en pNPL a 35 °C y 50 °C de los medios de cultivo de las cepas ScαEG1 y Scα154E4.**

	AE a 35 °C	AE a 50 °C	Ratio de actividad 35 °C/50 °C	Mejora de AE a 35 °C
<b>Scα-EG1</b>	1,17	1,18	1	-
<b>Scα-154E4</b>	45,0	61,1	1,4	38,5

5 Los resultados obtenidos muestran una mejora a 35 °C de la actividad enzimática de la cepa Scα-154E4 por un factor cercano a 40 con respecto a la cepa que expresa la proteína de referencia EG1 de *T. reesei* (SEQ ID NO: 2). La amplitud de la mejora de la actividad constatada sobre *E. coli* y *T. reesei* sugiere que la enzima no solo tiene una actividad específica mejorada sino que también se sobreexpresa y/o se secreta mejor.

### 10 **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:

- 15 - 50 mM de tampón citrato a pH 5  
 - 1 % de CMC  
 - 210 µl de sobrenadante de cultivo de cepas Scα-EG1 y Scα-154E4 dializadas respectivamente contra el tampón citrato 50 mM pH 5 en membrana de 10 kDa y concentrados dos veces  
 - incubación a 35 °C durante 48 horas.

20 La reacción se detuvo mediante la adición de 150 µl de reactivo DNS a 100 µl de medio de reacción. 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.

25 La FIGURA 1 muestra los resultados de la hidrólisis del CMC al 1 % por la endoglucanasa de referencia EG1 (SEQ ID NO: 2) y su mutante 154E4 (SEQ ID NO: 10) secretadas respectivamente en el medio de cultivo de las cepas Scα-EG1 y Scα-154E4.

30 Los resultados de la FIGURA 1 muestran que durante las primeras horas de reacción, la cantidad de azúcares reductores liberados por 1 ml de cultivo de la cepa Scα-154E4 es aproximadamente 10 veces mayor que con 1 ml de Scα-EG1. La magnitud de la mejora de la actividad constatada sobre *E. coli* y *T. reesei* sugiere que la enzima no solo tiene una actividad específica mejorada sino que también se sobreexpresa y/o secreta mejor.

### 35 **Ejemplo 5: Producción de enzimas por *T. reesei* en matraces alimentados**

35 Las cepas de referencia y las que presentan la mejor actividad en CMC (CL847, AEG1, ΔEG1cEG1, 154E4/2, 154E4/8, 11G8/10, 11G8/12, 11G8/13) 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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 300 mg/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 150 mg/l de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,5 g/l de maceración del maíz, 0,07 % de ácido ortofosfórico, 5 mg/l de FeSO<sub>4</sub>, 1,4 mg/l de MnSO<sub>4</sub>, 1,4 mg/l de ZnSO<sub>4</sub>, 3,7 mg/l de CoCl<sub>2</sub> 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 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 NH<sub>3</sub> 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.

45 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).

### 50 **Ejemplo 6: Eficacia de las enzimas resultantes de la transposición en L en la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica de acuerdo con un procedimiento HFS**

55 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 10 horas, que se ha lavado, neutralizado a pH 5, prensado, secado. La tabla 9 presenta la composición del sustrato de referencia.

**Tabla 9: Composición de la paja utilizada para los ensayos 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 (sobrestimada)	36,49
Acetil	0,6

5 Las hidrólisis se llevaron a cabo al 10 % de materia seca m/m, o en un equivalente al 5,4 % de celulosa m/m. 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  $\beta$ -glucosidasa con un máximo de  $120 \pm 2$  IU/g de celulosa, añadiendo  $\beta$ -glucosidasa SP188 (Novozymes).

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

- $0,11 \pm 0,001$  g de sustrato de paja lavada
- $0,9 \pm 0,02$  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  $0,2 \pm 0,02$  g de cóctel enzimático en función de su tasa de proteínas.

20 Las hidrólisis enzimáticas se llevan a cabo a  $45 \pm 2$  °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.

25 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.

30 Los cócteles resultantes del ejemplo 5 fueron evaluados. Se llevan a cabo dos ensayos de control con cócteles de referencia también suplementados con  $\beta$ -glucosidasa para comparación: un cóctel producido por la cepa CL847 AEG1 ( $\Delta$ EG1) y un cóctel producido por la cepa CL847  $\Delta$ EG1 retransformada con el gen de referencia EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1).

35 La FIGURA 1 presenta los resultados de HFS para el cóctel resultante de la cepa 154/8 que expresa la variante 154E4 (SEQ ID NO: 10).

40 Los resultados presentados en la FIGURA 2 muestran que la velocidad inicial de hidrólisis del cóctel producido por la variante 146C4 es superior a la de los cócteles de referencia  $\Delta$ EG1 y AEG1cEG1. El rendimiento final de la hidrólisis también es superior al de los cócteles de referencia  $\Delta$ EG1 y AEG1cEG1.

45 La FIGURA 3 presenta los resultados de HFS para el cóctel resultante de la cepa 11G8 que expresa la variante 11G8 (SEQ ID NO: 22).

Los resultados presentados en la FIGURA 3 muestran que las velocidades iniciales de hidrólisis de los cócteles producidos por la variante 11G8 es superior a la de los cócteles de referencia  $\Delta$ EG1 y AEG1cEG1. El rendimiento final de hidrólisis también es superior al de los cócteles de referencia  $\Delta$ EG1 y AEG1cEG1.

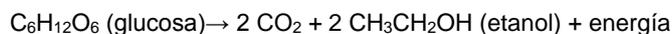
50 **Ejemplo 7: Eficacia de las enzimas en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica de acuerdo con un procedimiento SFS**

El sustrato utilizado es el mismo que el descrito en la tabla 9 (Ejemplo 6).

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);
- 5 - 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.

10 El principio de implementación de los biorreactores es el siguiente: el CO<sub>2</sub> 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<sub>G</sub>). Cuando P<sub>G</sub> es superior a la presión de apertura de la válvula unidireccional (P<sub>S</sub>), ésta se abre para liberar una cantidad de gas que por ejemplo se determina mediante pesaje. Cuando P<sub>G</sub> < P<sub>S</sub>, la válvula se cierra hasta que P<sub>G</sub> sea superior a P<sub>S</sub>. 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 CO<sub>2</sub> 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;
- 25 - cloranfenicol a 0,1 g/l;
- medio nutritivo con 3 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 g/l de MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O y 1 g/l de extracto de levadura.

30 Las SFS se prepararon con 10 ± 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 ± 0,003 g. La tasa de proteínas se fija en 10 ± 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).

35 La levadura de fermentación de azúcares (*Saccharomyces cerevisiae*, cepa de etanol rojo, Fermentis, Francia) se añade al medio para obtener un contenido de 2 ± 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.

40 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.

45 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.

50 Se evaluaron los cócteles del ejemplo 5. 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 un cóctel producido por la cepa CL847 AEG1 retransformada con el gen de referencia EG1 (ΔEG1cEG1).

La FIGURA 4 presenta los resultados de SFS para los 2 cócteles resultantes que expresan la endoglucanasa 154E4 (media de los resultados obtenidos con las 2 variantes).

55 Los resultados presentados en la FIGURA 4 muestran que el progreso (producción de etanol para la misma dosis de enzimas) de SFS en 100 horas para los 2 cócteles que expresan endoglucanasa 154E4 es superior a los de los cócteles de referencia ΔEG1 y ΔEG1cEG1.

60 La FIGURA 5 presenta los resultados de SFS para los 3 cócteles que expresan la endoglucanasa 11G8 (media de los resultados obtenidos con las 2 variantes).

Los resultados presentados en la FIGURA 5 muestran que el progreso de SFS en 100 horas para los 3 cócteles que expresan la endoglucanasa 11G8 (media) es superior a los de los cócteles de referencia ΔEG1 y ΔEG1cEG1.

65 LISTADO DE SECUENCIAS

ES 2 682 798 T3

<110> IFPEN

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

5 <130> BFF

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 1380

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

15 <400> 1

```

atggcgccct cagttacact gccgttgacc acggccatcc tggccattgc cgggctcgtc      60
gccgcccagc aaccgggtac cagcaccccc gaggtccatc ccaagttgac aacctacaag      120
tgtacaaagt ccgggggggtg cgtggcccag gacacctcgg tggtccttga ctggaactac      180
cgctggatgc acgacgcaaa ctacaactcg tgcaaccgtca acggcggcgt caacaccacg      240
ctctgccctg acgaggcgac ctgtggcaag aactgcttca tcgagggcgt cgactacgcc      300
gcctcggggc tcacgacctc gggcagcagc ctcaccatga accagtacat gccagcagc      360
tctggcggct acagcagcgt ctctcctcgg ctgtatctcc tggactctga cggtgagtac      420
gtgatgctga agctcaacgg ccaggagctg agcttcgacg tcgacctctc tgctctgccg      480
tgtggagaga acggctcgtc ctacctgtct cagatggacg agaacggggg cgccaaccag      540
tataaacagg ccggtgccaa ctacgggagc ggctactgcg atgctcagtg ccccgctccag      600
acatggagga acggcaccct caaactagc caccagggct tctgctgcaa cgagatggat      660
atcctggagg gcaactcgag ggcgaatgcc ttgaccctc actcttgcac ggccacggcc      720
tgcgactctg ccggttgccg cttcaacccc tatggcagcg gctacaaaag ctactacggc      780
cccggagata ccggtgacac ctccaagacc ttcaccatca tcaccagtt caacacggac      840
aacggctcgc cctcgggcaa ccttgtgagc atcaccgcga agtaccagca aaacggcgtc      900
gacatoccca gcgccagcc cggcggcgac accatctcgt cctgcccgtc cgcctcagcc      960
tacgggggcc tcgccaccat gggcaaggcc ctgagcagcg gcatggtgct cgtgttcagc     1020
atltggaacg acaacagcca gtacatgaac tggctcgaca gggcaacgc cggcccctgc     1080
agcagcaccg agggcaaccc atccaacatc ctggccaaca accccaacac gcacgtcgtc     1140
ttctccaaca tccgctgggg agacattggg tctactacga actcagactgc gccccgccc     1200
ccgcctgcgt ccagcacgac gttttcgact acacggagga gctcagcagc ttcgagcagc     1260
ccgagctgca cgcagactca ctgggggcag tgcgggtggca ttgggtacag cgggtgcaag     1320

acgtgcacgt cgggcactac gtgccagtat agcaacgact actactcgcg atgcctttaa     1380

```

20 <210> 2

<211> 459

ES 2 682 798 T3

<212> PRT  
 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 2

5

Met Ala Pro Ser Val Thr Leu Pro Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ile  
 1 5 10 15

Ala Arg Leu Val Ala Ala Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val  
 20 25 30

His Pro Lys Leu Thr Thr Tyr Lys Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val  
 35 40 45

Ala Gln Asp Thr Ser Val Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Met His  
 50 55 60

Asp Ala Asn Tyr Asn Ser Cys Thr Val Asn Gly Gly Val Asn Thr Thr  
 65 70 75 80

Leu Cys Pro Asp Glu Ala Thr Cys Gly Lys Asn Cys Phe Ile Glu Gly  
 85 90 95

Val Asp Tyr Ala Ala Ser Gly Val Thr Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr  
 100 105 110

Met Asn Gln Tyr Met Pro Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Val Ser  
 115 120 125

Pro Arg Leu Tyr Leu Leu Asp Ser Asp Gly Glu Tyr Val Met Leu Lys  
 130 135 140

Leu Asn Gly Gln Glu Leu Ser Phe Asp Val Asp Leu Ser Ala Leu Pro  
 145 150 155 160

Cys Gly Glu Asn Gly Ser Leu Tyr Leu Ser Gln Met Asp Glu Asn Gly  
 165 170 175

Gly Ala Asn Gln Tyr Asn Thr Ala Gly Ala Asn Tyr Gly Ser Gly Tyr  
 180 185 190

Cys Asp Ala Gln Cys Pro Val Gln Thr Trp Arg Asn Gly Thr Leu Asn  
 195 200 205

Thr Ser His Gln Gly Phe Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Gly

ES 2 682 798 T3

210						215										220
Asn	Ser	Arg	Ala	Asn	Ala	Leu	Thr	Pro	His	Ser	Cys	Thr	Ala	Thr	Ala	
225					230					235						240
Cys	Asp	Ser	Ala	Gly	Cys	Gly	Phe	Asn	Pro	Tyr	Gly	Ser	Gly	Tyr	Lys	
				245					250					255		
Ser	Tyr	Tyr	Gly	Pro	Gly	Asp	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Thr	Phe	Thr	
			260					265					270			
Ile	Ile	Thr	Gln	Phe	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Ser	Pro	Ser	Gly	Asn	Leu	
		275					280					285				
Val	Ser	Ile	Thr	Arg	Lys	Tyr	Gln	Gln	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	Pro	Ser	
	290					295					300					
Ala	Gln	Pro	Gly	Gly	Asp	Thr	Ile	Ser	Ser	Cys	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	
305					310					315					320	
Tyr	Gly	Gly	Leu	Ala	Thr	Met	Gly	Lys	Ala	Leu	Ser	Ser	Gly	Met	Val	
				325					330					335		
Leu	Val	Phe	Ser	Ile	Trp	Asn	Asp	Asn	Ser	Gln	Tyr	Met	Asn	Trp	Leu	
			340					345					350			
Asp	Ser	Gly	Asn	Ala	Gly	Pro	Cys	Ser	Ser	Thr	Glu	Gly	Asn	Pro	Ser	
		355					360					365				
Asn	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Pro	Asn	Thr	His	Val	Val	Phe	Ser	Asn	Ile	
	370					375					380					
Arg	Trp	Gly	Asp	Ile	Gly	Ser	Thr	Thr	Asn	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Pro	
385					390					395					400	
Pro	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Phe	Ser	Thr	Thr	Arg	Arg	Ser	Ser	Thr	
				405					410					415		
Thr	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Cys	Thr	Gln	Thr	His	Trp	Gly	Gln	Cys	Gly	
			420					425					430			
Gly	Ile	Gly	Tyr	Ser	Gly	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Cys	
		435					440					445				
Gln	Tyr	Ser	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu						
	450					455										

ES 2 682 798 T3

<210> 3  
 <211> 1329  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> 76B4

10

<400> 3

```

cagcaaccgg gttcgggtgac ccccgaggtc catcccaagt tgcccacctg gcagtgtaca      60
aagtccgggg ggtgcgtgga gcaggacacc tcggtggtoc ttgactggaa ctaccgctgg      120
ttccacacct cggacaacac cacctcgtgc accacgtcct cgggcatcga ctcgacgctc      180
tgccctgacg cagcgacctg tgccgagaac tgcgtcgtgg agggcaccga ctacaccagg      240
tcgggcatcg agacctcggg cagcagcctc accctgagge agttcgtcaa ggacagcgag      300
ggcaagacca acagcgtctc tctcggggcc tatctcctgg ggcgcgacgg tgactacgtg      360
atgttcaagc tcctcaacca ggagctgagc ttogacgtcg acgtctctac gctgocgtgt      420
ggagagaacg cagcgtctc cttctctgag atggacaaga cggggggccg gaacgagcac      480
aacacggggc gtgccaagta cgggagcggc tactgcgatg ctcagtgcc cgtccagaca      540
tggaacaacg gcaccctcaa cactagccac cagggctcgt gctgcaacga gatggatata      600
ctggaggcca actcgagggc gaattcgtac acccctcacc cctgcagtgc cacggactgc      660
gacaagggcg gttgcggctt caaccocctat gctctcggcc aaaaagcta ctggggcccc      720
ggaggcaccg ttgacaacct caagcccttc accatcacca cccagttcat cacgaacgac      780
ggcaccacca cgggcaacct ttccgaaatc cgcgccagat acatgcaaaa cggcaagggtg      840
atcgccaatg ccgtttcctc cactggcgtc aactccatca ccgaggactg gtgcacgtcc      900
gtogacggct cggccgccac ctttggcggc ctcaccacca tgggcaaggc cctgggcccgc      960
ggcatggtgc tcatcttcag catttggaac gacgccagcg gctttatgaa ctggctcgac     1020
agcggcaacg ccggccctcg cagcagcacc gagggcaaac cagacttgat caaggccag      1080
aaccocacga cgcacgtcgt cttctccaac atccgctggg gagacattgg gtctactttc     1140
aagggttctg atggctcggg gacgacgacg acgtogacta catcgaccaa gaccacgact     1200
tcgaccgcgc cggggccaac gcagactcac tatgggcagt gcggtggcca agggtggact     1260
gggcccacgg cttgcgcata gccctacag tgccaggttc tgaaccctg gtactcgcaa     1320
tgcccttaa
    
```

<210> 4  
 <211> 442  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> 76B4

20

<400> 4

ES 2 682 798 T3

Gln Gln Pro Gly Ser Val Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Pro Thr  
1 5 10 15

Trp Gln Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val Glu Gln Asp Thr Ser Val  
20 25 30

Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Phe His Thr Ser Asp Asn Thr Thr  
35 40 45

Ser Cys Thr Thr Ser Ser Gly Ile Asp Ser Thr Leu Cys Pro Asp Ala  
50 55 60

Ala Thr Cys Ala Glu Asn Cys Val Val Glu Gly Thr Asp Tyr Thr Ser  
65 70 75 80

Ser Gly Ile Glu Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr Leu Arg Gln Phe Val  
85 90 95

Lys Asp Ser Glu Gly Lys Thr Asn Ser Val Ser Pro Arg Ala Tyr Leu  
100 105 110

Leu Gly Ala Asp Gly Asp Tyr Val Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu  
115 120 125

Leu Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Thr Leu Pro Cys Gly Glu Asn Ala  
130 135 140

Ala Leu Tyr Phe Ser Glu Met Asp Lys Thr Gly Gly Arg Asn Glu His  
145 150 155 160

Asn Thr Gly Gly Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys  
165 170 175

Pro Val Gln Thr Trp Asn Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly  
180 185 190

Ser Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Ala Asn Ser Arg Ala Asn  
195 200 205

Ser Tyr Thr Pro His Pro Cys Ser Ala Thr Asp Cys Asp Lys Gly Gly  
210 215 220

Cys Gly Phe Asn Pro Tyr Ala Leu Gly Gln Lys Ser Tyr Trp Gly Pro  
225 230 235 240

ES 2 682 798 T3

Gly Gly Thr Val Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Ile Thr Thr Gln Phe  
 245 250 255

Ile Thr Asn Asp Gly Thr Thr Thr Gly Thr Leu Ser Glu Ile Arg Arg  
 260 265 270

Gln Tyr Met Gln Asn Gly Lys Val Ile Ala Asn Ala Val Ser Ser Thr  
 275 280 285

Gly Val Asn Ser Ile Thr Glu Asp Trp Cys Thr Ser Val Asp Gly Ser  
 290 295 300

Ala Ala Thr Phe Gly Gly Leu Thr Thr Met Gly Lys Ala Leu Gly Arg  
 305 310 315 320

Gly Met Val Leu Ile Phe Ser Ile Trp Asn Asp Ala Ser Gly Phe Met  
 325 330 335

Asn Trp Leu Asp Ser Gly Asn Ala Gly Pro Cys Ser Ser Thr Glu Gly  
 340 345 350

Asn Pro Asp Leu Ile Lys Ala Gln Asn Pro Thr Thr His Val Val Phe  
 355 360 365

Ser Asn Ile Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Phe Lys Gly Ser Asp  
 370 375 380

Gly Ser Val Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr Ser Thr Lys Thr Thr Thr  
 385 390 395 400

Ser Thr Ala Pro Gly Pro Thr Gln Thr His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly  
 405 410 415

Gln Gly Trp Thr Gly Pro Thr Ala Cys Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln  
 420 425 430

Val Leu Asn Pro Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
 435 440

<210> 5  
 <211> 1338  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> 105F11

10

<400> 5

ES 2 682 798 T3

cagcaaccgg gtaccagcac ccccgaggtc catoccaaagt tgacaaccta caagtgtaca 60

aagtccgggg ggtgctggc ccaggacacc tcggtggtcc ttgactggaa ctaccactgg 120

attcacacgg tcgatgggta cacatcgtgc accacatcgt ccggcgtoga cagcacgctc 180

tgcctgacg cggcgacctg tgccaagaac tgcgtgatog agccggccaa ctacaccagc 240

gccggcgta cgacctcggg cgacagcctc accatgtacc agtacgttca gagcaacggc 300

gtctacacca acgcctctcc tcggctgtat ctctcgggcc ccgacaagaa ctacgtgatg 360

ctgaagctcc taggccagga gctgacctc gacgtogacc tctctgctct gccgtgtgga 420

gagaacggct cgtctacot gtctcagatg gacgagaacg ggggcgcaa ccagtataac 480

acggccgggtg ccaactacgg gagcggctac tgcgatgctc agtgcccgt ccagacatgg 540

aggaacggca ccctcaacac tagccaccag ggctcgtgct gcaacgagat ggatatcctg 600

gaggccaact cgaagcggga agccttcacc cctcaccct gcacggcga caactgagc 660

aagggcggtt gcggcttcaa cccctatgct ctccggccaaa aaagctactg gggccccgga 720

ggcaccgttg acacctcaa gcccttcacc atcaccacc agttcatcac gaacgacggc 780

accaccaccg gcacctttc cgaatccgc cgcagtaca tgcaaacgg caaggtgatc 840

gcaatgccg tttctctcac tggcgtcaac tccatcacog aggactggtg cacgtccgtc 900

gacggctcgg ccgccaactt tggcggcctc accaccatgg gcaaggcct gggccgcggc 960

atggtgctcg tgttcagcat ttggaacgac aacagccagt acatgaactg gctcagacgc 1020

ggcaacgccg gccctgcag cagcaccgag ggcaacccat ccaacatcct ggccaacaac 1080

cccaacacgc acgtcgtctt ctccaacatc cgtcggggag acattgggtc tactacgaac 1140

tgactgagc ccccgcccc goctggtcc agcaacgagc ttctgactac acggaggagc 1200

tgacgactt cgagcagccc gagctgcag cagactcact gggggcagtg cgggtggcatt 1260

gggtacagcg ggtgcaagac gtgcacgtcg ggcaactcgt gccagtatag caacgactac 1320

tactcgaat gcctttaa 1338

<210> 6  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> 105F11

10

<400> 6

ES 2 682 798 T3

Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Thr Thr  
1                   5                   10                   15

Tyr Lys Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val Ala Gln Asp Thr Ser Val  
          20                   25                   30

ES 2 682 798 T3

Val Leu Asp Trp Asn Tyr His Trp Ile His Thr Val Asp Gly Tyr Thr  
35 40 45

Ser Cys Thr Thr Ser Ser Gly Val Asp Ser Thr Leu Cys Pro Asp Ala  
50 55 60

Ala Thr Cys Ala Lys Asn Cys Val Ile Glu Pro Ala Asn Tyr Thr Ser  
65 70 75 80

Ala Gly Val Thr Thr Ser Gly Asp Ser Leu Thr Met Tyr Gln Tyr Val  
85 90 95

Gln Ser Asn Gly Val Tyr Thr Asn Ala Ser Pro Arg Leu Tyr Leu Leu  
100 105 110

Gly Pro Asp Lys Asn Tyr Val Met Leu Lys Leu Leu Gly Gln Glu Leu  
115 120 125

Thr Phe Asp Val Asp Leu Ser Ala Leu Pro Cys Gly Glu Asn Gly Ser  
130 135 140

Leu Tyr Leu Ser Gln Met Asp Glu Asn Gly Gly Ala Asn Gln Tyr Asn  
145 150 155 160

Thr Ala Gly Ala Asn Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Pro  
165 170 175

Val Gln Thr Trp Arg Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly Ser  
180 185 190

Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Ala Asn Ser Lys Ala Glu Ala  
195 200 205

Phe Thr Pro His Pro Cys Ile Gly Asp Asn Cys Asp Lys Gly Gly Cys  
210 215 220

Gly Phe Asn Pro Tyr Ala Leu Gly Gln Lys Ser Tyr Trp Gly Pro Gly  
225 230 235 240

Gly Thr Val Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Ile Thr Thr Gln Phe Ile  
245 250 255

Thr Asn Asp Gly Thr Thr Thr Gly Thr Leu Ser Glu Ile Arg Arg Gln  
260 265 270

Tyr Met Gln Asn Gly Lys Val Ile Ala Asn Ala Val Ser Ser Thr Gly  
275 280 285

ES 2 682 798 T3

Val Asn Ser Ile Thr Glu Asp Trp Cys Thr Ser Val Asp Gly Ser Ala  
 290 295 300

Ala Thr Phe Gly Gly Leu Thr Thr Met Gly Lys Ala Leu Gly Arg Gly  
 305 310 315 320

Met Val Leu Val Phe Ser Ile Trp Asn Asp Asn Ser Gln Tyr Met Asn  
 325 330 335

Trp Leu Asp Ser Gly Asn Ala Gly Pro Cys Ser Ser Thr Glu Gly Asn  
 340 345 350

Pro Ser Asn Ile Leu Ala Asn Asn Pro Asn Thr His Val Val Phe Ser  
 355 360 365

Asn Ile Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro  
 370 375 380

Pro Pro Pro Pro Ala Ser Ser Thr Thr Phe Ser Thr Thr Arg Arg Ser  
 385 390 395 400

Ser Thr Thr Ser Ser Ser Pro Ser Cys Thr Gln Thr His Trp Gly Gln  
 405 410 415

Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Cys Lys Thr Cys Thr Ser Gly Thr  
 420 425 430

Thr Cys Gln Tyr Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 435 440 445

<210> 7  
 <211> 1131  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> 107H12

10 <400> 7

ES 2 682 798 T3

cagcaaccgg gttcggtgac ccccgaggtc catcccaagt tgacaaccta caagtgtaca 60  
 aagtcggggg ggtgcgtggc ccaggacacc tcggtggtcc ttgactgggg ctaccactgg 120  
 attcacacgg tcgatgggta cacatcgtgc accacatcgt ccggcgtoga cagcacgctc 180  
 tgccctgacg cggcgacctg tgcgaagaac tgcgtgatcg agccggccaa ctacaccagc 240  
 gccggcgtca cgacctggg cgacagcctc accctgaggc agttcgtcaa ggacagcgag 300  
 ggcaagacca acagcgtctc tcctcgggcc tatctcctgg gcgccgacgg tgactacgtg 360  
 atgttcaagc tcctcaacca ggagctgagc ttcgacgtcg acctctctac gctgccgtgt 420  
  
 ggagagaacg cagcgtctta cttctctgag atggacaaga ccggggggccg gaacgagcac 480  
 aacacggggc gtgccaagta cgggagcggc tactgcatg ctcagtgcc cgtccagaca 540  
 tggaaacaacg gcaccctcaa cactagccac cagggctcgt gctgcaacga gatggatc 600  
 ctggaggcca actcgaaggc ggaagcctc acccctcacc cctgcatcgg cgacaactgc 660  
 gacaagggcg gttgcggctt caactcgtat gcgcgcgga acaaaaacta ctgggcgcc 720  
 ggaggcaacc tcgacacctc caagccctc accatggtga ccagttcat cacggacgac 780  
 ggcaccagct cgggcaagct tagccagatc gtgcgtcct acgtgcaaaa cggccagaag 840  
 gtcgccagcg ccgtgtccgg cggcgacagc atcacctcgg agggctgctc gtcctccgac 900  
 gcctacggcg gcctcgtcgg tatggcgag gccctggcc gcggcatggt gtcgccatg 960  
 agcatttggg acgacgccag cggcttcatg aactggctcg acagcggcga caacggcccc 1020  
 tgcaacgaga ccgagggcga ccagccaac atcctggcca accacccoga ttcgaggtc 1080  
 gtcctgtoca acatccgctg gggagacatt gactctactg ttcagctota a 1131

<210> 8  
 <211> 376  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> 107H12

10

<400> 8

ES 2 682 798 T3

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

ES 2 682 798 T3

Leu Gly Ala Asp Gly Asp Tyr Val Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu  
 115 120 125  
 Leu Ser Phe Asp Val Asp Leu Ser Thr Leu Pro Cys Gly Glu Asn Ala  
 130 135 140  
 Ala Leu Tyr Phe Ser Glu Met Asp Lys Thr Gly Gly Arg Asn Glu His  
 145 150 155 160  
 Asn Thr Gly Gly Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys  
 165 170 175  
 Pro Val Gln Thr Trp Asn Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly  
 180 185 190  
 Ser Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Ala Asn Ser Lys Ala Glu  
 195 200 205  
 Ala Phe Thr Pro His Pro Cys Ile Gly Asp Asn Cys Asp Lys Gly Gly  
 210 215 220  
 Cys Gly Phe Asn Ser Tyr Ala Arg Gly Asn Lys Asn Tyr Trp Ala Pro  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Thr Leu Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Met Val Thr Gln Phe  
 245 250 255  
 Ile Thr Asp Asp Gly Thr Ser Ser Gly Lys Leu Ser Gln Ile Val Arg  
 260 265 270  
 Ser Tyr Val Gln Asn Gly Gln Lys Val Ala Ser Ala Val Ser Gly Gly  
 275 280 285  
 Asp Ser Ile Thr Val Glu Gly Cys Ser Ser Ser Asp Ala Tyr Gly Gly  
 290 295 300  
 Leu Val Gly Met Gly Glu Ala Leu Gly Arg Gly Met Val Leu Ala Met  
 305 310 315 320  
 Ser Ile Trp Asn Asp Ala Ser Gly Phe Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly  
 325 330 335  
 Asp Asn Gly Pro Cys Asn Glu Thr Glu Gly Asp Pro Ala Asn Ile Leu  
 340 345 350  
 Ala Asn His Pro Asp Ser Gln Val Val Leu Ser Asn Ile Arg Trp Gly  
 355 360 365  
 Asp Ile Asp Ser Thr Val Gln Leu  
 370 375

ES 2 682 798 T3

5 <210> 9  
 <211> 1320  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> 154E4

10 <400> 9

```

cagcaaccgg gtaccagcac ccccgaggtc catcccaagt tgacaaccta caagtgtaca      60
actgctgggg ggtgctgggc ccaggacacc togggtggcc ttgactgggg ctaccactgg      120
attcacacgg tcgatgggta cacatcgtgc accacatcgt cggcggtcga cagcacgctc      180
tgccctgacg cggcgacctg tgcaagaac tgogtgatog agccggccea ctacaccagc      240
gccggcgtca cgacctcggg cgacagcctc accatgtacc agtacgttca gagcaacggc      300
gtctacacca acgcctctcc tcgggcctat ctctcgggcg ccgacgggtga ctacgtgatg      360
ttcaagctcc tcaaccagga gctgagcttc gacgtcgacg tctctacgct gccgtgtgga      420
gagaacgcag cgctctactt ctctgagatg gacaagaccg ggggccgga cagacacaac      480
acgggocggtg ocaagtacgg gagcggctac tgogatgctc agtgccccgt ccagacatgg      540
aacaacggca ccctcaacac tagccaccag ggctcgtgct gcaacgagat ggatatcctg      600
gaggccaact cgaaggcggg agccttcacc cctcaccctc gcatcggcga caactgacgac      660
aagggcgggtt ggggcttcaa ctogtatgcg cgggcaaca aaaactactg ggcgcccgga      720
ggcaccctcg acacctcaa gcccttcacc atggtgacct agttcatcac ggaacgacggc      780
accagctcgg gcaagcttag ccagatcgtg cgctcctacg tgcaaacgg ccagaaggtc      840
gccagcgcgg tgtccggcgg cgacagcatc acogtcgagg gctgctcgtc ctccgacgcc      900
tacggcggcc tcgtcggtat gggcgaggcc ctgggcccgg gcatggtgct cgtgttcagc      960
atttgaacg acaacagcca gtacatgaac tggctcgaca gggcaacgc cggccctgc      1020
agcagcaccg agggcaacc atccaacatc ctggccaaca accccaacac gcacgtcgtc      1080
ttctccaaca tccgctgggg agacattggg tctactacga actcgactgc gcccccgcc      1140
ccgctcgtc ccagcacgac gttttcgact acacggagga gctcgacgac ttcgagcagc      1200
ccgagctgca cgcagactca ctgggggcag tgoggtggca ttgggtacag cgggtgcaag      1260
acgtgcacgt cgggcactac gtgccagtat agcaacgact actactcgca atgcctttaa      1320
  
```

15 <210> 10  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> 154E4

20 <400> 10

ES 2 682 798 T3

Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Thr Thr  
 1 5 10 15

Tyr Lys Cys Thr Thr Ala Gly Gly Cys Val Ala Gln Asp Thr Ser Val  
 20 25 30

Val Leu Asp Trp Gly Tyr His Trp Ile His Thr Val Asp Gly Tyr Thr  
 35 40 45

Ser Cys Thr Thr Ser Ser Gly Val Asp Ser Thr Leu Cys Pro Asp Ala  
 50 55 60

Ala Thr Cys Ala Lys Asn Cys Val Ile Glu Pro Ala Asn Tyr Thr Ser  
 65 70 75 80

Ala Gly Val Thr Thr Ser Gly Asp Ser Leu Thr Met Tyr Gln Tyr Val  
 85 90 95

Gln Ser Asn Gly Val Tyr Thr Asn Ala Ser Pro Arg Ala Tyr Leu Leu  
 100 105 110

Gly Ala Asp Gly Asp Tyr Val Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu Leu  
 115 120 125

Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Thr Leu Pro Cys Gly Glu Asn Ala Ala  
 130 135 140

Leu Tyr Phe Ser Glu Met Asp Lys Thr Gly Gly Arg Asn Glu His Asn  
 145 150 155 160

Thr Gly Gly Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Pro  
 165 170 175

Val Gln Thr Trp Asn Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly Ser  
 180 185 190

Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Ala Asn Ser Lys Ala Glu Ala  
 195 200 205

Phe Thr Pro His Pro Cys Ile Gly Asp Asn Cys Asp Lys Gly Gly Cys  
 210 215 220

ES 2 682 798 T3

Gly Phe Asn Ser Tyr Ala Arg Gly Asn Lys Asn Tyr Trp Ala Pro Gly  
 225 230 235 240

Gly Thr Leu Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Met Val Thr Gln Phe Ile  
 245 250 255

Thr Asp Asp Gly Thr Ser Ser Gly Lys Leu Ser Gln Ile Val Arg Ser  
 260 265 270

Tyr Val Gln Asn Gly Gln Lys Val Ala Ser Ala Val Ser Gly Gly Asp  
 275 280 285

Ser Ile Thr Val Glu Gly Cys Ser Ser Ser Asp Ala Tyr Gly Gly Leu  
 290 295 300

Val Gly Met Gly Glu Ala Leu Gly Arg Gly Met Val Leu Val Phe Ser  
 305 310 315 320

Ile Trp Asn Asp Asn Ser Gln Tyr Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly Asn  
 325 330 335

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

Asn Asn Pro Asn Thr His Val Val Phe Ser Asn Ile Arg Trp Gly Asp  
 355 360 365

Ile Gly Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ser  
 370 375 380

Ser Thr Thr Phe Ser Thr Thr Arg Arg Ser Ser Thr Thr Ser Ser Ser  
 385 390 395 400

Pro Ser Cys Thr Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr  
 405 410 415

Ser Gly Cys Lys Thr Cys Thr Ser Gly Thr Thr Cys Gln Tyr Ser Asn  
 420 425 430

Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 435

<210> 11  
 <211> 1320  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> 202C12

5

10

ES 2 682 798 T3

<400> 11

cagcaaccgg gtaccagcac ccccgaggtc catcccaagt tgacaaccta caagtgtaca 60  
aagtcogggg ggtgocgtggc ccaggacacc tcggtggtoc ttgactggaa ctaccgctgg 120  
atgcacgacg caaactacaa ctctgtgcacc gtcaacggcg gcgtcaacac cacgctctgc 180  
cctgacgagg cgacctgtgg caagaactgc ttcctcgagg gcgtcgacta cgccgcctcg 240  
ggcgtcacga cctcgggcag cagcctcacc ctgaggcagt tcgtcaagga cagcgagggc 300  
aagaccaaca gcgtctctcc togggcctat ctctcggggc cgcacggtga ctacgtgatg 360  
ttcaagctcc tcaaccagga gctgagcttc gacgtcgacg tctctacgct gcctgtgtga 420  
gagaacgcag cgctctactt ctctgagatg gacaagaccg ggggccggaa cgagcacaac 480  
acgggcggtg ccgagtacgg gagcggctac tgcgatgctc agtgccccgt ccagacatgg 540  
aacaacggca ccctcaacac tagccaccag ggctcgtgct gcaacgagat ggatatcctg 600  
gaggccaact cgaaggcgga agccttcacc cctcaccctt gcctcggcga caactgcgac 660  
aagggcgggt gcggcttcaa ctctgatgcg cgcggcaaca aaaactactg ggogcccgga 720  
ggcacctcgc acacctcaa gcccttcacc atggtgacct agttcatcac ggacgacggc 780  
accagctcgg gcaagcttag ccagatcgtg cgtcctacg tgcaaaacgg ccagaaggtc 840  
gccagcgccg tctccggcgg cgacagcctc accgtcgagg gctgctcgtc ctccgacgcc 900  
taogggggcc tcgtcggatg gggcgaggcc ctgggcccgc gcctgggtgt cgccatgagc 960  
atgtggaacg acgccagcgg cttcatgaac tggtctgaca gcggcgacaa cggcccctgc 1020  
aacgagaccg agggcaacc cccaacatc ctggccaaca accccaacac gcacgtcgtc 1080  
ttctccaaca tccgtgggg agacattggg tctactacga actcgactgc gccccgcc 1140  
cgcctcgtc ccagcagcag gttttcgact acacggagga gctcgacgac ttogagcagc 1200  
ccgagctgca cgcagactca ctgggggcag tgcggtggca ttgggtacag cgggtgcaag 1260  
acgtgcacgt cgggcactac gtgccagtat agcaacgact actactcgca atgcctttaa 1320

5 <210> 12  
<211> 439  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> 202C12

<400> 12

Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Thr Thr  
1 5 10 15

Tyr Lys Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val Ala Gln Asp Thr Ser Val  
20 25 30

15

ES 2 682 798 T3

Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Met His Asp Ala Asn Tyr Asn Ser  
35 40 45

Cys Thr Val Asn Gly Gly Val Asn Thr Thr Leu Cys Pro Asp Glu Ala  
50 55 60

Thr Cys Gly Lys Asn Cys Phe Ile Glu Gly Val Asp Tyr Ala Ala Ser  
65 70 75 80

Gly Val Thr Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr Leu Arg Gln Phe Val Lys  
85 90 95

Asp Ser Glu Gly Lys Thr Asn Ser Val Ser Pro Arg Ala Tyr Leu Leu  
100 105 110

Gly Ala Asp Gly Asp Tyr Val Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu Leu  
115 120 125

Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Thr Leu Pro Cys Gly Glu Asn Ala Ala  
130 135 140

Leu Tyr Phe Ser Glu Met Asp Lys Thr Gly Gly Arg Asn Glu His Asn  
145 150 155 160

Thr Gly Gly Ala Glu Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Pro  
165 170 175

Val Gln Thr Trp Asn Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly Ser  
180 185 190

Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Ala Asn Ser Lys Ala Glu Ala  
195 200 205

Phe Thr Pro His Pro Cys Ile Gly Asp Asn Cys Asp Lys Gly Gly Cys  
210 215 220

Gly Phe Asn Ser Tyr Ala Arg Gly Asn Lys Asn Tyr Trp Ala Pro Gly  
225 230 235 240

Gly Thr Leu Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Met Val Thr Gln Phe Ile  
245 250 255

Thr Asp Asp Gly Thr Ser Ser Gly Lys Leu Ser Gln Ile Val Arg Ser  
260 265 270

Tyr Val Gln Asn Gly Gln Lys Val Ala Ser Ala Val Ser Gly Gly Asp

ES 2 682 798 T3

	275		280		285														
Ser	Ile	Thr	Val	Glu	Gly	Cys	Ser	Ser	Ser	Asp	Ala	Tyr	Gly	Gly	Leu				
290						295					300								
Val	Gly	Met	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Gly	Met	Val	Leu	Ala	Met	Ser				
305					310					315					320				
Ile	Trp	Asn	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Met	Asn	Trp	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp				
				325					330					335					
Asn	Gly	Pro	Cys	Asn	Glu	Thr	Glu	Gly	Asn	Pro	Ser	Asn	Ile	Leu	Ala				
			340					345					350						
Asn	Asn	Pro	Asn	Thr	His	Val	Val	Phe	Ser	Asn	Ile	Arg	Trp	Gly	Asp				
		355					360					365							
Ile	Gly	Ser	Thr	Thr	Asn	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser				
	370					375						380							
Ser	Thr	Thr	Phe	Ser	Thr	Thr	Arg	Arg	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser				
385					390					395					400				
Pro	Ser	Cys	Thr	Gln	Thr	His	Trp	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Ile	Gly	Tyr				
				405					410					415					
Ser	Gly	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Cys	Gln	Tyr	Ser	Asn				
			420					425					430						
Asp	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu													
		435																	

<210> 13  
 <211> 1323  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> 272A9

10

<400> 13

ES 2 682 798 T3

```

cagcaaccgg gtaccagcac ccccgaggtc catcccaagt tgacaacota caagtgtaca      60
aagtcocgggg ggtgcgtggc ccaggacacc toggtggtcc ttgactggaa ctaccgctgg      120
atgcacgacg caaactacaa ctcgtgcacc gtcaacggcg gcgtcaacac cacgctctgc      180
cctgacgagg cgacctgtgc gaagaactgc gtgatcgagc cggccaacta caccagcgcc      240
ggcgtcacga cctcgggcca cagcctcacc atgtaccagt acgttcagag caacggcgtc      300
tacaccaacg cctctcctcg gctgtatctc ctgggccccg acaagaacta cgtgatgctg      360

aagtocttag gccaggagct gagcttcgac gtcgacctct ctgctctgcc gtgtggagag      420
aacggcgccc tctacctgtc tgaatgagc gccaccgggg gccgcaacga atataacacg      480
ggcgggtgcc agtacgggag cggctactgc gatgctcagt gcccgcgat cgctggaag      540
aacggcacc ctaacactag cggcgcaagc tactgctgca acgagatgga tatcctggag      600
gccaaactcga gggcgaattc gtacaccctc caccctcgtc gtgccacgga ctgcgacaag      660
ggcgggttgc gttcaacc ctatgctctc ggcaaaaaa gctactgggg ccccgagggc      720
accgttgaca cctccaagcc cttcaacctc accaccagt tcatcacgaa cgacggcaacc      780
accaccggca ccctttccga aatccgcgc cagtacatgc aaaacggcaa ggtgatcgcc      840
aatgcggtt cctccactgg cgtcaactcc atcaccgagg actggtgac gtccgtcgac      900
ggctcggccg ccaccttg cggcctcacc accatgggca aggcctggg ccgcggcatg      960
gtgctcatct tcagcatttg gaacgacgcc agcggcttta tgaactggct cgacagcggc     1020
aacgcggcc cctgcagcag caccgagggc aaccagact tgatcaaggc ccagaacccc     1080
acgacgcacg tcgtottctc caacatccgc tggggagaca ttgggtctac tttcaaggt     1140
tctgatggct cggtgacgac gacgacgtcg actacatcga ccaagaccac gacttcgacc     1200
gcgccggggc caacgcagac tcactatggg cagtgcggtg gccaaaggtg gactggccc     1260
acggcttgcg catcgcccta cacgtgccag gttctgaacc cgtggtactc gcaatgcct     1320
taa                                                                 1323

```

5 <210> 14  
 <211> 440  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> 272A9  
 <400> 14

ES 2 682 798 T3

Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Thr Thr  
1 5 10 15

Tyr Lys Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val Ala Gln Asp Thr Ser Val  
20 25 30

Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Met His Asp Ala Asn Tyr Asn Ser  
35 40 45

Cys Thr Val Asn Gly Gly Val Asn Thr Thr Leu Cys Pro Asp Ala Ala  
50 55 60

Thr Cys Ala Lys Asn Cys Val Ile Glu Pro Ala Asn Tyr Thr Ser Ala



ES 2 682 798 T3

Val Leu Ile Phe Ser Ile Trp Asn Asp Ala Ser Gly Phe Met Asn Trp  
 325 330 335

Leu Asp Ser Gly Asn Ala Gly Pro Cys Ser Ser Thr Glu Gly Asn Pro  
 340 345 350

Asp Leu Ile Lys Ala Gln Asn Pro Thr Thr His Val Val Phe Ser Asn  
 355 360 365

Ile Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Phe Lys Gly Ser Asp Gly Ser  
 370 375 380

Val Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr Ser Thr Lys Thr Thr Thr Ser Thr  
 385 390 395 400

Ala Pro Gly Pro Thr Gln Thr His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly  
 405 410 415

Trp Thr Gly Pro Thr Ala Cys Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Val Leu  
 420 425 430

Asn Pro Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
 435 440

5 <210> 15  
 <211> 1317  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> 278F10

<400> 15

ES 2 682 798 T3

cagcaaccgg gtaccagcac ccccgaggtc catcccaagt tgacaaccta caagtgtaca 60  
 aagtccgggg ggtgcggtga gcaggacacc tcggtggtcc ttgactggaa ctaccgctgg 120  
 ttccacacct cggacaacac cacctcgtgc accaogtcct cgggcatoga ctcgacgctc 180  
 tgccctgacg cagcgacctg tgccgagaac tgogtcgtgg agggcacoga ctacaccagc 240  
 tcgggcatcg agacctcggg cagcagcctc accctgaggc agttogtcaa ggacagcgag 300  
 ggcaagacca acagcgtctc tcctcggggc tatctcctgg gcgcogacgg tgactacgtg 360  
 atgttcaagc tcctcaacca ggagctgagc ttcgacgtcg acgtctctac gctgcggtgt 420  
 ggagagaacg cagcgtctca cttctctgag atggacaaga ccggggggccg gaacgagcac 480  
 aacacgggcy gtgccaagta cgggagcggc tactgcgatg ctcaagtgcc cgtccagaca 540  
 tggaacaacg gcacctcaa cactagccac cagggtcgtg gctgcaacga gatggatata 600  
 ctggaggcca actogaaggc ggaagccttc acccctcacc cctgcatcgg cgacaactgc 660  
 gacaagggcg gttgcggctt caactcgtat gcgcgcggca acaaaaacta ctgggcgccc 720  
 ggaggcacc ctcgacacct caagcccttc accatggtga cccagttcat cacggacgac 780  
 ggcaccagct cgggcaacct tgtgagcctc acccgcaagt accagcaaaa cggcgtcgac 840  
 atccccagcy cccagcccg cggcgacacc atctogtcct gccogtcogc ctcagcctac 900  
 ggcggcctcg ccaccatggg caaggccctg agcagcggca tgggtgctogt gttcagcatt 960  
 tggaacgaca acagccagta catgaactgg ctogacagcg gcaacgcog cccctgcagc 1020  
 agcaccgag gcaaccctc caacatcctg gccacaacc ccaacacgca cgtcgtcttc 1080  
 tccaacatcc gctggggaga cattgggtct actacgaact cgactgcgcc cccgccccg 1140  
 cctgcgtcca gcacgacgtt ttogactaca cggaggagct cgacgacttc gagcagcccc 1200  
 agctgcaogc agactcactg ggggcagtgc ggtggcattg ggtacagcgg gtgcaagacg 1260  
 tgcacgtcgg gcactacgtg ccagtatagc aacgactact actogcaatg cctttaa 1317

<210> 16  
 <211> 438  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> 278F10

10

<400> 16

ES 2 682 798 T3

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

ES 2 682 798 T3

Leu Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Thr Leu Pro Cys Gly Glu Asn Ala  
 130 135 140

Ala Leu Tyr Phe Ser Glu Met Asp Lys Thr Gly Gly Arg Asn Glu His  
 145 150 155 160

Asn Thr Gly Gly Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys  
 165 170 175

Pro Val Gln Thr Trp Asn Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly  
 180 185 190

Ser Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Ala Asn Ser Lys Ala Glu  
 195 200 205

Ala Phe Thr Pro His Pro Cys Ile Gly Asp Asn Cys Asp Lys Gly Gly  
 210 215 220

Cys Gly Phe Asn Ser Tyr Ala Arg Gly Asn Lys Asn Tyr Trp Ala Pro  
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Leu Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Met Val Thr Gln Phe  
 245 250 255

Ile Thr Asp Asp Gly Thr Ser Ser Gly Asn Leu Val Ser Ile Thr Arg  
 260 265 270

Lys Tyr Gln Gln Asn Gly Val Asp Ile Pro Ser Ala Gln Pro Gly Gly  
 275 280 285

Asp Thr Ile Ser Ser Cys Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Gly Gly Leu Ala  
 290 295 300

Thr Met Gly Lys Ala Leu Ser Ser Gly Met Val Leu Val Phe Ser Ile  
 305 310 315 320

Trp Asn Asp Asn Ser Gln Tyr Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly Asn Ala  
 325 330 335

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

Asn Pro Asn Thr His Val Val Phe Ser Asn Ile Arg Trp Gly Asp Ile  
 355 360 365

Gly Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Ser Ser

ES 2 682 798 T3

370 375 380

Thr Thr Phe Ser Thr Thr Arg Arg Ser Ser Thr Thr Ser Ser Ser Pro  
385 390 395 400

Ser Cys Thr Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser  
405 410 415

Gly Cys Lys Thr Cys Thr Ser Gly Thr Thr Cys Gln Tyr Ser Asn Asp  
420 425 430

Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
435

- <210> 17
- <211> 1323
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> 293B2
  
- 10 <400> 17

ES 2 682 798 T3

cagcaaccgg gttcgggtgac ccccgaggtc catcccaagt tgcccacctg gcagtggtaca 60  
 aagtccegggg ggtgcgtgga gcaggacacc tcggtggtcc ttgactggaa ctaccgctgg 120  
 ttccacacct cggacaacac cacctcgtgc accacgtcct cgggcatcga ctcgacgctc 180  
 tgccctgacg cagcgacctg tgccgagaac tgcgtcgtgg agggcaccga ctacaccagc 240  
 tcgggcatcg agacctcggg cagcagcctc acctgagggc agttcgtcaa ggacagcgag 300  
 ggcaagacca acagcgtctc tcctcggggc tatctcctgg gcgccgacgg tgactacgtg 360  
 atgttcaagc tcctcaacca ggagctgagc ttogacgtog acgtctctac gctgccgtgt 420  
 ggagagaacg cagcgtctta cttctctgag atggacaaga ccgggggccc gaacgagcac 480  
 aacacgggcg gtgccaaagta cgggagcggc tactgcgatg ctcagtgcc cgtccagaca 540  
 tggaacaacg gcaccctcaa cactagccac cagggtcgt gctgcaacga gatggatata 600  
 ctggaggcca actcgaaggc ggaagcctc acccctcaacc cctgcatcgg cgacaactgc 660  
 gacaagggcg gttgcggtt caactcgtat gcgcgcggca acaaaaacta ctgggcgccc 720  
 ggaggcacc tcgacacctc caagccttc accatggtga ccagttcat cacggacgac 780  
 ggcaccagct cgggcaagct tagccagatc gtgcgtcct acgtgcaaaa cggccagaag 840  
 gtcgccagcg ccgtgtccgg cggcgacagc atcaccgctg agggctgctc gtcctccgac 900  
 gcctacggcg gcctcgtcgg tatggggcag gccctggggc gcggcatggt gctcgtgttc 960  
 agcatttga acgacaacag ccagtacatg aactggctog acagcggcaa cgcggcccc 1020  
 tgcagcagca ccgagggcaa cccatccaac atcctggcca acaaccccaa cacgcacgtc 1080  
 gtcttctcca acatccgctg gggagacatt gggctacta cgaactcgac tgccgccccg 1140  
 cccccgctg cgtccagcac gacgttttcg actacacgga ggagctcgac gacttcgagc 1200  
 agcccagct gcacgcagac tcaactggggg cagtgcggtg gcattgggta cagcgggtgc 1260  
 aagacgtgca cgtcgggcac tacgtgccag tatagcaacg actactactc gcaatgcctt 1320  
 taa 1323

- <210> 18
- <211> 440
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> 293B2
  
- <400> 18

ES 2 682 798 T3

Gln Gln Pro Gly Ser Val Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Pro Thr  
 1 5 10 15

Trp Gln Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val Glu Gln Asp Thr Ser Val  
 20 25 30

Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Phe His Thr Ser Asp Asn Thr Thr  
 35 40 45

Ser Cys Thr Thr Ser Ser Gly Ile Asp Ser Thr Leu Cys Pro Asp Ala  
 50 55 60

Ala Thr Cys Ala Glu Asn Cys Val Val Glu Gly Thr Asp Tyr Thr Ser  
 65 70 75 80

Ser Gly Ile Glu Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr Leu Arg Gln Phe Val  
 85 90 95

Lys Asp Ser Glu Gly Lys Thr Asn Ser Val Ser Pro Arg Ala Tyr Leu  
 100 105 110

Leu Gly Ala Asp Gly Asp Tyr Val Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu  
 115 120 125

Leu Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Thr Leu Pro Cys Gly Glu Asn Ala  
 130 135 140

Ala Leu Tyr Phe Ser Glu Met Asp Lys Thr Gly Gly Arg Asn Glu His  
 145 150 155 160

Asn Thr Gly Gly Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys



ES 2 682 798 T3

Tyr Ser Gly Cys Lys Thr Cys Thr Ser Gly Thr Thr Cys Gln Tyr Ser  
 420 425 430

Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 435 440

5 <210> 19  
 <211> 1323  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> 309A11

<400> 19

cagcaaccgg gttcgggtgac ccccgaggtc catcccgaagt tgcccacctg gcagtgatca 60  
 aagtccgggg ggtgcgtgga gcaggacacc tcggtggtcc ttgactgga ctaccgctgg 120  
 ttccacacct cggacaacac cacctcgtgc accacgtcct cgggcatoga ctcgacgctc 180  
 tgccctgacg cagcgacctg tgccgagaac tgcgtcgtgg agggcaccga ctacaccagc 240  
 tcgggcatcg agacctcggg cagcagcctc accctgaggc agttcgtcaa ggacagcgag 300  
 ggcaagacca acagcgtctc tcctcggggc tatctcctgg gcgcgacgg tgactacgtg 360  
 atgttcaagc tcctcaacca ggagctgagc ttcgacgtcg acgtctctac gctgccgtgt 420  
 ggagagaacg cagcgtctc cttctctgag atggacaaga cggggggccg gaacgagcac 480  
 aacacggggc gtgccaagta cgggagcggc tactgcatg ctcagtgcc cgtccagaca 540  
 tgaacaacg gcacctcaa cactagccac cagggtcgt gctgcaacga gatggatctc 600  
 ctggaggcca actcgaaggc ggaagcctc acccctcacc cctgcatcgg cgacaactgc 660  
 gacaaggggc gttgcggctt caactcgtat gcgcgaggca acaaaaacta ctgggagccc 720  
 ggaggcacc tcgacacctc caagccctc accatggtga ccagttcat cacggacgac 780  
 ggcaccagct cgggcaagct tagccagatc gtgcgctcct acgtgcaaaa cggccagaag 840  
 gtcgccagcg ccgtgtccgg cggcgacagc atcaaccgtc agggctgctc gtccgcctca 900  
 gcctacggcg gcctcgccac catgggcaag gcctgagca gcggcatggt gctcgtgttc 960  
 agcatttggg acgacaacag ccagtacatg aactggctcg acagcggcaa cgccggcccc 1020  
 tgcagcagca ccgagggcaa cccatccaac atcctggcca acaaccccaa cacgcacgctc 1080  
 gtcttctcca acatccgctg gggagacatt gggctacta cgaactcgac tgcgcccccg 1140  
 cccccgctg cgtccagcac gacgttttcg actacacgga ggagctcgac gacttcgagc 1200  
 agcccagct gcacgcagac tcaactgggg cagtgcggtg gcattgggta cagcgggtgc 1260  
 aagacgtgca cgtcgggcac tacgtgccag tatagcaacg actactactc gcaatgcctt 1320  
 taa 1323

15 <210> 20

ES 2 682 798 T3

<211> 440  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> 309A1

<400> 20

Gln Gln Pro Gly Ser Val Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Pro Thr  
 1 5 10 15

Trp Gln Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val Glu Gln Asp Thr Ser Val  
 20 25 30

Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Phe His Thr Ser Asp Asn Thr Thr  
 35 40 45

Ser Cys Thr Thr Ser Ser Gly Ile Asp Ser Thr Leu Cys Pro Asp Ala  
 50 55 60

Ala Thr Cys Ala Glu Asn Cys Val Val Glu Gly Thr Asp Tyr Thr Ser  
 65 70 75 80

Ser Gly Ile Glu Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr Leu Arg Gln Phe Val  
 85 90 95

Lys Asp Ser Glu Gly Lys Thr Asn Ser Val Ser Pro Arg Ala Tyr Leu  
 100 105 110

Leu Gly Ala Asp Gly Asp Tyr Val Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu  
 115 120 125

Leu Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Thr Leu Pro Cys Gly Glu Asn Ala  
 130 135 140

Ala Leu Tyr Phe Ser Glu Met Asp Lys Thr Gly Gly Arg Asn Glu His  
 145 150 155 160

Asn Thr Gly Gly Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys  
 165 170 175

Pro Val Gln Thr Trp Asn Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly  
 180 185 190

Ser Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Ala Asn Ser Lys Ala Glu  
 195 200 205

10

ES 2 682 798 T3

Ala Phe Thr Pro His Pro Cys Ile Gly Asp Asn Cys Asp Lys Gly Gly  
 210 215 220

Cys Gly Phe Asn Ser Tyr Ala Arg Gly Asn Lys Asn Tyr Trp Ala Pro  
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Leu Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Met Val Thr Gln Phe  
 245 250 255

Ile Thr Asp Asp Gly Thr Ser Ser Gly Lys Leu Ser Gln Ile Val Arg  
 260 265 270

Ser Tyr Val Gln Asn Gly Gln Lys Val Ala Ser Ala Val Ser Gly Gly  
 275 280 285

Asp Ser Ile Thr Val Glu Gly Cys Ser Ser Ala Ser Ala Tyr Gly Gly  
 290 295 300

Leu Ala Thr Met Gly Lys Ala Leu Ser Ser Gly Met Val Leu Val Phe  
 305 310 315 320

Ser Ile Trp Asn Asp Asn Ser Gln Tyr Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly  
 325 330 335

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

Ala Asn Asn Pro Asn Thr His Val Val Phe Ser Asn Ile Arg Trp Gly  
 355 360 365

Asp Ile Gly Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro Pro Pro Pro Ala  
 370 375 380

Ser Ser Thr Thr Phe Ser Thr Thr Arg Arg Ser Ser Thr Thr Ser Ser  
 385 390 395 400

Ser Pro Ser Cys Thr Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly  
 405 410 415

Tyr Ser Gly Cys Lys Thr Cys Thr Ser Gly Thr Thr Cys Gln Tyr Ser  
 420 425 430

Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 435 440

<210> 21  
 <211> 1320  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

5

ES 2 682 798 T3

<223> 11G8

<400> 21

```

cagcaaccgg gtaccagcac ccccgaggtc catcccaagt tgacaaccta caagtgtaca      60
aagtcctgggg ggtgcgtggc ccaggacacc tcggtgggtc ttgactggaa ctaccgctgg      120
atgcacgacg caaactacaa ctctgtgcacc gtcaacggcg gcgtcaacac cacgctctgc      180
cctgacgagg cgacctgtgg caagaactgc ttcctcgagg gcgtcgacta cgcgcctcgc      240
ggcgtcacga cctcgggcag cagcctcacc ctgaggcagt tcgtcaagga cagcgagggc      300
aagaccaaca gcgtctctoc tcgggcctat ctctcgggcg ccgacggtga ctacgtgatg      360
ttcaagctcc tcaaccagga gctgagcttc gacgtcgacg tctctacgct gccgtgtgga      420
gagaacgcag cgctctactt ctctgagatg gacaagaccg ggggccgcaa cgaatataac      480
acgggcgggtg ccgagtacgg gagcggctac tgcgatgctc agtgccccgt ccagacatgg      540
aacaacggca ccctcaacac tagccaccag ggctcgtgct gcaacgagat ggatatcctg      600
gaggccaact cgaaggcggg agccttcacc cctcaccctc gcatcggcga caactgcgac      660
aagggcgggtt gcggcttcaa ctctgatgcg cgcggcaaca aaaactactg ggcgccgga      720
ggcaccctcg acacctcaa gcccttcacc atggtgacce agttcatcac ggacgacggc      780
accagctcgg gcaagcttag ccagatcgtg cgctcctacg tgcaaaacgg ccagaaggtc      840
gccagcgccg tgtccggcgg cgacagcatc accgtcgagg gctgctcgtc ctccgacgcc      900
tacggcggcc tcgtcgggat gggcgaggcc ctgggcgcgc gcatggtgct cgtgttcagc      960
atgtggaacg acaacagcca gtacatgaac tggctcgaca gcggcaacgc cggcccctgc     1020
agcagcaccg agggcaacc cccaacatc ctggccaaca accccaacac gcacgtcgtc     1080
ttctccaaca tccgctgggg agacattggg totactacga actcgactgc gccccgccc     1140
ccgcctgcgt ccagcacgac gttttcgact acacggagga gctcgacgac ttcgagcagc     1200
ccgagctgca cgcagactca ctgggggcag tgcgggtggca ttgggtacag cgggtgcaag     1260
acgtgcacgt cgggcactac gtgccagtat agcaacgact actactcgca atgcctttaa     1320

```

5

<210> 22

<211> 439

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 11G8

15

<400> 22

```

Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Thr Thr
 1           5           10           15

```

ES 2 682 798 T3

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



ES 2 682 798 T3

cagcaaccgg gtaccagcac ccccgaggtc catcccaagt tgacaaccta caagtgtaca 60  
aagtccgggg ggtgcggtggc ccaggacacc togggtggtec ttgactggaa ctaccgctgg 120  
atgcaogacg caaactacaa ctcgtgcacc gtcaacggcg gogtcaacac cacgctctgc 180  
cctgaogcgg ogacotgtgc gaagaactgc gtgatcgagc cggccaacta caccagcgcc 240  
ggcgtcacga cctcggggcga cagcctcacc atgtaccagt acgttcagag caacggcgtc 300  
tacaccaacg cctctcctcg ggcctatctc ctggggcgccg acggtgacta cgtgatgttc 360  
aagctcctca accaggagct gagcttcgac gtcgacgtct ctacgctgcc gtgtggagag 420  
aacgcagcgc totacttctc tgagatggac aagaccgggg gccggaacga gcacaacacg 480  
ggcggtgcca agtacgggag cggctactgc gatgctcagt gccocgtcca gacatggaac 540  
aacggcacc ccaactactag ccaccagggc togtgctgca acgagatgga tatcctggag 600  
gccaaactga aggcgggaagc cttcaccctt caccctgca tcggcgacaa ctgcgacaag 660  
ggcggttgcg gcttcaactc gtatgcgcgc ggcaacaaaa actactgggc gcccgaggc 720  
accctcgaca cctccaagcc cttcaccatg gtgaccagct tcatcacgga cgacggcacc 780  
agctcgggca agcttagcca gatcgtgcgc toctacgtgc aaaacggcca gaaggtcgcc 840  
agcgccgtgt ccggcgggga cagcatcacc gtcgagggct gctcgtctc cgacgcctac 900  
ggcggcctcg toggtatggg cgaggcctg ggccgcgga tgggtcctgt gttcagcatt 960  
tggaacgaca acagccagta catgaactgg ctgacagcg gcaacgcgg ccctgcagc 1020  
agcaccgag gcaaccatc caacatcctg gccaaacacc ccaacacgca cgtcgtcttc 1080  
tccaacatcc gctggggaga cattgggtct actacgaact cgactgcgcc cccgccccg 1140  
cctgogtcca gcaogacgtt ttogactaca cggaggagct cgacgacttc gagcagccc 1200  
agctgcacgc agactcactg ggggcagtgc ggtggcattg ggtacagcgg gtgcaagacg 1260  
tgcacgtcgg gcaactacgtg ccagtatagc aacgactact actcgcaatg cctttaa 1317

<210> 24  
<211> 438  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> 92A12

<400> 24

ES 2 682 798 T3

Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Thr Thr  
1 5 10 15

Tyr Lys Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val Ala Gln Asp Thr Ser Val  
20 25 30

Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Met His Asp Ala Asn Tyr Asn Ser  
35 40 45

Cys Thr Val Asn Gly Gly Val Asn Thr Thr Leu Cys Pro Asp Ala Ala  
50 55 60

ES 2 682 798 T3

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

ES 2 682 798 T3

Trp Asn Asp Asn Ser Gln Tyr Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly Asn Ala  
 325 330 335

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

Asn Pro Asn Thr His Val Val Phe Ser Asn Ile Arg Trp Gly Asp Ile  
 355 360 365

Gly Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ser Ser  
 370 375 380

Thr Thr Phe Ser Thr Thr Arg Arg Ser Ser Thr Thr Ser Ser Ser Pro  
 385 390 395 400

Ser Cys Thr Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser  
 405 410 415

Gly Cys Lys Thr Cys Thr Ser Gly Thr Thr Cys Gln Tyr Ser Asn Asp  
 420 425 430

Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 435

- <210> 25
- <211> 1320
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> 240H12
- 10 <400> 25

cagcaaccgg gtaccagcac ccccgaggtc catcccaagt tgacaaccta caagtgtaca 60

actgctgggg ggtgctggc ccaggacacc tgggtggtcc ttgactgggg ctaccactgg 120

attcacacgg tcgatgggta cacatcgtgc accacatogt ccggcgtcga cagcacgctc 180

tgcctgacg cggcgacctg tgcaagaac tgcgtgatcg agccggccaa ctacaccagc 240

gccggcgtca cgacctcggg cgacagcctc accatgtacc agtacgttca gagcaacggc 300

gtctacacca acgcctctcc tcgggcctat ctctggggcg ccgacgggtga ctacgtgatg 360

ttcaagctoc tcaaccagga gctgagctc gacgtcgacg tctctacgct gccgtgtgga 420

gagaacgcag cgctctaact ctctgagatg gacaagaccg ggggccggaa cgagcacaac 480

acgggcggtg ccaagtacgg gagcggctac tgcgatgctc agtgccccgt ccagacatgg 540

aacaacggca ccctcaacac tagccaccag ggctcgtgct gcaacgagat ggatatcctg 600

ES 2 682 798 T3

gaggccaact cgaaggcgga agccttcacc cctcacccct gcatcggcga caactgcgac 660  
aagggcggtt gcggcttcaa ctcgatgcg cgcggcaaca aaaactactg ggcgcccgga 720  
ggcacctcg acacctcaa gcccttcacc atggtgaccc agttcatcac ggacgacggc 780  
accagctcgg gcaagcttag ccagatcgtg cgctcctacg tgcaaacgg ccagaaggtc 840  
gccagcggc tgctccggcg cgacagcatc accgtcgagg gctgctcgtc cgcctcagcc 900  
tacggcggcc tcgccaccat gggcaaggcc ctgagcagcg gcatggtgct cgtgttcagc 960  
atttggaacg acaacagcca gtacatgaac tggctcgaca gcggcaacgc cggcccctgc 1020  
agcagcaccg agggcaaccc atccaacatc ctggccaaca accccaacac gcacgtcgtc 1080  
ttctccaaca tccgctgggg agacattggg tctactacga actcgactgc gccccgccc 1140  
ccgctcgtt ccagcagcag gtttctgact acacggagga gctcagcagc ttcgagcagc 1200  
ccgagctgca cgcagactca ctgggggcag tgcggtggca ttgggtacag cgggtgcaag 1260  
acgtgcacgt cgggcactac gtgccagtat agcaacgact actactcgca atgcctttaa 1320

<210> 26  
<211> 439  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> 240H12

<400> 26

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

ES 2 682 798 T3

Gly Ala Asp Gly Asp Tyr Val Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu Leu  
115 120 125

Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Thr Leu Pro Cys Gly Glu Asn Ala Ala  
130 135 140

Leu Tyr Phe Ser Glu Met Asp Lys Thr Gly Gly Arg Asn Glu His Asn  
145 150 155 160

Thr Gly Gly Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Pro  
165 170 175

Val Gln Thr Trp Asn Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly Ser  
180 185 190

Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Ala Asn Ser Lys Ala Glu Ala  
195 200 205

Phe Thr Pro His Pro Cys Ile Gly Asp Asn Cys Asp Lys Gly Gly Cys  
210 215 220

Gly Phe Asn Ser Tyr Ala Arg Gly Asn Lys Asn Tyr Trp Ala Pro Gly  
225 230 235 240

Gly Thr Leu Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Met Val Thr Gln Phe Ile  
245 250 255

Thr Asp Asp Gly Thr Ser Ser Gly Lys Leu Ser Gln Ile Val Arg Ser  
260 265 270

Tyr Val Gln Asn Gly Gln Lys Val Ala Ser Ala Val Ser Gly Gly Asp  
275 280 285

Ser Ile Thr Val Glu Gly Cys Ser Ser Ala Ser Ala Tyr Gly Gly Leu  
290 295 300

Ala Thr Met Gly Lys Ala Leu Ser Ser Gly Met Val Leu Val Phe Ser  
305 310 315 320

Ile Trp Asn Asp Asn Ser Gln Tyr Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly Asn  
325 330 335

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

Asn Asn Pro Asn Thr His Val Val Phe Ser Asn Ile Arg Trp Gly Asp  
355 360 365

ES 2 682 798 T3

Ile Gly Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Ser  
 370 375 380

Ser Thr Thr Phe Ser Thr Thr Arg Arg Ser Ser Thr Thr Ser Ser Ser  
 385 390 395 400

Pro Ser Cys Thr Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr  
 405 410 415

Ser Gly Cys Lys Thr Cys Thr Ser Gly Thr Thr Cys Gln Tyr Ser Asn  
 420 425 430

Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 435

<210> 27  
 <211> 1131  
 <212> ADN  
 <213> *Chaetomium globosum*

5

<400> 27

cagcaacogg gttcgggtgac ccccgaggtc catcccaagt tgcccacctg gcagtgtaca 60  
 aagtccgggg ggtgogtgga gcaggacacc tcggtggtcc ttgactggaa ctaccgctgg 120  
 ttccacacct cggacaacac cacctcgtgc accacgtcct cgggcatcga ctcgacgctc 180  
 tgccctgacg cagcgacctg tgccgagaac tgcgtcgtgg agggcaccga ctacaccagc 240  
 tcgggcatcg agacctcggg cagcagcctc accctgaggc agttcgtcaa ggacagcgag 300  
 ggcaagacca acagogtctc tcctcgggcc tatctcctgg gcgccgacgg tgactacgtg 360  
 atgttcaagc tcctcaacca ggagctgagc ttogacgtog acgtctctac gctgocgtgt 420  
 ggagagaacg cagcgctcta cttctctgag atggacaaga ccggggggccg gaacgagcac 480  
 aacacgggcg gtgccaaagta cgggagcggc tactgcgatg ctcagtgcc cgtccagaca 540  
 tggaacaacg gcaccctcaa cactagccac cagggctcgt gctgcaacga gatggatata 600  
 ctggaggcca actcgaaggc ggaagcctc acccctcacc cctgcatcgg cgacaactgc 660  
 gacaagggcg gttgoggtt caactcgtat gcgcgcggca acaaaaacta ctgggcgccc 720  
 ggaggcacc tcgacacctc caagccctc accatggtga ccagttcat caoggaogac 780  
 ggcaccagct cgggcaagct tagccagatc gtgcgctcct acgtgcaaaa cggccagaag 840  
 gtcgccagcg ccgtgtccgg cggcgacagc atcacogtcg agggctgctc gtccctccgac 900  
 gcctacggcg gcctcgtcgg tatgggagag gccctgggcc gcggcatggt gctcgccatg 960  
 agcatttga acgacgccag cggcttcatg aactggctcg acagcggcga caacggcccc 1020  
 tgcaacgaga ccgagggcga cccagccaac atcctggcca accaccccgga ttgcgaggtc 1080  
 gtccctgtcca acatccgctg gggagacatt gactctactg ttcagctcta a 1131

10

ES 2 682 798 T3

<210> 28  
 <211> 376  
 <212> PRT  
 5 <213> *Chaetomium globosum*

<400> 28

Gln Gln Pro Gly Ser Val Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Pro Thr  
 1 5 10 15

Trp Gln Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val Glu Gln Asp Thr Ser Val  
 20 25 30

Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Phe His Thr Ser Asp Asn Thr Thr  
 35 40 45

Ser Cys Thr Thr Ser Ser Gly Ile Asp Ser Thr Leu Cys Pro Asp Ala  
 50 55 60

Ala Thr Cys Ala Glu Asn Cys Val Val Glu Gly Thr Asp Tyr Thr Ser  
 65 70 75 80

Ser Gly Ile Glu Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr Leu Arg Gln Phe Val  
 85 90 95

Lys Asp Ser Glu Gly Lys Thr Asn Ser Val Ser Pro Arg Ala Tyr Leu  
 100 105 110

Leu Gly Ala Asp Gly Asp Tyr Val Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu  
 115 120 125

Leu Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Thr Leu Pro Cys Gly Glu Asn Ala  
 130 135 140

Ala Leu Tyr Phe Ser Glu Met Asp Lys Thr Gly Gly Arg Asn Glu His  
 145 150 155 160

Asn Thr Gly Gly Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys  
 165 170 175

Pro Val Gln Thr Trp Asn Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly  
 180 185 190

Ser Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Ala Asn Ser Lys Ala Glu  
 195 200 205

Ala Phe Thr Pro His Pro Cys Ile Gly Asp Asn Cys Asp Lys Gly Gly

ES 2 682 798 T3

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

<210> 29  
 <211> 1323  
 <212> ADN  
 <213> *Aspergillus fumigatus*

5

<400> 29

ES 2 682 798 T3

cagcaaccgg cgcgagttc tgctggtaac cccaagttga caacctaaa gtgtacaact	60
gctgggggggt gcgtaggcca ggacacctcg gtggtccttg actgggggcta ccaactggatt	120
cacacgggtag atgggtacac atcgtgcacc acatogtccg gcgtcgacag cacgctctgc	180
cctgacgcgg cgacctgtgc gaagaactgc gtgatogagc cggccaacta caccagcgcc	240
ggcgtcacga cctcgggga cagcctcacc atgtaccagt acgttcagag caacggcgtc	300
tacaccaacg cctctcctcg gctgtatctc ctgggccccg acaagaacta cgtgatgctg	360
aagctcctag gccaggagct gaccttcgac gtgcacctct ctacactgcc gtgtggagag	420
aacggcgcgc tctacctgtc tgaaatgagc gccaccgggg gccgcaacga atataacacg	480
ggcggtagccg agtacgggag cggctactgc gatgctcagt gccccgtcat cgcctggaag	540
aacggcaacc tcaactactag cggcgcaagc tactgctgca acgagatgga tctcctggag	600
gccaactcga gggcgaattc gtacaccct caccctgca gtgccacgga ctgacacaag	660
ggcggtagcg gcttcaacc ctatgctctc ggcaaaaaa gctactgggg ccccgaggc	720
accgtagaca cctccaagcc cttcaccatc accaccagt tcatcacgaa cgacggcacc	780
accaccggca cccttccga aatccggcgc cagtacatgc aaaacggcaa ggtgatcgcc	840
aatgccgttt cctcactgg cgtcaactcc atcaccgagg actggtgac gtccgtcgac	900
ggctcggccg ccaccttgg cggcctcacc accatgggca aggcctggg ccgcggcatg	960
gtgctcatct tcagcatttg gaacgacgcc agcggcttta tgaactggct cgacagcggc	1020
aacgccggcc cctgcagcag caccgagggc aaccagact tgatcaaggc ccagaacccc	1080
acgacgacg togtcttctc caacatccgc tggggagaca ttgggtctac tttcaagggt	1140
tctgatggct cggtagcagc gacgacgtcg actacatcga ccaagaccac gacttcgacc	1200
gcgccggggc caacgcagac tcaactatggg cagtgcggtg gccaaagggtg gactgggccc	1260
acggcttgcg catcgccta cacgtgccag gttctgaacc cgtggtactc gcaatgcctt	1320
taa	1323

<210> 30

<211> 440

5 <212> PRT

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 30

ES 2 682 798 T3

Gln Gln Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Asn Pro Lys Leu Thr Thr Tyr  
 1 5 10 15

Lys Cys Thr Thr Ala Gly Gly Cys Val Ala Gln Asp Thr Ser Val Val  
 20 25 30

Leu Asp Trp Gly Tyr His Trp Ile His Thr Val Asp Gly Tyr Thr Ser  
 35 40 45

Cys Thr Thr Ser Ser Gly Val Asp Ser Thr Leu Cys Pro Asp Ala Ala  
 50 55 60

Thr Cys Ala Lys Asn Cys Val Ile Glu Pro Ala Asn Tyr Thr Ser Ala  
 65 70 75 80

Gly Val Thr Thr Ser Gly Asp Ser Leu Thr Met Tyr Gln Tyr Val Gln  
 85 90 95

ES 2 682 798 T3

Ser Asn Gly Val Tyr Thr Asn Ala Ser Pro Arg Leu Tyr Leu Leu Gly  
100 105 110

Pro Asp Lys Asn Tyr Val Met Leu Lys Leu Leu Gly Gln Glu Leu Thr  
115 120 125

Phe Asp Val Asp Leu Ser Thr Leu Pro Cys Gly Glu Asn Gly Ala Leu  
130 135 140

Tyr Leu Ser Glu Met Ser Ala Thr Gly Gly Arg Asn Glu Tyr Asn Thr  
145 150 155 160

Gly Gly Ala Glu Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Pro Val  
165 170 175

Ile Ala Trp Lys Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser Gly Ala Ser Tyr Cys  
180 185 190

Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Ala Asn Ser Arg Ala Asn Ser Tyr  
195 200 205

Thr Pro His Pro Cys Ser Ala Thr Asp Cys Asp Lys Gly Gly Cys Gly  
210 215 220

Phe Asn Pro Tyr Ala Leu Gly Gln Lys Ser Tyr Trp Gly Pro Gly Gly  
225 230 235 240

Thr Val Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Ile Thr Thr Gln Phe Ile Thr  
245 250 255

Asn Asp Gly Thr Thr Thr Gly Thr Leu Ser Glu Ile Arg Arg Gln Tyr  
260 265 270

Met Gln Asn Gly Lys Val Ile Ala Asn Ala Val Ser Ser Thr Gly Val  
275 280 285

Asn Ser Ile Thr Glu Asp Trp Cys Thr Ser Val Asp Gly Ser Ala Ala  
290 295 300

Thr Phe Gly Gly Leu Thr Thr Met Gly Lys Ala Leu Gly Arg Gly Met  
305 310 315 320

Val Leu Ile Phe Ser Ile Trp Asn Asp Ala Ser Gly Phe Met Asn Trp  
325 330 335

Leu Asp Ser Gly Asn Ala Gly Pro Cys Ser Ser Thr Glu Gly Asn Pro  
340 345 350

ES 2 682 798 T3

Asp Leu Ile Lys Ala Gln Asn Pro Thr Thr His Val Val Phe Ser Asn  
355 360 365

Ile Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Phe Lys Gly Ser Asp Gly Ser  
370 375 380

Val Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr Ser Thr Lys Thr Thr Thr Ser Thr  
385 390 395 400

Ala Pro Gly Pro Thr Gln Thr His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly  
405 410 415

Trp Thr Gly Pro Thr Ala Cys Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Val Leu  
420 425 430

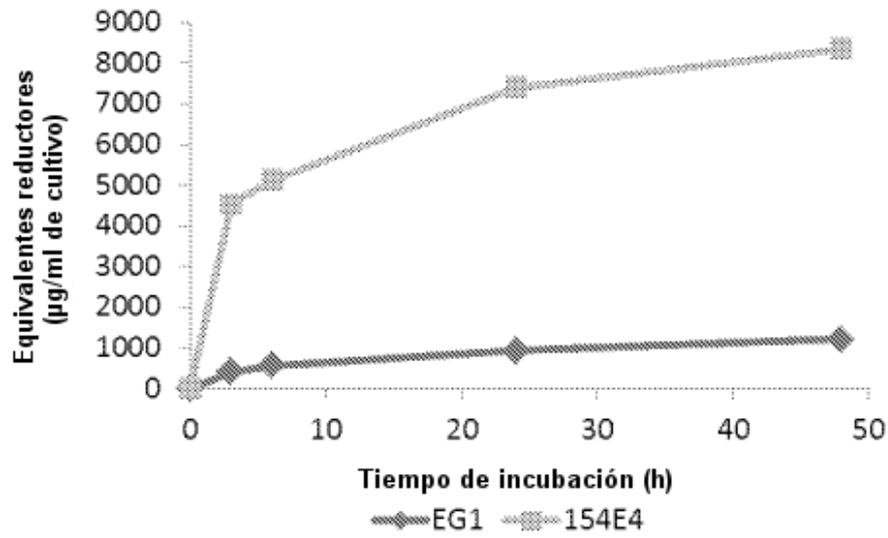
Asn Pro Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
435 440

## REIVINDICACIONES

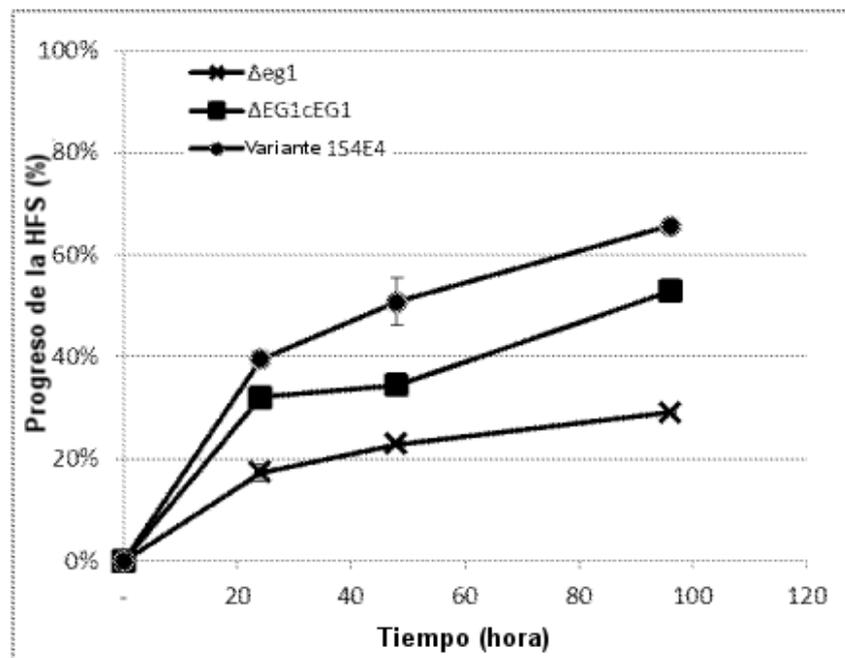
1. Polipéptido aislado o purificado **caracterizado por que** tiene una actividad endoglucanasa mejorada con respecto a la actividad endoglucanasa de la proteína de referencia EG1, dicho polipéptido se selecciona entre el grupo que  
5  
consiste en:
- i) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre 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 y SEQ ID NO: 26;
- 10 ii) una secuencia de aminoácidos que presentan, con respecto a la secuencia, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26 un porcentaje de identidad de al menos 90 %, preferentemente 95%, 98 % o 99 %, o una secuencia de aminoácidos que presenta, con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16, un porcentaje de identidad de al menos 98%.
- 15 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  
20 secuencias: 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 y SEQ ID NO: 25.
4. Vector **caracterizado por que** comprende un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 o 3.
- 25 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  
30 *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  
35 *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisea*, *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*.
- 40 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, dicha composición enzimática se  
45 produce por hongos filamentosos y 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:
- 50 - 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.
- 55 12. Procedimiento de producción de biocombustible a partir de biomasa, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas sucesivas:
- 60 - 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  
65 célula huésped de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 o 6.

14. Procedimiento de producción de biocombustible a partir de biomasa, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas sucesivas:

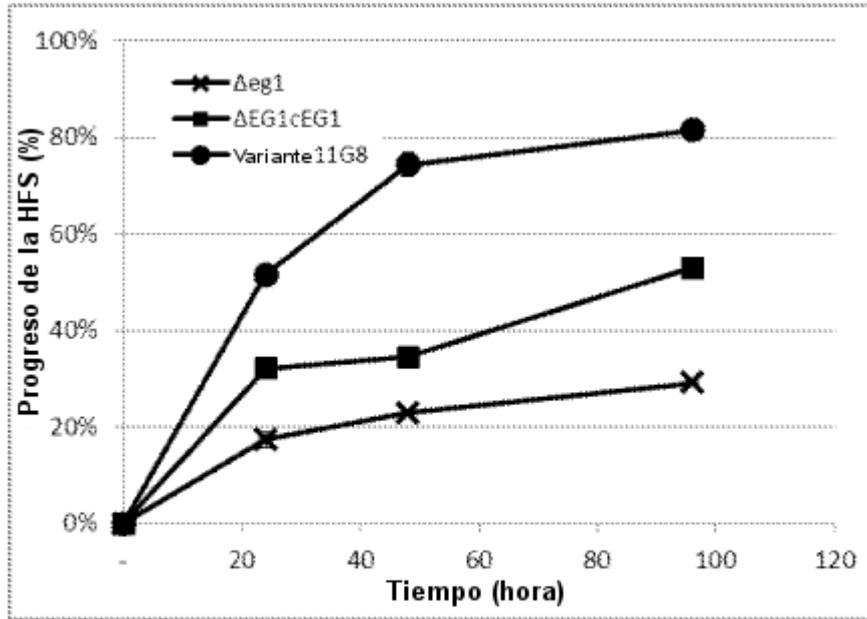
- 5
- poner en suspensión en fase acuosa la biomasa que se va a hidrolizar;
  - adición de una o más células huésped de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 7 con un organismo fermentativo y/o una composición enzimática de acuerdo con la reivindicación 10, a fin de producir un mosto de fermentación;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



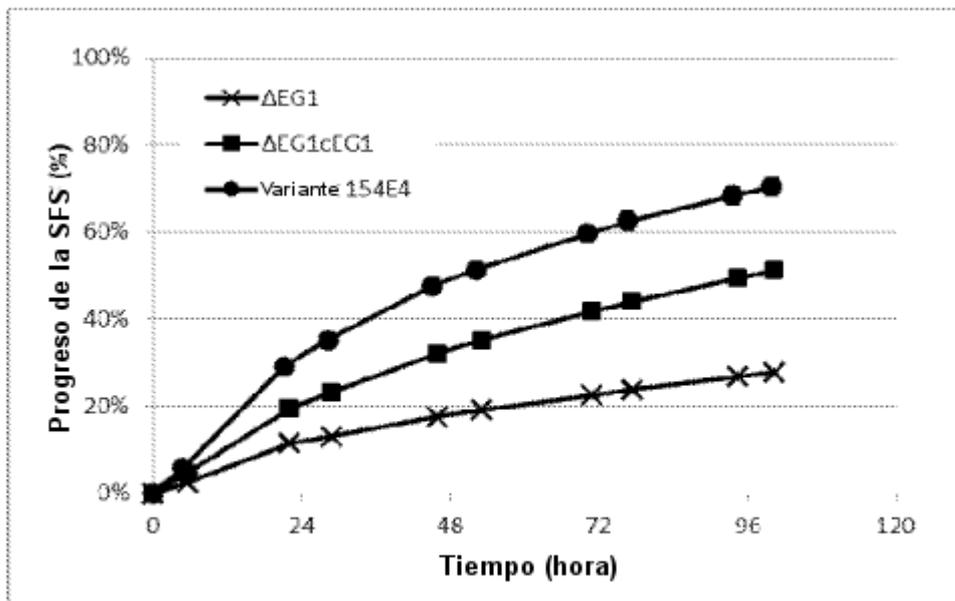
**FIGURA 1**



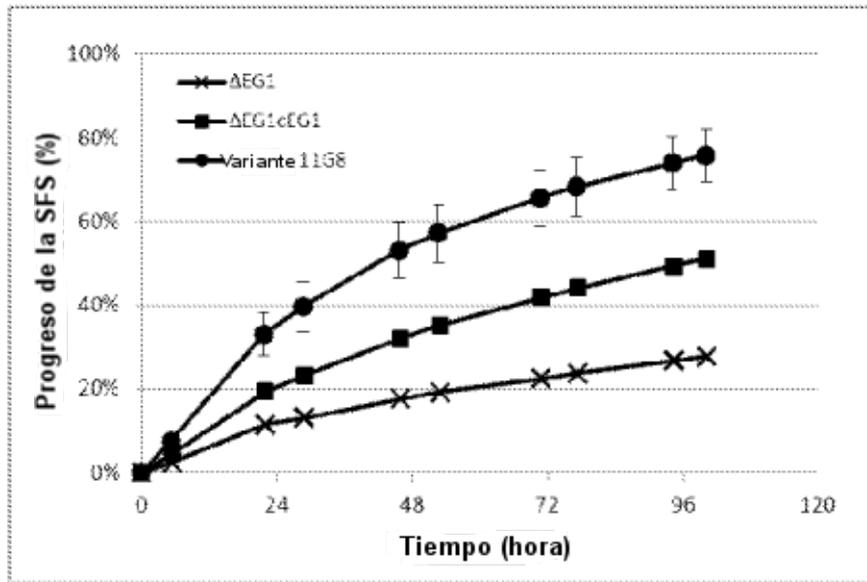
**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**



**FIGURA 5**