(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 742 382**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A23G 9/34 (2006.01)
A23L 29/00 (2006.01)
C07K 14/39 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2013** **PCT/US2013/073870**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014** **WO14089558**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2013** **E 13812374 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019** **EP 2929024**

(54) Título: **β-hexosil-transferasas y usos de las mismas**

(30) Prioridad:

07.12.2012 US 201261734742 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2020

(73) Titular/es:

NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY (100.0%)
Campus Box 8210
Raleigh, NC 27695, US

(72) Inventor/es:

BRUNO-BARCENA, JOSE, M.;
DAGHER, SUZANNE y
AZCARATE-PERIL, MARIA, ANDREA

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 742 382 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

β-hexosil-transferasas y usos de las mismas

1. Campo de la invención

Esta invención en general se refiere al descubrimiento de nuevas formas recombinantes de β-hexosil-transferasas (BHT) y sus usos para producir galacto-oligosacáridos (GOS).

2. Antecedentes de la invención

2.1. Introducción

La interacción compleja entre la dieta, la microbiota intestinal normal y el bienestar ha fomentado el desarrollo de estrategias para promover la proliferación selectiva de microorganismos beneficiosos en el tracto gastrointestinal de los humanos. Los probióticos son microorganismos que afectan positivamente la salud humana, a los que se les atribuye *potentes propiedades antipatógenas y antiinflamatorias* (27) (Tabla 1).

Tabla 1. Beneficios para la salud de los probióticos

Intestinal	Inmunidad	Reduce el riesgo de enfermedad
Infección por Helicobacter pylori	Reducción de reacciones alérgicas	Enfermedad Artero Coronaria
Intolerancia a la lactosa	Reducción de la posibilidad de infección por patógenos.	Alta presión sanguínea
Síndrome del intestino irritable		Infecciones del tracto respiratorio superior
Colitis ulcerativa		
Enfermedad de Crohn		Enfermedad del tracto urinario
Diarrea		Reduce el colesterol y los lípidos
Constipación		
Estimula la adsorción de minerales.		Ayuda en la prevención del cáncer de colon.

Además, años de investigación sobre la probiótica indican que prebióticos selectivos pueden promover una modificación selectiva de la microbiota intestinal y sus actividades bioquímicas asociadas. Osborn DA, Sinn JK. Prebiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2007. Los prebióticos son oligosacáridos no digeribles (NDO) que tienen una doble capacidad. Primero, reducen la eficiencia de la colonización intestinal de las bacterias dañinas y, en segundo lugar, actúan como sustrato selectivo para promover el crecimiento y, por lo tanto, aumentan el número de bacterias probióticas específicas.

Además, un número creciente de estudios demuestran que los probióticos funcionan mejor cuando se combinan con prebióticos. Mayer y otros. 2003 Research for creation of functional foods with Bifidobacteria. Acta Alimentaria 32 27-39. Esta forma combinada de suministro se conoce como simbiosis. Gibson GR, Roberfroid MB. 1995 Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota - Introducing the Concept of Prebiotics. Journal of Nutrition 125:1401-12.

Los galacto-oligosacáridos (GOS) se consideran una de las opciones preferidas de los prebióticos y en el tracto gastrointestinal, los GOS son resistentes a las enzimas y al tránsito a través del intestino delgado sin ser digeridos, pero en el intestino grueso los GOS se fermentan y pueden activar el crecimiento de bifidobacterias intestinales como *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei,* por lo tanto, actúan como un prebiótico (26, 27, 37).

Los GOS son oligosacáridos no digeribles debido a la conformación de su átomo de carbono anomérico (C_1 o C_2), lo cual permite que sus enlaces glucosídicos evadan la hidrólisis por enzimas digestivas en el estómago o el intestino delgado. Los oligosacáridos libres se encuentran en la leche de todos los mamíferos placentarios, y proporcionan un ejemplo natural de alimentación prebiótica durante la infancia. De acuerdo con la última definición de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) "un prebiótico dietético es un ingrediente selectivamente fermentado que produce cambios específicos en la composición y/o la actividad de la microbiota gastrointestinal, lo que confiere beneficios a la salud del hospedero"(30). La composición de los oligosacáridos de la leche humana (HMO) es muy compleja, lo cual hace que sea poco probable encontrar fuentes alternativas que contengan oligosacáridos de composición análoga. La mejora de la salud del colon entre los lactantes amamantados se atribuye a la presencia de GOS en la leche materna (2). De hecho, la fórmula infantil con GOS agregado replica el efecto bifidogénico de la leche humana con respecto a la actividad metabólica de la microbiota del colon y el número de bacterias (6,21). Entre los oligosacáridos no lácteos, los GOS son

de especial interés ya que su estructura se asemeja a las moléculas centrales de los HMO (3). Sin embargo, la concentración y composición de los GOS varía con el método y la enzima utilizada para su generación, lo que a su vez puede influir en sus efectos prebióticos y la proliferación de cepas probióticas del colon (29). Tradicionalmente, los GOS se han producido utilizando β-galactosidasas de microorganismos mesofílicos. Las β-galactosidasas mesofílicas requieren altas concentraciones iniciales de lactosa para alejar la reacción de la hidrólisis de lactosa y dirigirla a la síntesis de GOS. Como la lactosa es más soluble a temperaturas elevadas, se han utilizado β-galactosidasas termoestables que exhiben altas velocidades iniciales y vida media aumentada para alcanzar un equilibrio favorable para la reacción de transgalactosilación (27,37). Sin embargo, la inhibición competitiva por glucosa y/o galactosa es otro obstáculo que queda el cual se puede superar incorporando células en la reacción (16,20,25,27,35).

La levadura basidiomiceto *Sporobolomyces singularis* (antiguamente denominada *Bullera singularis*) no puede utilizar galactosa para crecer, pero prolifera en lactosa debido a la actividad de su β-hexosil-transferasa (BHT, EC 3.2.1.21). Los estudios han demostrado que la BHT tiene actividad de transgalactosilación incluso a bajas concentraciones de lactosa e hidrólisis de lactosa muy limitada. Además, la enzima no parece estar inhibida por concentraciones de lactosa superiores al 20% y tiene el potencial de conversión en GOS cercano al máximo teórico del 75% (1,9,10,28). A diferencia de las β-galactosidasas, la BHT de *S. singularis* lleva a cabo simultáneamente actividades de glicosilhidrolasa y β-hexosiltransferasa, convirtiendo la lactosa en GOS sin acumulación extracelular de galactosa. Se requieren dos moléculas de lactosa durante el evento de transgalactosilación: una molécula se hidroliza y la segunda actúa como aceptor de galactosa, generando el trisacárido galactosil-lactosa (β-D-Gal(1-4)-β-D-Gal(1-4)-β-D-Glc) y glucosa residual. La galactosil-lactosa también puede actuar como aceptor de una nueva galactosa para generar el tetrasacárido galactosilgalactosil-lactosa (β-D-Gal(1-4)-β-D-Gal(1-4)-β-D-Gal(1-4)-β-D-Glc), y de manera similar para el tetrasacárido y los productos posteriores. Los tri, tetra y pentasacáridos que se acumulan en *S. singularis*se han designado colectivamente como GOS (9,10).

Para intereses prácticos, una BHT recombinante secretada podría tener varias ventajas sobre la enzima nativa, incluida la mejora de la producción y purificación a gran escala. Actualmente, la purificación de la enzima activa de *S. singularis* requiere de la lisis celular seguida de múltiples pasos de cromatografía (1,4,16). Los intentos anteriores de expresar la β-hexosil-transferasa recombinante en *E. coli* BL21 resultaron en altos niveles de producción, pero la enzima estaba inactiva e insoluble (16).

3. Resumen de la invención

En modalidades particulares no limitantes, la presente invención proporciona un ADN aislado que codifica una proteína recombinante de β-hexosiltransferasa (rBHT) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID NO. 12, 14 o 20. El ADN aislado que codifica la proteína recombinante β-hexosil-transferasa (rBHT) puede tener la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEC ID NO. 11, 13 o 19.

La invención también proporciona una proteína β-hexosil-transferasa recombinante enzimáticamente activa (rBHT) en la que la proteína tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO. 12, 14 o 20. La proteína rBHT puede estar unida a la membrana o ser una enzima soluble.

La rBHT enzimáticamente activa que produce los GOS puede o no ser inhibida por galactosa.

La invención también proporciona un método para producir la proteína β-hexosil-transferasa recombinante enzimáticamente activa (rBHT) en una célula hospedera de levadura, lo cual comprende transformar la célula hospedera de levadura con un plásmido bajo el control de un promotor adecuado, en donde el plásmido contenga un ADN aislado que codifica para una proteína rBHT que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO. 12, 14 o 20.

El ADN aislado está unido a un ADN que codifica un péptido señal. El péptido señal es un péptido señal del factor α de *S. cerevisiae* y el promotor adecuado pueden ser un promotor de la alcohol oxidasa.

En algunas modalidades, la proteína rBHT enzimáticamente activa tiene una actividad específica de aproximadamente 8 $U.mg^{-1}$ a 20°C.

La célula hospedera de levadura puede ser la célula de una levadura tal como *Pichia pastoris.*

La invención también proporciona un método para producir rBHT enzimáticamente activa que comprende además usar dicha rBHT en un método para producir galacto-oligosacáridos (GOS) el cual comprende hacer reaccionar la lactosa con una proteína β-hexosil-transferasa recombinante enzimáticamente activa (rBHT) que tiene la secuencia de aminoácidos establecido en SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 en condiciones adecuadas para producir los GOS.

La proteína rBHT enzimáticamente activa puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. El soporte sólido puede estar en un reactor de tanque agitado continuo o discontinuo, un reactor de lecho empaquetado o un reactor de membrana de ultrafiltración. Alternativamente, la proteína rBHT enzimáticamente activa puede usarse directamente en un reactor de tanque agitado continuo o discontinuo, un reactor de lecho empaquetado o un reactor de membrana de ultrafiltración. El método puede comprender además un sistema de eliminación de glucosa para evitar la inhibición competitiva de la

glucosa tal como un organismo generalmente reconocido como seguro (GRAS). El sistema de eliminación de glucosa puede usarse simultáneamente con la proteína rBHT enzimáticamente activa.

La invención también se dirige a un método para producir la rBHT enzimáticamente activa que comprende además usar dicha rBHT en un alimento o subproducto alimentario modificado que contiene lactosa que comprende una proteína recombinante de β-hexosiltransferasa (rBHT) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20. El alimento o subproducto alimentario que contiene lactosa puede ser un producto lácteo o un subproducto como el suero. En algunas modalidades, el alimento o subproducto alimentario es un postre para bebés, un jugo para bebés, una merienda para bebés, una bebida de yogur para bebés, una bebida energética, agua para hacer ejercicio o una bebida refrescante, un postre lácteo congelado, una bebida de frutas (vitaminas/minerales fortificados), un relleno de tarta de frutas, una preparación de frutas, una fórmula infantil, una bebida sustitutiva de comidas para bebés, una mermelada o gelatina, una bebida sustitutiva de comidas, una leche, una bebida a base de leche, un sustituto de leche, un saborizante de jarabe para leche, un yogurt o un suero de leche.

4. Breve descripción de las figuras

Figuras 1A-1C. Electroforesis en gel de rBHT purificada expresada en *P. pastoris.* (1A) SDS-PAGE de rBHT purificada, teñida con plata: Carril 1, 0.5 µg de rBHT; carril 2, 0.1 µg de rBHT. (1B) Análisis de la transferencia por Western con antisueros anti-rBHT. El carril M indica que las masas moleculares (kDa) de las proteínas marcadoras se muestran a la derecha del Panel A. (1C) Zimograma de la rBHT. Carril 1, la rBHT-6XHIS purificada expresada en *cultivos BLR* de E. coli; Carril 2, cultivo de metanol no transformado que induce GS115; Carril 3, cultivo de metanol que induce el recombinante *GS115*/*rBHT.* La actividad se visualizó mediante la formación de un precipitado azul resultante de la escisión enzimática de X-GAL.

Figura 2A-2D. Dependencia de la actividad relativa de rBHT del pH (2A). (2B) Temperaturas de 20°C a 80°C. (2C) Concentración de galactosa (círculo sólido) y glucosa (cuadrado sólido). (2D) Estabilidad térmica de 20°C a 50°C. Se extrajeron muestras cada 12 h y se analizó la actividad a 20°C. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron en fosfato de sodio 50 mM (pH 5.0) que contenía ONP-Glu 1.3 mM a 20°C, excepto para (A) que usó tampones de fosfato de sodio (pH 5-11) o citrato (pH 2-5). Las actividades enzimáticas se calcularon en relación con el valor tomado en el tiempo cero (100%). La concentración inicial de enzima que se probó fue de 0.2 $U.ml^{-1}$ ensayado a 20°C (K_m=0.37 mM y V_{max}=0.09 $mM.min^{-1}$). Los datos representan las medias de dos experimentos con una fiabilidad de ±5%.

Figura 3. Síntesis de galactosil-lactosa a partir de lactosa (2%) usando rBHT parcialmente purificado (0.5 Ug^{-1} de lactosa) en 5 mM de tampón de fosfato de sodio a pH 5.0 incubado a 42°C. Las concentraciones de lactosa, glucosa, galactosa y galactosil-lactosa se muestran en $g.l^{-1}$. Las especies de GOS residuales no cuantificadas se muestran como lecturas de intensidad de señal del detector de índice de refracción. Los datos representan las medias de dos experimentos con una fiabilidad de ±5%.

Figuras 4A-4B. Síntesis de galacto-oligosacáridos a partir de lactosa (20%) usando células en reposo de *P. pastoris* (que contienen la rBHT unida a la membrana a 0.5 $U.g^{-1}$ de lactosa) en 5 mM de tampón de fosfato de sodio a pH 5.0 incubado a 42°C (4A) o 30°C (4B). Las concentraciones de lactosa, glucosa, galactosa y galactosil-lactosa se muestran en $g.l^{-1}$. Las especies de GOS residuales no cuantificadas se muestran como lecturas de intensidad de señal del detector de índice de refracción. Los datos representan las medias de dos experimentos con una fiabilidad de ±5%.

Figura 5. Muestra una comparación de las actividades enzimáticas y los azúcares, incluidos los GOS producidos por la rBHT descrita en este documento (GOS NCSU) y dos enzimas disponibles comercialmente, Vivinal GOS y Oligomate 55NP de Yakalt Pharmaceuticals, Inc. a 30°C. Vea el procedimiento en la Sección 6.3.

Figuras 6A-6B. Gráfico de hidropatía de Kyte y Doolittle para BHT. Se amplificó la secuencia de aminoácidos para la secuencia de señal/anclaje de membrana predicha. El algoritmo de predicción de la región transmembrana (www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) también pronosticó una región de residuos hidrofóbicos 1-17 en BHT típico para proteínas integrales que abarcan de membrana y el algoritmo SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) predijo una posible secuencia de señal para los mismos residuos y el posible sitio de escisión entre los residuos 17 y 18 y entre 22 y 23. La secuencia de señal se retuvo en las construcciones 1, 2, 3, 4 y 7 para servir como un anclaje de membrana natural.

Figuras 7A-7C. Análisis de secuencia de BHT. (7A) Representación esquemática del polipéptido BHT de *S. singularis* determinado por el programa SMART basado en la web (http://smart.embl-heidelberg.de). El péptido líder representado por un cuadrado negro se determinó por el *Programa Signal* P. El segmento de baja complejidad de composición representado por un círculo negro se determinó por el programa *SEG* (http://mendel.imp.ac.at/METHODS/seg.server.html). Los resultados que solo se encuentran por BLAST están indicados por el dominio de glicohidrolasa. Los triángulos negros indican las posiciones de los tres supuestos sitios de N-glicosilación determinados por NetNGlyc 1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/). (7B) Representación esquemática del péptido líder calculado por el método de predicción transmembrana RHYTHM. Se amplificó la secuencia de aminoácidos para la secuencia de anclaje de membrana predicha. Los aminoácidos de contacto con la membrana están en negrita mayúscula y el aminoácido de contacto de hélice está en mayúscula y subrayado. También se indican las posiciones de las regiones

citoplasmáticas y extracelulares predichas. Las flechas indican los posibles sitios de escisión. (7C) Gráfico de hidropatía. El gráfico se generó usando el método Kyte-Doolittle para calcular la hidrofilia en una longitud de pantalla de nueve aminoácidos. El número de aminoácidos se muestra debajo del eje X. El cero en el eje Y separa los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos.

Figuras 8A-8D. Concentración de proteína secretada por cada cepa *de P. pastoris* recombinante. Las representaciones gráficas de cepas recombinantes que contienen *rBht* y *scFv13R4* se muestran a la izquierda (8A) y a la derecha (8D) de los gráficos, respectivamente. (8B) rBHT-SU secretada. (8C) scFv13R4-HIS secretado. Los valores de proteína secretada se normalizaron para una OD_{600} y representó la media ± SE. Las proteínas secretadas se analizaron a partir de las siguientes cepas recombinantes: (8A y 8B) fila 1, GS115::*αMF-rBht*$_{((23-594)}$-H IS; fila 2, GS115::*rBht*-HIS; fila 3, GS115::*rBht*$_{(23-594)}$-HIS; fila 4, GS115::*αMF-rBht*-HIS. (8C y 8D) fila 1, GS115::*αMF*-scFv13R4-HIS; fila 2, GS115::*rBht*$_{(1-110)}$-*scFv13R4*-HIS; fila 3, GS115::*rBht*$_{(23-110)}$-*scFv13R4*-HIS; fila 4, GS115::*scFv13R4*-HIS.

Figuras 9A-9C. La separación por SDS-PAGE (8%) y el Western blot revelaron un antisuero anti-His que mostró la rBHT-HIS secretada, asociada a células o purificada, expresada por diferentes *recombinantes de la cepa GS115* de P. pastoris. (9A) Los extractos de proteínas libres de células (proteínas secretadas) generados por todos los recombinantes se concentraron 20 veces. (9B) Las proteínas asociadas a células se obtuvieron de cinco OD_{600} de células recombinantes disgregadas con perlas de vidrio en el tampón IX Laemmli. Carril *1,* GS115::*αMF-rBht*-HIS*;* carril 2, GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$-HIS; carril 3, GS115::*rBht*-HIS; carril 4, GS115::*rBht*$_{(23-594)}$-HIS; y carril 5, control GS115. (9C) Tinción de plata de rBHT-HIS expresada por GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$-HIS purificado mediante cromatografía de afinidad de níquel y resueltas en SDS-PAGE(8%). M indica carril marcador. Las masas moleculares (kDa) de las proteínas marcadoras se muestran a la izquierda de los paneles.

Figuras 10A-10B. Tiempo de síntesis de galactosil-lactosa usando la rBHT soluble o las células en reposo de *P. pastoris* que contienen la rBHT unida a la membrana (0.5 U rBHT.g^{-1} lactosa). (10A) Síntesis por la rBHT-HIS secretada, expresada por GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$-HIS (línea continua) y la rBHT por GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$ (línea discontinua). (10B) La velocidad de síntesis de galactosil-lactosa por las células en reposo GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$-HIS (cuadrado negro) y GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$ (cuadrado blanco). Los ensayos contenían 200 g.L^{-1}de lactosa y enzima purificada o células en reposo de *P. pastoris* en 5 mM de tampón fosfato de sodio a pH 5.0 e incubado a 30°C. Las muestras se retiraron periódicamente y se analizaron por HPLC. Las concentraciones de lactosa, glucosa, galactosa y galactosil-lactosa se muestran en g.L^{-1}. Las especies de GOS residuales no cuantificadas se muestran como lecturas de intensidad de señal del detector de índice de refracción. Los datos representan las medias de dos experimentos independientes.

5. Descripción detallada de la invención

Esta invención informa varios métodos para la expresión de la BHT*de S. singularis* que incluye, entre otros, un método que utiliza un codón optimizado, el gen sintético*rBht* (número JF29828 de acceso en GenBank) expresado en *Pichia pastoris.* Se investigó la cinética de la producción de GOS a partir de la lactosa por la β-hexosil-transferasa recombinante secretada (rBHT) en comparación con *células en reposo de P. pastoris* que contienen rBHT unido a la membrana.

Las "proteínas rBHT", como se entiende en el presente documento, incluye proteínas rBHT de longitud completa y fragmentos y/o variantes de las mismas, que incluye proteínas codificadas por variantes alélicas naturales del gen rBHT, así como proteínas rBHT producidas de forma recombinante, las cuales pueden contener algunos cambios de secuencia en relación con las proteínas rBHT naturales.

Una proteína "recombinante" es resultante del proceso de ingeniería genética. El término "ingeniería genética" se refiere a un método de ADN recombinante o ácido nucleico utilizado para crear una célula que expresa un gen a niveles elevados o bajos, o que expresa una forma mutante del gen. En otras palabras, la célula se transfecta, se transforma o se transduce con una molécula de polinucleótido recombinante, y por lo tanto se altera para hacer que la célula modifique la expresión de un polipéptido deseado.

El "galacto-oligosacárido" o "GOS" es un polisacárido que contiene galactosa con dos o más unidades de azúcar como Gal-Gal o $[Gal]_n$-Glc ($1 \leq n \leq 8$), incluyendo β-D-Gal(1→4)-β-D-Gal(1→4)-β-D-Glc, β-D-Gal(1→4)- β-D-Gal (1→4)-β-D-Gal(1→4)-β-D-Glc, y β-D-Gal(1→4)-β-D-Gal(1→4) -β-D-Gal(1→4)-β-D-Gal(1→4)-β-D-Glc.

5.1 Secuencias señales:

Las proteínas secretadas solubles y las proteínas expresadas en la superficie celular a menudo contienen una "secuencia señal" N-terminal, la cual es una secuencia hidrofóbica que media la inserción de la proteína a través de la membrana al unir el retículo endoplásmico (ER) en una célula eucariota. Las proteínas transmembrana de tipo 1 también comprenden secuencias señales. Las "secuencias señales", como se entiende en el presente documento, son secuencias hidrófobas aminoterminales que por lo general se eliminan enzimáticamente después de la inserción de una parte o toda la proteína a través de la membrana del ER en el lumen de este. Por lo tanto, se sabe en la técnica que una secuencia señal puede estar presente como parte de la forma precursora de una proteína transmembrana o secretada, pero generalmente estará ausente de la forma madura de la proteína. Cuando se dice que una proteína comprende una secuencia señal, debe entenderse que, aunque una forma precursora de la proteína contiene la secuencia señal, una forma madura de la proteína

probablemente no contendrá la secuencia señal. Las secuencias señales pueden contener un residuo inmediatamente anterior al sitio de escisión (posición -1) y otro residuo en la posición -3, los cuales son importantes para esta escisión enzimática. Nielsen y otros. 1997 Protein Eng 10 (1) 1-6; von Heijne 1983 Eur J Biochem 133 (1) 7-21; von Heijne 1985 J Mol Biol 184 99-105, los cuales describen secuencias señales y cómo identificarlas. Las secuencias de señales se pueden identificar como describe Nielsen *y otros.* (supra). Los ejemplos de péptidos señales o secuencias que son funcionales en células hospederas de mamífero incluyen los siguientes: *la secuencia señal del factor de apareamiento pre-pro-alfa* de Saccharomyces cerevisiae, la secuencia señal de la interleucina-7 (IL-7) descrita en la Patente de E.U 4,965,195 : la secuencia señal del receptor de la interleucina-2 descrita en Cosman y otros. 1984 Nature 312 768-771); el péptido señal del receptor de la interleucina-4 descrito en la Patente de EP 0 367 566 ; la secuencia señal del receptor de la interleucina-1 tipo 1 descrita en la Patente de E.U 4,968,607 ; el péptido señal del receptor de interleucina-1 tipo II descrito en la Patente de EP 0 460 846. Muchas otras secuencias señales se conocen en la técnica.

5.2. Proteína rBHT

La presente invención incluye versiones secretadas y solubles de rBHT, así como versiones que comprenden un dominio transmembrana que puede expresarse en una superficie celular. Estas proteínas pueden aislarse, es decir, ser parte de una preparación de proteína purificada en la que la proteína rBHT constituye al menos el 80% o el 90% de la proteína presente en la preparación. La invención incluye además proteínas rBHT codificadas por los ácidos nucleicos de rBHT descritos a continuación. Una proteína rBHT, como se entiende en el presente documento, incluye una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 12, 14 o 20. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 12, 14 o 20 incluyen una secuencia señal.

5.3. Sustituciones conservadoras

En algunos aspectos, las sustituciones pueden ser sustituciones conservadoras de aminoácidos. Los ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos, que probablemente no afecten la actividad biológica, incluyen los siguientes: alanina por serina, valina por isoleucina, aspartato por glutamato, treonina por serina, alanina por glicina, alanina por treonina, serina por asparagina, alanina por valina, serina por glicina, tirosina por fenilalanina, alanina por prolina, lisina por arginina, aspartato por asparagina, leucina por isoleucina, leucina por valina, alanina por glutamato, aspartato por glicina y estos cambios al revés. Ver por ejemplo Neurath y otros., The Proteins, Academic Press, Nueva York (1979) Además, un intercambio de un aminoácido por otro dentro del mismo grupo es una sustitución conservadora, donde los grupos son los siguientes: (1) alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, norleucina y fenilalanina: (2) histidina, arginina, lisina, glutamina y asparagina; (3) aspartato y glutamato; (4) serina, treonina, alanina, tirosina, fenilalanina, triptófano y cisteína; y (5) glicina, prolina y alanina.

5.4 Glicosilación

Las proteínas rBHT pueden estar glicosiladas en diversos grados o no glicosiladas. Como ilustración, una proteína rBHT de la invención puede comprender uno o más sitios de glicosilación de unión a N u O además de los que ya se encuentran en una proteína que comprende la SEQ ID NO. 12, 14 o 20. Un experto en la técnica es consciente de que los residuos de asparagina que forman parte de la secuencia Asn Xxx Ser/Thr (donde Xxx es cualquier aminoácido excepto prolina) pueden servir como sitios de adición para los N-glucanos. Además, hay muchos residuos de serina y treonina que pueden servir como sitios de glicosilación de unión a O. La glicosilación puede aumentar *la vida media in vivo* o alterar la actividad biológica. Las variantes de las proteínas rBHT también incluyen proteínas que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez más sitios de glicosilación de unión a N y/u O que los presentes en la SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 siempre que la proteína resultante pueda actuar como una glicosil hidrolasa y una β-hexosil-transferasa. Las variantes de proteínas rBHT también incluyen aquellas que tienen uno, dos, tres, cuatro o cinco menos sitios de glicosilación de unión a N y/u O que los que están presentes en la SEQ ID NO. 12, 14 o 20 siempre que puedan actuar como una glicosil hidrolasa y una β-hexosil-transferasa.

Las proteínas rBHT, como se describe en el presente documento, pueden ser proteínas de fusión que comprenden al menos un polipéptido rBHT, que puede contener una secuencia de aminoácidos que sea una variante y/o un fragmento de la SEQ ID NO. 12, 14 o 20 (como se explicó anteriormente), y al menos otra porción. La otra porción también puede ser una porción no proteica tal como, por ejemplo, una porción de polietilenglicol (PEG) o una porción citotóxica, citostática, luminiscente y/o radiactiva. Se ha demostrado que la fijación de PEG aumenta *la vida media in vivo* de al menos algunas proteínas. Además, las porciones citotóxicas, citostáticas, luminiscentes y/o radiactivas se han fusionado con anticuerpos con fines de diagnóstico o terapéuticos.

Se puede fusionar una variedad de polipéptidos distintos de rBHT a un polipéptido rBHT para una variedad de propósitos tales como, por ejemplo, aumentar *la vida media in vivo* de la proteína, facilitar la identificación, el aislamiento y/o la purificación de la proteína, aumentar su actividad y promover su oligomerización.

Muchos polipéptidos pueden facilitar la identificación y/o purificación de la proteína de fusión recombinante de la cual forman parte. Los ejemplos incluyen poliarginina, polihistidina o HAT™ (Clontech), la cual es una secuencia natural de residuos de histidina no adyacentes que poseen una alta afinidad por los iones metálicos inmovilizados. Las proteínas rBHT que comprenden estos polipéptidos pueden purificarse mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando

níquel inmovilizado o resina TALON ™ (Clontech), lo cual comprende toneladas de cobalto inmovilizado. Ver por ejemplo Knol y otros. 1996 J Biol Chem 27(26) 15358-15366. Los polipéptidos que comprenden poliarginina permiten una purificación efectiva por cromatografía de intercambio iónico. Otros polipéptidos útiles incluyen, por ejemplo, los péptidos de identificación antigénica descritos en laPatente de E.U 5,011,912 y en Hopp y otros. 1988 BiolTechnology 6 1204. Uno de estos péptidos es el péptido FLAG™, el cual es altamente antigénico y proporciona un epítopo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal específico, lo que permite un análisis rápido y una purificación fácil de la proteína de fusión recombinante expresada. Un hibridoma murino designado 4E11 produce un anticuerpo monoclonal que se une al péptido FLAG en presencia de ciertos cationes metálicos divalentes, como se describe en la Patente de E.U 5,011,912. La línea celular de hibridoma 4E11 se identificó en American Type Culture Collection con el número de acceso HB 9259. Los anticuerpos monoclonales que se unen al péptido FLAG se pueden usar como reactivos de afinidad para recuperar un reactivo de purificación de polipéptidos que comprende el péptido FLAG. Otros marcadores de proteínas y reactivos de afinidad adecuados son: 1) los descritos en el sistema GST-Bind™ (Novagen), que utiliza la afinidad de las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa por el glutatión inmovilizado; 2) los descritos en el kit de purificación de afinidad T7-TAG®, que utiliza la afinidad de los 11 aminoácidos aminoterminales de la proteína 10 del gen T7 por un anticuerpo monoclonal; o 3) los descritos en el sistema STREP-TAG® (Novagen), que utiliza la afinidad de una forma de estreptavidina diseñada por una proteína marcada. Algunas de las proteínas marcadas mencionadas anteriormente, así como otras, se describen en Sassenfeld 1990 TIBTECH 8: 88-93, Brewer y otros, en Purification and Analysis of Recombinant Proteins, págs. 239-266, Seetharam and Sharma (eds.), Marcel Dekker, Inc. (1991) y Brewer y Sassenfeld, en Protein Purification Applications, págs. 91 - 111, Harris y Angal (eds.), Press, Inc., Oxford Inglaterra (1990). Además, las fusiones de dos marcadores o más descritos anteriormente, tales como, por ejemplo, un marcador de fusión de una FLAG y un marcador de polihistidina, pueden fusionarse a una proteína rBHT de la invención.

5.5. Los ácidos nucleicos de rBHT

La invención abarca ácidos nucleicos aislados, que incluyen, por ejemplo, ADN y ARN, que codifican las proteínas rBHT descritas en el presente documento, que incluyen proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 12, 14 o 20. Preferentemente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 12 o 14. Estos ácidos nucleicos son útiles para, *entre otros,* producir proteínas recombinantes que tengan glicosil hidrolasa y una actividad de β-hexosil-transferasa. Estos ácidos nucleicos pueden ser ADN genómico modificado o ADNc. Preferentemente, los ácidos nucleicos pueden comprender un marco de lectura abierto ininterrumpido que codifica una proteína rBHT. Las moléculas de ácido nucleico como se describen incluyen ADN y ARN tanto en forma monocatenaria como bicatenaria, así como las secuencias complementarias correspondientes. Un "ácido nucleico aislado" es, en el caso de los ácidos nucleicos aislados de fuentes naturales, uno que se ha separado de las secuencias genéticas adyacentes presentes en el genoma del organismo del que se aisló este ácido; en el caso de los ácidos nucleicos sintetizados químicamente, como los oligonucleótidos, o enzimáticamente a partir de una plantilla, como los productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o los ADNc, se entiende que los ácidos nucleicos resultantes de tales procesos son aislados. Una molécula de ácido nucleico aislada se refiere a una molécula en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ácido nucleico más grande.

La presente invención también incluye ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de SEQ ID NO. 11, 13, 19, o ácidos nucleicos que hibridan en condiciones moderadamente estrictas, y opcionalmente en condiciones altamente estrictas, a ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 11, 13, 19, que es la secuencia del ADNc de rBHT de longitud completa, en donde el ácido nucleico codifica una proteína que puede actuar como una glicosil hidrolasa y una β-hexosil-transferasa. Las técnicas de hibridación son bien conocidas en la técnica y se describen mediante Sambrook, J., EF Fritsch y T. Maniatis (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9 y 11, 1989) y Current Protocols in Molecular Biology (FM Ausubel y otros., eds., John Wileyular (FM Ausubel et al., Eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4 1995) Las condiciones moderadamente estrictas para las hibridaciones de filtro incluyen la hibridación en aproximadamente 50% de formamida, 6 x SSC a una temperatura de aproximadamente 42°C a 55° y el lavado a aproximadamente 60°C en 0.5 x SSC, 0.1% de SDS. Las condiciones altamente estrictas se definen como las condiciones de hibridación que se indicaron anteriormente, pero con lavado a aproximadamente 68°C en 0.2 x SSC, 0.1% de SDS. SSPE (1xSSPE es 0.15 M NaCl, 10 mM NaH_2P0_4, y EDTA 1.26 mM, pH 7.4) se puede sustituir por SSC (1 xSSC es 0.15 M de NaCl y 15 mM de citrato de sodio) en los tampones de hibridación y lavado; los lavados, opcionalmente al menos dos lavados, se realizan durante 15 minutos después de que se completa la hibridación.

Debe entenderse que la temperatura y la concentración de sales del lavado pueden ajustarse de acuerdo con sea necesario para lograr un grado de rigurosidad deseado al aplicar los principios básicos que rigen las reacciones de hibridación y la estabilidad de los híbridos, como se conoce por los expertos en la técnica y se describe adicionalmente más abajo (ver, por ejemplo, Sambrook *y otros., supra*). Cuando los ácidos nucleicos de secuencia conocida se hibridan, la longitud del híbrido se puede determinar alineando las secuencias de los ácidos nucleicos (por ejemplo, usando GAP) e identificando la región o regiones complementarias de secuencia óptima. La temperatura de hibridación para los híbridos que se prevé que tenga menos de 50 pares de bases de longitud debe ser de 5°C a 10°C menor que la temperatura de fusión (Tm) del híbrido, donde la Tm se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, Tm (grados C) = 2(# de bases A + T) + 4 (# de bases G + C). Para híbridos de más de 18 pares de bases de longitud, Tm (grados C) = 81.5 + 16.6($\log_{10}[Na^+]$) + 0.41 (%G + C) - (600 N), en donde N es el número de bases en el híbrido, y $[Na^+]$ es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación. Cada uno de estos

ácidos nucleicos hibridantes tiene una longitud que es de al menos 15 nucleótidos (o al menos 18, 20, 25, 30, 40, 50, o 100 nucleóticos). Sambrook *y otros., supra.*

Los ácidos nucleicos de rBHT incluyen ácidos nucleicos que comprenden los siguientes polinucleótidos: (1) toda o un fragmento de la SEQ ID NO. 11, 13, 19, en donde el fragmento codifica una proteína rBHT que puede actuar como una glicosil hidrolasa y una β-hexosil-transferasa; (2) un polinucleótido que incluye secuencias de nucleótidos al menos 97%, 98%, 99%, 99.5% o 99.7% idénticas a la SEQ ID NO. 11, 13, 19 en donde la secuencia codifica una proteína rBHT que puede actuar como una glicosil hidrolasa y una β-hexosil-transferasa; (3) un polinucleótido que comprende no más de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 o 30 alteraciones de un solo nucleótido en relación con la SEQ ID NO. 11, 13, 19, en donde una alteración puede ser una inserción, deleción o sustitución de un solo nucleótido, y en donde el polinucleótido codifica una proteína rBHT que puede actuar como una glicosil hidrolasa y una β-hexosil-transferasa; y (4) un polinucleótido que codifica una proteína rBHT como se describe en el presente documento. En una modalidad preferida, la proteína rBHT se produce reemplazando la secuencia líder con un péptido señal de secreción heterólogo.

5.6. Métodos de síntesis de proteínas rBHT

Las proteínas rBHT pueden prepararse como sigue. Un ácido nucleico que codifica una proteína rBHT, como se describe en el presente documento, se puede introducir en un vector, que se puede introducir en una célula hospedera. La invención abarca los vectores y las células hospedera que comprenden ácidos nucleicos que codifican una proteína rBHT. La célula hospedera que contiene los ácidos nucleicos que codifican una proteína rBHT puede cultivarse en condiciones tales que la proteína rBHT pueda expresarse. La proteína rBHT expresada luego puede obtenerse del medio en el que se cultivan las células o de las células y purificarse por cualquiera de los numerosos métodos apropiados conocidos en la técnica. Además, los métodos de ingeniería genética para la producción de proteínas rBHT incluyen la expresión de las moléculas de polinucleótidos en sistemas de expresión libres de células, en hospedadores celulares, en tejidos y en modelos animales, de acuerdo con los métodos conocidos.

El vector puede incluir un marcador selectivo y un origen de replicación, para la propagación en un hospedero. El vector puede incluir además secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales adecuadas, tales como las derivadas de genes de mamíferos, microbianos, virales o de insectos, operativamente unidos al ácido nucleico que codifica la proteína rBHT. Los ejemplos de tales secuencias reguladoras incluyen promotores, operadores o potenciadores de la transcripción, sitios de unión a ARNm ribosómico y secuencias apropiadas que controlan la transcripción y la traducción. Las secuencias de nucleótidos se unen operativamente cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con el ADN que codifica la proteína diana. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos del promotor se une operativamente a una secuencia nucleica de rBHT si la secuencia del promotor dirige la transcripción de la secuencia que codifica la proteína rBHT. Si la proteína rBHT es una proteína de fusión, una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción de la proteína de fusión, por ejemplo, una secuencia señal, puede ser parte de un vector, y un ácido nucleico que codifica una proteína rBHT puede insertarse en el vector de manera que una proteína que comprende la secuencia señal añadida más la proteína rBHT está codificada por el vector.

Las células hospedera descritas para la expresión de proteínas rBHT incluyen células procariotas, de levadura, vegetales, de insectos y células eucariotas superiores. Las secuencias reguladoras en el vector se elegirán de manera que sean operables en la célula hospedera. Las células hospederas procariotas que se describen incluyen bacterias de los géneros Escherichia, Bacillus y Salmonella, así como miembros de los géneros Pseudomonas, Streptomyces y Staphylococcus. Para la expresión en células procariotas, por ejemplo, en *E. coli* la molécula polinucleotídica que codifica una proteína rBHT incluye preferiblemente un residuo de metionina N-terminal para facilitar la expresión del polipéptido recombinante. La metionina N-terminal puede separarse opcionalmente del polipéptido expresado. Las células hospederas de levaduras adecuadas incluyen células de los géneros Saccharomyces, Pichia y Kluveromyces. Los hospederos de levadura que se prefieren son *S. cerevisiae* y *P. pastoris.* Un sistema adecuado para la expresión en una célula hospedera de insecto se describe, por ejemplo, en la revisión de Luckow y Summers (1988 BioTechnology 6 47-55) Las células hospederas de mamíferos descritas incluyen la línea celular de riñón de mono COS-7 (Gluzman y otros. 1981 Celda 23 175-182), células de riñón de hámster bebé (BHK), células de ovario de hámster chino (CHO) (Puck y otros. 1958 PNAS USA 60 1275-1281), CV-1 (Fischer y otros. 1970 Int J Cáncer 5 21-27), células de riñón humano 293 (American Type Culture Collection (ATCC®) catálogo no. CRL-10852 ™) y células de carcinoma cervical humano (HELA) (ATCC® CCL 2).

Los vectores de expresión para uso en hospedadores celulares generalmente comprenden uno o más genes selectivos de marcadores fenotípicos. Estos genes codifican, por ejemplo, una proteína que confiere resistencia a los antibióticos o que suministra un requerimiento auxotrófico. Se dispone fácilmente de una amplia variedad de estos vectores de fuentes comerciales. Los ejemplos incluyen los vectores pGEM (Promega), los vectores pSPORT y pPROEX (InVitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), los vectores Bluescript (Stratagene) y los vectores pQE (Qiagen). Los vectores de levadura a menudo contienen una secuencia de origen de replicación de un plásmido de levadura, una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción y un gen marcador selectivo. También se pueden usar vectores replicables en levadura y en *E. coli* (denominados vectores lanzadera). Además de las características mencionadas anteriormente de los vectores de levadura, un vector lanzadera también incluye secuencias para la replicación y selección en *E. coli.* La secreción directa de los polipéptidos diana expresados en hospederos de levadura se logra mediante la inclusión de la secuencia de nucleótidos que codifica la

secuencia líder del factor a de levadura en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica la rBHT. Brake 1989 Biotechnology 13 269-280.

Los ejemplos de vectores de expresión adecuados para usar en células hospederas de mamífero incluyen pcD A3.1 / Hygro (Invitrogen), pDC409 (McMahan y otros. 1991 EMBO J 10: 2821 -2832) y pSVL (Pharmacia Biotech). Los vectores de expresión para usar en células hospederas de mamífero pueden incluir secuencias de control transcripcional y traduccional derivadas de genomas virales.

Las secuencias promotoras y potenciadoras que se usan comúnmente para expresar el ARN de rBHT incluyen, entre otros, aquellas derivadas de citomegalovirus humano (CMV). Adenovirus 2, poliomavirus y virus del simio 40 (SV40). Los métodos para la construcción de vectores de expresión en mamíferos se describen, por ejemplo, en Okayama y Berg (1982 Mol Cell Biol 2: 161-170)), Cosman y otros. (1986 Mol Immunol 23: 935-941), Cosman y otros. (1984 Nature 312: 768-771), EP-A-0367566y WO 91/18982.

5.7. Marcadores de purificación

Además del marcador 6XHIS descrito en el presente documento, se pueden usar una variedad de métodos de purificación tales como marcadores de afinidad, marcadores antigénicos (por ejemplo, FLAG (Sigma-Aldrich, Hopp y otros. 1988 Nat Biotech 6: 1204-1210), hemaglutanina (HA) (Wilson y otros., 1984 Cell 37:767), Sistemas de expresión de fusión Intein (New England Biolabs, USA) Chong y otros. 1997 Gene 192 (2), 271-281o proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión S transferasa (GST)/glutatión, poli His/Ni o Co (Gentz y otros., 1989 PNAS USA 86:821-824) ,. Las proteínas de fusión que contienen los marcadores GST en el extremo N de la proteína también se describen en U.S Pat. No. 5,654,176 (Smith). También se pueden usar técnicas de separación magnética tales como Strepavidin-DynaBeads® (Life Technologies, USA). Alternativamente, se pueden usar enlaces foto-escindibles, *por ejemplo,* U.S. Pat. No 7.595.198 (Olejnik & Rothchild) Muchos otros sistemas se conocen en la técnica y son adecuados para su uso con la presente invención.

5.8. Métodos de síntesis de galacto-oligosacáridos (GOS)

En una modalidad de la invención, los galacto-oligosacáridos (GOS) se producen incubando la célula que expresa la rBHT en un medio que contiene un sustrato disacárido tal como, por ejemplo, lactosa o celobiosa. En una modalidad, los GOS se produce a partir de lactosa simultáneamente con un sistema de eliminación de glucosa. El sistema de eliminación de glucosa puede ser un organismo generalmente reconocido como seguro (GRAS).

5.9. Formulaciones

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína rBHT o de células que expresan la rBHT para producir un alimento o un suplemento dietético que contiene galacto-oligosacáridos (GOS). El alimento puede ser de consumo diario como el yogurt, el queso o los productos lácteos fermentados. La rBHT o la célula que expresa la rBHT puede agregarse en parte al alimento o a los suplementos dietéticos. La rBHT puede secarse usando Spray Dry; Un método rápido y suave para obtener incluso las cantidades más pequeñas de sustancias sensibles a la temperatura en forma de polvo. La rBHT seca también puede encapsularse usando la capacidad del secador por aerosol para recubrir partículas, inmovilizar material sólido en una matriz y fabricar microcápsulas (www.buchi.com/Mini_ Spray_Dryer_B-290.179.0.html). Se pueden usar otras aplicaciones de administración de fármacos que utilizan agentes y tecnologías encapsulantes GRAS funcionales. La tableta de rBHT seca y las formas en polvo pueden analizarse para determinar la tasa de actividad de la rBHT una vez rehidratada en un tampón que contiene lactosa y en productos lácteos.

Los ejemplos de los alimentos incluyen, entre otros, fórmula infantil, productos lácteos, bebidas y suplementos dietéticos. Ver la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2.

Grupo alimentario	**Categoría del grupo alimentario**
Fórmulas infantiles para bebés a término y alimentos para bebés.	Formula infantil
	Bebidas sustitutivas de comidas infantiles
	Jugo de bebé
	Bebidas de yogurt para bebés
	Postre de bebé
	Merienda de bebé
Productos lácteos	Yogurt
	Postres lácteos congelados

Bebidas lácteas	Leche
	Bebidas de leche
	Jarabe aromatizante para leche
	Bebidas sustitutivas de comidas
	Sustitutos de la leche
Bebidas de frutas y bebidas refrescantes	Bebidas de frutas (fortificadas con vitaminas/minerales) y bebidas energéticas.
	Agua de gimnasio y bebidas refrescantes
Preparaciones de frutas	Relleno de tarta de frutas
	Preparación de frutas
	Una gelatina o mermelada

Cualquiera de las proteínas rBHT descritas anteriormente puede administrarse en forma de una composición, es decir, con uno o más componentes adicionales tales como un portador, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Por ejemplo, una composición puede comprender una proteína rBHT soluble como se describe en el presente documento más un tampón, un antioxidante como el ácido ascórbico, un polipéptido de bajo peso molecular (como los que tienen menos de 10 aminoácidos), una proteína, aminoácidos, carbohidratos tales como glucosa, sacarosa o dextrina, agentes quelantes como EDTA, glutatión y/u otros estabilizantes, excipientes y/o conservantes. La composición puede formularse como un líquido o un polvo liofilizado. Otros ejemplos de componentes que pueden emplearse en formulaciones farmacéuticas se presentan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1980).

Las composiciones que comprenden las moléculas terapéuticas descritas anteriormente se pueden administrar por cualquier método apropiado que incluye, entre otros, la administración parenteral, tópica, oral, nasal, vaginal, rectal o pulmonar (por inhalación). Si se inyecta, la(s) composición(es) pueden administrarse por vía intraarticular, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea mediante inyección en bolo o infusión continua. Se contempla la administración localizada, es decir, en el sitio de la enfermedad, así como el suministro transdérmico y la liberación sostenida por implantes, parches cutáneos o supositorios. La administración por inhalación incluye, por ejemplo, la inhalación nasal u oral, el uso de un nebulizador, la inhalación en forma de aerosol y similares. La administración a través de un supositorio insertado en una cavidad corporal se puede lograr, por ejemplo, insertando una forma sólida de la composición en una cavidad corporal elegida y permitiendo que se disuelva. Otras alternativas incluyen gotas para los ojos, preparaciones orales como pastillas, comprimidos, jarabes y goma de mascar, y preparaciones tópicas como lociones, geles, aerosoles y ungüentos. En la mayoría de los casos, las moléculas terapéuticas que son polipéptidos se pueden administrar por vía tópica o por inyección o inhalación.

Las moléculas terapéuticas descritas anteriormente se pueden administrar a cualquier dosis, frecuencia y duración que puedan ser efectivas para tratar la afección presente. La dosificación depende de la naturaleza molecular de la molécula terapéutica y de la naturaleza de la enfermedad que se está tratando. El tratamiento puede continuar por un periodo tan largo como sea necesario hasta lograr los resultados esperados. La periodicidad del tratamiento puede o no ser constante a lo largo de la duración del tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento puede realizarse inicialmente a intervalos semanales y luego cada dos semanas. La invención abarca los tratamientos que tienen una duración de días, semanas, meses o años. El tratamiento puede suspenderse y luego reiniciarse.

Se pueden administrar dosis de mantenimiento después de un tratamiento inicial. La dosis puede medirse como miligramos por kilogramo de peso corporal (mg/kg) o como miligramos por metro cuadrado de superficie de la piel (mg/m^2) o como una dosis fija, independientemente de la altura o el peso. Estas son unidades de dosificación estándar en la técnica. El área de la superficie de la piel de una persona se calcula a partir de su altura y peso utilizando una fórmula estándar. Por ejemplo, una proteína rBHT terapéutica puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0.05 mg kg a aproximadamente 10 mg/kg, o de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 1.0 mg kg. Alternativamente, se puede administrar una dosis de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg. O una dosis de aproximadamente 5 mg, 10 mg. 15 mg 20 mg, 25 mg, 30 mg. 35 mg, 40, mg, 45, mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 100 mg, 200 mg o 300 mg se pueden administrar.

Los artículos “un” y “una” se usan en la presente descripción para referirse a uno o más de uno (es decir, para al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A manera de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

A través de esta descripción la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entiende que implica la inclusión de un elemento declarado, entero o por etapas, o un grupo de elementos, enteros o por etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento, entero o por etapa, o grupo de elementos, enteros o por etapas. La

presente invención puede adecuadamente "comprender", "consistir en', o "consistir esencialmente en', los pasos, elementos y/o reactivos descritos en las reivindicaciones.

Los siguientes ejemplos son solamente para ilustrar adicionalmente la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención que se define por las reivindicaciones.

6. EJEMPLOS

6.1. Materiales y Métodos

Diseño de un gen de codon β-hexosil-transferasa optimizado. La secuencia de codificación de ADN para *el gen de la β-hexosil-transferasa* de S. singularis (16) (número de acceso de GenBank AB126324; 1.782 pb) se ensambló uniendo exones usando el software Clone Manager (Cary, NC). La secuencia de codificación se rediseñó en función de los codones preferidos de*P. pastoris* y *E. coli*, optimizados para la energía libre mínima (-619.9), los sitios de restricción específicos (5 'NcoI y 3' NotI) y el contenido de GC (48.89%). Esta versión rediseñada del gen se rotuló como*rBht* (Número de acceso de GenBank JF29828), se sintetizó y se insertó en pGS21a y pUC57 para generar pJB100 y pJB107, respectivamente (Tabla 1). La secuencia de ADN de *rBht*fue confirmada (GenScript, Piscataway, NJ).

Construcción de plásmidos que contienen *rBht* para expresarse en *E. coli.* Los procedimientos de clonación se llevaron a cabo como se describió previamente (32). *Las cepas de E. coli* utilizadas para la clonación y la expresión de rBHT se enumeran en la Tabla 3. Las endonucleasas de restricción y la ADN ligasa T4 se obtuvieron de New England Biolabs (Beverly, MA). Los plásmidos pJB100 y pJB107 se digirieron con NcoI y NotI, y el fragmento que contenía el gen *de la rBht* se insertó en los plásmidos Novagen para generar los plásmidos de expresión pJB101, pJB103, pJB104, pJB105 y pJB106 (consulte la Tabla 3 para obtener una descripción de las construcciones).

Expresión de construcciones de fusión de rBHT en BLR de*E. coli*. La expresión se llevó a cabo como se describe en el manual del sistema pET TB055 8th Edición 02/99 (Novagen). Brevemente, los plásmidos de expresión se transformaron en *BLR de E. coli* y después de la inducción de IPTG seleccionaron la actividad de rBHT. *La actividad de rBHT* se evaluó in vivoincubando células BLR inducidas por IPTG en tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 4 y pH 6, y 50 $\mu g.ml^{-1}$ sustrato cromogénico penetrante celular X-GAL (Tabla 4). Los cultivos se incubaron durante la noche a 37°C para visualizar la apariencia del color. Las células BL21 que contienen actividad endógena de β-galactosidasa se usaron como control positivo.

Producción de anti-rBHT. El antisuero anti-rBHT se produjo usando rBHT-6XHIS expresado y purificado en células BLR de *E. coli* que contienen pJB101. La purificación de rBHT-6XHIS presente en la fracción de extracto libre de células se realizó mediante cromatografía en gel de níquel agarosa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QIAGEN, Alemania) y luego se purificó adicionalmente por electro-elución de geles de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, Richmond, CA). La proteína pura se usó para la inmunización de conejos (Cocalico Biologics Reamstown, PA). Los anticuerpos adicionales utilizados en el estudio se enumeran en la Tabla 4.

Electroforesis e inmunotransferencia. La electroforesis en gel de poliacrilamina de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE-4-12%) se llevó a cabo rutinariamente en el sistema Laemmli (23). Las proteínas se visualizaron por azul Coomassie (Bio-Rad, Richmond, CA) o tinción de plata (Bio-Rad, Richmond, CA). Se usó SeeBlue plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) como marcador de masa molecular. El análisis de inmunotransferencia en geles PAGE duplicados se llevó a cabo como se describió anteriormente (7), excepto que la detección se realizó utilizando anticuerpos anti-conejo o cabra conjugados con fosfatasa alcalina (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) y se visualizó usando NBT (tetrazolio nitro-azul cloruro) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato sal p-toluidina) solución premezclada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Construcción de una cepa recombinante de*P. pastoris.* El *gen rBht* se amplificó por PCR a partir de pJB107 usando los cebadores JBB1 y JBB2 para agregar los sitios de restricción XhoI y NotI en el marco con *la secuencia de señal del factor de apareamiento pre-pro-alfa de Saccharomyces cerevisiae* contenida en pPIC9, seguida de un marcador 6XHIS y un sitio de escisión de proteasa de TEV modificado (Tabla 2). El producto de PCR se ligó a los sitios de restricción de pPIC9 XhoI y NotI para generar pJB108 (Tabla 3). La ligazón correcta dentro del marco se confirmó mediante secuenciación (Sequatech, Mountain View, CA) utilizando los cebadores 5 'AOX1 y 3' AOX1 (Tabla 4).

La cepa GS115 de P. pastoris (Tabla 1) se electro-transformó con pJB108 linealizado con SacI (Invitrogen's *Pichia*manual del kit de expresión, versión M) utilizando un generador de impulsos Bio-Rad (Bio-Rad, Richmond, CA). Los recombinantes se seleccionaron en Dextrosa de Regeneración deficiente en histidina (placas de agar RDB) a 30°C. Se seleccionó al azar colonias His^+, y la integración genómica del casete de expresión se verificó por PCR utilizando los cebadores 5 'AOX1, 3' AOX1 y Factor-α (Tabla 4). La utilización de metanol (mut^+) del fenotipo de GS115/*rBht* recombinante se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito en Invitrogen's *Pichia* manual del kit de expresión, versión M.

Producción de rBHT en *P. pastoris.* Para seleccionar un productor de alto nivel de la rBHT recombinante, seis aislamientos His^+ se cultivaron en medio de extracto de levadura peptona dextrosa (YPD) a 30°C y 250 rpm durante 12 h y luego se usaron para inocular 100 ml de medio complejo de glicerol tamponado (BMGY) en una $OD_{600\ inicial}$= 0.1. Cuando el cultivo excedió una OD_{600}= 10, se agregó metanol a una concentración final de 0.5% a intervalos de 24 h hasta que el cultivo

excedió una OD_{600}= 50 después de lo cual se añadió metanol cada 12 h. Las muestras de los medios se analizaron para detectar la presencia de la actividad BHT y mediante Western blot usando un anti-rBHT de conejo cada 24 h para determinar el tiempo óptimo de producción. El recombinante GS115/*rBht* seleccionado se cultivó diariamente en 0.5 L de BMGY y se indujo con metanol durante 6 días.

Purificación de la rBHT secretada. Los sobrenadantes del cultivo (500 ml) se fraccionaron con sulfato de amonio. Los precipitados entre 60%-80% de sulfato de amonio se resuspendieron en 50 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 6). Después de eliminar la sal y concentrar con una membrana Amicon MWCO 15 (Amicon Inc., Beverly, MA), la solución se aplicó a una columna preequilibrada Mono Q 1/30 (5 ml) (amino etil cuaternario) (Amersham Biosciences). Luego se lavó la columna con 50 ml de tampón y se eluyó con 3 volúmenes de columna de un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0 a 0.2 M en 50 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 6.0) a una velocidad de flujo de 1 $ml.min^{-1}$. El eluato se recogió en porciones de 1 ml. Las fracciones activas se agruparon, se concentraron y se resuspendieron en 10 mM de fosfato de sodio (pH 6.8), luego se aplicaron a una columna de hidroxiapatita Bio-Gel HT (Bio-Rad, Richmond, CA) (1/10 2 ml) pre-equilibrada con el mismo tampón, se lavaron con 10 mM de fosfato de sodio (pH 6.8) y se eluyeron con 50 mM de fosfato de sodio (pH 6.8). Las fracciones con mayor actividad específica contenían rBHT puro con actividad específica de 8.2 $U.mg^{-1}$. La actividad enzimática se ensayó (se describe a continuación) en todas las fracciones de cromatografía y los pasos de purificación se realizaron a 25°C.

Determinación de la masa molecular. Se aplicó un medio de cultivo concentrado 20 veces por ultrafiltración (0.5 ml) a una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 (Amersham Biosciences) 1/30 (18 ml) preequilibrada con 50 mM de tampón de fosfato de sodio, pH 6.0, NaCl 0.1 M . Se colectaron fracciones de 0.5 ml a una velocidad de flujo de 0,5 $ml.min^{-1}$ y se analizó la actividad de rBHT usando ONP-Glu como sustrato y mediante zimograma como se describe a continuación. La elución de rBHT y los patrones de masa molecular se monitorearon a 280 nm. La columna se calibró utilizando las siguientes moléculas: Tiroglobulina, 669 kDa; Ferritina, 440 kDa; Catalasa, 232 kDa; Lactato deshidrogenasa, 140 kDa; Albúmina de suero bovino; 67 kDa (GE, Salud). La masa molecular de rBHT se extrapoló de un gráfico de calibración de masa molecular logarítmica (eje Y) versus volumen de elución (eje X). Todos los pasos cromatográficos se realizaron a 25°C.

Ensayos de actividad enzimática. La velocidad de reacción inicial de rBHT se midió mediante una modificación del método de Kuby (13,22) en las condiciones establecidas. Brevemente, las reacciones se realizaron en un volumen de 250 µl que contenía 1.3 mM de ONP-Glu y 50 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 5). Los ensayos se realizaron durante 10 minutos en las condiciones establecidas y se detuvieron agregando 1 volumen de 0.25 M de Na_2CO_3. La mezcla de reacción que contenía la rBHT hervida y el sustrato sirvió como control negativo. Los ensayos siempre se realizaron por duplicado con una confiabilidad de ±5%. Se obtuvieron muestras de cultivo libre de células y concentrados de proteínas como se describió anteriormente. Las células en reposo (que contienen la rBHT unida a la membrana) previamente lavadas con 50 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 5.0) se analizaron, bajo condiciones establecidas. Cuando X-GAL fue el sustrato de la reacción, la concentración fue de 50 $\mu g.ml^{-1}$en 50 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 4).

Una unidad (U) de actividad enzimática equivale a 1 µmol de o-nitrofenol liberado por minuto en las condiciones del ensayo. La actividad específica se define como Unidades/mg de proteína. Los coeficientes de extinción molar de *o*-nitrofenol fueron: ε=0.033 $mM^{-1}cm^{-1}$pH 4; ε=0.036 $mM^{-1}cm^{-1}$pH 5; ε=0.038 $mM^{-1}cm^{-1}$, pH 6. La cantidad de o-nitrofenol liberado se extrapoló de un gráfico de calibración de la absorbancia de*o*-nitrofenol a 405 nm (eje Y) *versus* la concentración de o-nitrofenol (eje X).

Las actividades enzimáticas también se visualizaron mediante zimogramas. El PAGE nativo se realizó usando una modificación del protocolo descrito por Gallagher (8). Las proteínas de *E. coli* lisadas o *los sobrenadantes de P. pastoris* se solubilizaron en sacarosa al 5% (p/v)/10 $\mu g.ml^{-1}$ de azul de bromofenol y se separaron en geles de poliacrilamida nativos al 6%, usando como tampón de corrida 50 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 6). El gel se mantuvo frío en un aparato de electroforesis Mighty Small Hoefer donde se recirculó agua fría durante la electroforesis a 60 mA durante 5 h. Después de la electroforesis, el gel se enjuagó dos veces en tampón de lavado (50 mM de tampón de fosfato de sodio, pH 4.0) durante 10 min. Los zimogramas se desarrollaron durante 24 h colocando papel de filtro empapado en tampón de lavado que contenía 50 $\mu g.ml.^{-1}$ X-GAL a 20°C. Un precipitado azul definió la ubicación de la enzima.

Cinética de las enzimas. Se analizó una serie de diluciones enzimáticas que iban de 0 a 1.2 $U.ml^{-1}$ en 50 mM de fosfato de sodio (pH 5) a 42 ° C. El ensayo de actividad enzimática se inició mediante la adición de 1,3 mM de ONP-Glu y se monitoreó la absorbancia a 405 nm durante intervalos de 1 min en un total de 20 minutos. Los valores experimentales de absorbancia se representaron en función del tiempo mostrando una proporcionalidad lineal de hasta 0.6 $U.ml^{-1}$ durante al menos 20 min, mientras que a concentraciones de enzimas superiores a 1.0 $U.ml^{-1}$ los valores de absorbancia se estabilizaron antes de 5 min.

Las constantes de Michaelis-Menten (k_{metro} y V_{max}) de 0.2 $U.ml^{-1}$de rBHT (a 42°C) se determinaron variando la ONP-Glu de 0 a 10.4 mM en 50 mM de fosfato de sodio (pH 5) y midiendo la velocidad de reacción inicial a 20°C, 30°C, 40°C y 50°C. Las constantes cinéticas a cada temperatura se determinaron con OriginPro 7.5 usando una regresión no lineal de la ecuación de Hill con un coeficiente de Hill de 1. Los valores obtenidos en las condiciones establecidas fueron los siguientes (T, k_m, V_{max}): (20°C, 0.37 mM, 0.09 $mM.min^{-1}$), (30°C, 0.48 mM, 0.12 $mM.min^{-1}$), (40°C, 0.71 mM, 0.23 mM.min-

^{1}) and (50°C, 1.3 mM, 0.42 mM.min^{-1}). Los coeficientes de regresión adecuados (R^2) fueron 0.9869, 0.99065, 0.99115 y 0.98996 a 20°C, 30°C, 40°C y 50°C, respectivamente.

Caracterización de la rBHT. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron en las condiciones establecidas descritas anteriormente. La influencia del pH en la actividad enzimática se probó en soluciones tampón que incluyeron 50 mM de fosfato de sodio (pH 5.0 a 11.0), 50 mM de citrato (pH 2.0 a 5.0) y 50 mM de fosfato-citrato (pH 2 a 11) (Fig. 2A). La inhibición competitiva de los monosacáridos (glucosa y galactosa) se examinó variando sus concentraciones en la mezcla de la reacción (Fig. 2C). La temperatura y la termoestabilidad se determinaron midiendo la actividad residual a 20, 30, 40, 50, 60, 70 u 80°C (Figs. 2B y 2D). De manera similar, se usaron ensayos de actividad enzimática para evaluar aditivos como inhibidores/activadores potenciales. Se probaron los siguientes aditivos de hasta 10 mM: agente quelante (EDTA), agentes reductores (ditiotreitol (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME) y cobre (Cu^{2+})) e iones (cationes monovalentes; NH_4^+, Cs^+, K^+, Na^+, Li^+, and Rb^+; cationes divalentes; Ba^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, and Zn^{2+}; catión trivalente Ag^{3+}). Se probaron los metales pesados ($Co^{2+}Fe^{2+}$y Zn^{2+}) en 50 mM de tampón de citrato (pH 5.0) para evitar la precipitación. Además, los tensoactivos añadidos a la mezcla de reacción al 1% (v/v) fueron: TritonX-100, Tween 20, Tween 80 y Dodecil Sulfato de Sodio (SDS). Los solventes probados al 10% v/v incluyeron: etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, PEG400 y glicerol.

Producción y análisis de los GOS. Las reacciones de transgalactosilación estándares, utilizando la rBHT purificada o *las células en reposo de P. pastoris* (que contienen la enzima unida a la membrana) se iniciaron agregando cantidades estandarizadas de enzima (0.5 Ug^{-1} de lactosa) en 5 mM de tampón fosfato de sodio (pH 5.0) que contiene lactosa (22 gL^{-1} o 200 gL^{-1}) a 30°C o 42°C.

Los productos y sustratos de las reacciones se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) en condiciones isocráticas a 65°C y a una velocidad de flujo de 0,4 ml.min^{-1}. La fase móvil fue 5 mM de ácido sulfúrico (H_2SO_4) usando una columna de ácidos orgánicos Alltech IOA-1000 (300 mm por 7.8 mm) (Alltech, IL) acoplada a un detector de índice de refracción. La columna se calibró usando; galactosil-lactosa (Carbosynth (Berkshire, Reino Unido)), lactosa, glucosa y galactosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las especies residuales de GOS no cuantificadas (tetrasacárido y pentasacárido) se informaron como lecturas de intensidad de señal del detector de índice de refracción.

6.2. Resultados

Expresión de una β-hexosil-transferasa recombinante (rBHT) en*E. coli. La cepa BL21 de E. coli* es el hospedero más utilizado para la producción de proteínas heterólogas. Desafortunadamente, esta cepa hospedera contiene una β-galactosidasa endógena activa que interfiere con la evaluación de la β-hexosil-transferasa, designada como rBHT (ver materiales y métodos). Después de seleccionar diferentes cepas de*E. coli* apropiadas para sistemas de expresión basados en pET, incluidos BL21, BLR, NovaBlue, Origami y Rosetta (Tabla 3), *la BLR de E. coli* se confirmó que carecía de actividad β-galactosidasa endógena. *Se usó la cepa CC118 (ΔlacZ) de E. coli* como control (36).

El gen de*rBht* se insertó en plásmidos de expresión pET que contenían un 6XHIS C-terminal o uno de los cuatro asociados de coexpresión que aumentan la solubilidad (glutatión-S-transferasa (GST), tiorredoxina (Trx), el líder de PelB y DsbA) dando como resultado pJB101, pJB103, pJB104, pJB105 y pJB106 (Tabla 3). La transformación en *la cepa BLR de E. coli* y la inducción con IPTG dieron como resultado la expresión de rBHT inactiva en células enteras o en extractos libres de células. El análisis por inmunotransferencia de las proteínas de fusión con antisueros rBHT detectó todas las proteínas de fusión de rBHT y sus masas moleculares predichas, con la mayor reactividad observada en las fracciones insolubles. Para descartar la posible insolubilidad de la proteína dependiente del hospedero, se analizó la expresión de rBHT en la cepa CC118 de *E. coli* que contenía pJB102 (pJB101 con su promotor T7 reemplazado por un promotor inducible por tetraciclina (TET)), pero también demostró no tener éxito (datos no mostrados).

Expresión y purificación de rBHT de *P. pastoris. P. pastoris* es capaz de introducir modificaciones postraduccionales y se conoce por su capacidad para producir una serie de proteínas recombinantes activas (aspecto del que *E. coli* carece) (14). Por lo tanto, se insertó el codón optimizado *del gen de rBht* en pPIC9 bajo el control del promotor alcohol oxidasa (AOX1), en el marco con la señal del factor α de*S. cerevisiae* (secuencia para la secreción de proteínas) y un 6XHIS N-terminal seguido de un sitio de escisión de proteasa TEV (pJB108, Tabla 3). *La cepa GS115 de P. pastoris* se transformó con pJB108 (GS115/*rBht*) y la actividad de rBHT se evaluó en seis recombinantes GS115 /*rBht*. La cepa recombinante que secretó la mayor concentración de proteína bioactiva se estudió con mayor profundidad. Los zimogramas confirmaron la presencia de una rBHT activa: sólo GS115/*rBht* dio una señal positiva, mientras que los extractos celulares de la cepa BLR de*E. coli* que contenían pJB101 y los sobrenadantes de cultivo de GS115 no transformado fueron negativos (Fig. 1C). Como se esperaba, las regiones transmembrana de proteínas en BHT también resultaron en células GS115/*rBht* que mostraron actividad de rBHT asociada a la superficie celular, emulando la ubicación de BHT nativo en *S. singularis* (15,16).

Se intentó la purificación de rBHT usando la cromatografía de afinidad del níquel, pero el marcador HIS no estaba presente, ni se detectó la proteína mediante Inmunotranferencia de proteínas usando antisueros anti-HIS, lo que indica un posible procesamiento de la secuencia de señal N-terminal en los sitios de escisión predichos (16). Posteriormente, se purificó la enzima rBHT (actividad específica de 8.2 U.mg^{-1} a 20°C) usando Mono Q y cromatografía de hidroxiapatita (Tabla 5).

6.3. Caracterización de la rBHT expresada en *P. pastoris.*

1. Masa molecular aparente de rBHT. La masa molecular estimada para una rBHT completamente procesada no glicosilada que incluía el marcador de sitio de proteasa 6XHIS y TEV fue de 68 kDa. La enzima se purificó previamente como un dímero y como un monómero, con una masa molecular aparente que varía de 53 a 146 kDa, datos que reflejan variaciones en la glicosilación de proteínas (Tabla 5) (1,16). Aquí, la actividad enzimática eluyó como un pico monomérico con una masa molecular experimental aparente de 110 kDa. Nosotros suponemos que la forma dimérica podría predominar dentro del intervalo ácido del pH óptimo de la enzima nativa (3.7 a 6) (Tabla 5). Sin embargo, las fracciones de la columna Superdex 200 a pH 4.0 describieron el mismo perfil, confirmando la forma monomérica estable de la enzima recombinante. No se detectaron agregados de mayor masa molecular mediante el ensayo de actividad enzimática, el zimograma o el Western blot La purificación de las fracciones de la columna y el análisis de inmunotransferencia usando anti-rBHT verificaron que la enzima migró como una banda única con una masa molecular aparente de 110 kDa (Figs. 1A y 1B).

2. Especificidad de sustrato. El ONP-Gal se usa tradicionalmente como sustrato para β-galactosidasas y los sustratos ONP-Gal, PNP-Gal y PNP-Glu se usan en estudios previos para la detección de la actividad de BHT nativa (Tabla 5). Las actividades enzimáticas de rBHT (0.2 $U.ml^{-1}$) se compararon entre los sustratos anteriores en las mismas condiciones experimentales. La enzima recombinante fue igualmente activa en respuesta a ONP-Glu y PNP-Glu. Los sustratos con una galactosa en la porción glicón se hidrolizaron a una velocidad de aproximadamente 41% (ONP-Gal) y 23% (PNP-Gal) de esta para ONP-Glu. Estos resultados indican que la rBHT tiene una especificidad limitada con respecto al azúcar y más flexibilidad hacia la configuración de la posición de enlace de carbono en C2 y C4 cuando se usan derivados de azúcar de glucosa como sustratos.

*3. PH óptimo, temperatura y termoestabilidad de rBHT.*La rBHT estuvo activa dentro de un amplio intervalo de pH (de pH 3.5 a 6) mostrando los valores más altos a pH 4.0 (Fig. 2A). El perfil de actividad enzimática mostró un fuerte descenso a menos del 50% de la actividad enzimática máxima a valores de pH superiores a 7 o inferiores a 3.5. Estos resultados fueron consistentes con el pH óptimo informado (1) (ver referencias de la Tabla 5); lo que sugiere que las condiciones alcalinas pueden tener un efecto perjudicial sobre la actividad enzimática y la estabilidad.

La velocidad de reacción inicial medida a diferentes temperaturas que iban de 20°C a 80°C indicó que la enzima estaba activa en un intervalo de temperatura de 20°C a 50°C, con un intervalo óptimo entre 40°C y 50°C (Fig. 2B). A temperaturas inferiores a 30°C se observa una reducción del 50% en la velocidad de reacción inicial y las temperaturas superiores a 50°C inactivan de forma rápida e irreversible la enzima. La temperatura óptima al maximizar la velocidad de reacción enzimática también se puede obtener del valor más alto de V_{max}/ K_m (33). La V_{max} aumentó a una velocidad más rápida que K_m a temperaturas entre 20°C y 40°C, en consecuencia los valores de V_{max}/ K_m (0.242 min^{-1}, 20°C; 0.255 min^{-1}, 30°C; 0,324 min^{-1}, 40°C; 0.322 min^{-1}, 50°C) aumentaron en este intervalo y fueron constantes a temperaturas entre 40°C y 50°C. Por lo tanto, la temperatura óptima determinada por V_{max}/ K_m estaba dentro de 40°C-50°C, lo que confirmó los valores óptimos establecidos usando los valores de la velocidad de reacción inicial a cada temperatura.

Como se muestra en la Fig. 2D, la termoestabilidad de la rBHT se evaluó de 20°C a 50°C. A 20°C y 30°C, la enzima conservó al menos el 90% de la actividad original durante 6 días, lo que confirmó los resultados informados previamente para la enzima nativa (4). Cinco lotes independientes de rBHT almacenados durante 6 meses a 4°C conservaron el 95% de la actividad inicial (datos no mostrados). Aunque la temperatura óptima se encontró en el intervalo de 40°C a 50°C, la incubación a temperaturas superiores a 40°C fue perjudicial para rBHT. A 40°C, la enzima conservó el 70% de la actividad inicial a las 12 h y este nivel de actividad solo persistió durante 36 h adicionales. En contraste, la actividad enzimática disminuyó bruscamente a 50°C dentro de las primeras 12 h de incubación.

4. Efecto de metales, sales, tensoactivos y solventes sobre la actividad de rBHT. La inhibición/activación enzimática se probó dentro de un amplio intervalo de aditivos. La rBHT no exhibió un requerimiento para ninguno de los iones probados (NH_4^+, Ba^{2+}, Ca^{2+}, Cs^+Co^{2+}, Cu^{2+}, Li^+, Rb^+, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Na^+ y Zn^{2+}) a pesar de que el magnesio aumenta dramáticamente la actividad enzimática de algunas β-galactosidasas (26). Además, la enzima recombinante era completamente activa en presencia de 1 y 5 mM del agente quelante de iones EDTA, lo que confirma los hallazgos anteriores y un informe anterior (1). Además, los compuestos probados para romper puentes disulfuro, como Cu^{2+} y los agentes reductores ditiotreitol (DTT) y 2-mercaptoetanol (2ME) (1,18,19), no tuvieron consecuencias negativas sobre la actividad. Los solventes metanol, etanol, acetona y acetonitrilo solo inhiben parcialmente la enzima (conservando una actividad relativa del 66%-81%). En contraste, la adición de 10% de glicerol o 1% de SDS (un tensoactivo no iónico) inhibió casi por completo la enzima.

Síntesis de GOS utilizando la rBHT purificada. Una vez que se caracterizó la enzima, se analizó la rBHT secretada para determinar la biotransformación de lactosa al 2% en los GOS. Las condiciones de la reacción fueron 0.5 U $rBHT.g^{-1}$ de lactosa a 42°C en 5 mM tampón de fosfato de sodio (pH 5.0). La Figura 3 muestra el consumo de lactosa y la acumulación de los GOS a lo largo del tiempo. La mayor velocidad de producción se observó durante las primeras 12 h y la galactosil-lactosa y la glucosa fueron los principales productos. No se detectó galactosa, lo que indica que se estaba incorporando completamente en la reacción de transgalactosilación para formar los GOS. Después de 30 h, 4.2 gL^{-1} de glucosa se había acumulado y la utilización de lactosa (54%) estaba en su máximo. Además, en este momento, 7.8 gL^{-1} del trisacárido

se había acumulado alcanzando un promedio de conversión del 67% de la lactosa utilizada. A medida que avanzaba la reacción, la galactosa comenzó a liberarse de la reacción enzimática y a acumularse en concentraciones traza. Dado que la inhibición competitiva de la enzima podría reducir la eficiencia de la biotransformación de la lactosa, examinamos el efecto de concentraciones variables de glucosa o galactosa en la actividad enzimática en la mezcla de reacción. La presencia de 5 $g.L^{-1}$ de glucosa redujo la actividad de rBHT hasta en un 90%, mientras que la actividad enzimática no se vio afectada por hasta 70 $g.L^{-1}$ de galactosa, en las condiciones establecidas (Fig. 2C).

Síntesis de los GOS por células en reposo de*P. pastoris* (que contienen la rBHT unida a la membrana). Para evitar la inhibición competitiva y confirmar que la conversión de lactosa en los GOS podría mejorarse si la glucosa se elimina simultáneamente de la mezcla de reacción, evaluamos la biotransformación del 20% e l lactosa por las células en reposo del recombinante GS115/*rBht de*P. pastoris*. Los GS115 /*rBht *de P. pastoris* que contenía la rBHT unida a membrana se normalizaron a una densidad celular que contenía 0.5 U $rBHT.g^{-1}$ de lactosa en 5 mM de tampón fosfato de sodio (pH 5). Las reacciones se realizaron durante 10 días a 30°C, la temperatura óptima para el crecimiento de *P. pastoris,* y a 42°C, la temperatura para la cual la velocidad de reacción inicial es máxima para la rBHT secretada. Como se esperaba, el 90% de la lactosa inicial se convirtió en GOS sin productos secundarios a 30°C, en comparación con el 51% de utilización de lactosa a 42°C. Los resultados indicaron que las células en reposo eran fisiológicamente activas y capaces de consumir el subproducto de glucosa de la reacción, evitando así la inhibición competitiva. Sin embargo, la velocidad de reacción inicial de la formación de los GOS a 42°C fue el doble de la velocidad a 30°C durante las primeras 48 h. Se alcanzó una concentración final de 80 $g.L^{-1}$ de galactosil-lactosa, que corresponde a una productividad de 1.6 $g.L^{-1}.h^{-1}$ a 42°C (Fig. 4A). A 30°C cuando la utilización de lactosa fue del 63%, la concentración de galactosil-lactosa fue de 100 $g.L^{-1}$ y se alcanzó una productividad de 0.8 $g.L^{-1}.h^{-1}$ después de 5 días (Fig. 4B).

6.4. Discusión

En este estudio, optimizamos la secuencia de ADN del gen de la β-hexosil-transferasa de *S. singularis* (número de acc. AB126324) para la expresión en *E. coli* y *P. pastoris.* El gen de la rBht *resultante* se generó sintéticamente (número de acc. JF29828) y se expresó en *E. coli.* Sin embargo, este hospedero bacteriano carece de la capacidad de incorporar modificaciones postraduccionales esenciales para producir una rBHT soluble y activa como se observó anteriormente (16). Posteriormente, el gen de *rBht* bajo el control del*promotor AOX1* se integró con éxito en el cromosoma de*P. pastoris*, lo que resultó en la expresión de una enzima completamente activa que se detectó en el caldo de cultivo y se asoció con la superficie celular. La secreción de rBHT por la cepa GS115 de *P. pastoris* nos permitió evitar los procesos complejos de purificación que se requieren para obtener BHT puro de *S. singularis.* Además, ya que *P. pastoris* secreta naturalmente solo niveles muy bajos de proteínas nativas, la recuperación de la rBHT extracelular fue tan simple como la eliminación de células enteras del medio por centrifugación o filtración (5).

La masa molecular de la enzima recombinante correspondía a un único polipéptido catalíticamente activo de 110 kDa y no se detectaron polipéptidos más pequeños o agregados de la rBHT. Las modificaciones postraduccionales juegan un papel crítico en el plegamiento de proteínas, la estabilidad estructural, la formación de oligómeros y el reconocimiento del sustrato (17,24), por lo que no fue sorprendente que la masa molecular fuera mayor que la proteína de 68 kDa expresada en *E. coli* y predicha por la secuencia de aminoácidos. La glicosilación postraduccional de la BHT nativa por *S. singularis* se ha informado previamente, y se observó un cambio en la masa molecular de la proteína purificada de 73.9 a 66.3 kDa después del tratamiento con quitinasa y EndoHf (16). La futura mutagénesis de los sitios de glicosilación predichos debería ayudar a determinar si la glicosilación es también la causa del cambio en la masa molecular de la rBHT.

Los datos informados aquí son parte de un estudio más amplio que comparó la utilización de la rBHT con datos documentados para la BHT nativa de *S. singularis* (Tabla 5). Nuestro estudio confirmó que la enzima recombinante no requiere cofactores o agentes reductores con frecuencia esenciales para los β-galactósidos. La enzima mostró una mejor termoestabilidad a temperaturas más bajas (por debajo de 40°C) y actividades óptimas a temperaturas de 40°C a 50°C y un pH de 3.5 a 6. Además, la enzima se controló mediante la inhibición de la glucosa, aunque la rBHT no era sensible a la galactosa o al Ag^{3+} como se informó anteriormente para la BHT nativo (4,16,25,35).

La utilización de lactosa y su concentración inicial son dos factores claves que contribuyen a maximizar la acumulación final de GOS. Aquí demostramos un proceso con una utilización mejorada de lactosa (90%) que emplea células en reposo fisiológicamente activas de *GS115/rBht*de P. pastoris*.* En estas condiciones, las células consumen glucosa residual a 30°C, evitando la inhibición de la glucosa y asegurando una mejora significativa del proceso y un mayor grado final de pureza prebiótica (Fig. 4B). Por el contrario, se informó que las temperaturas superiores a 25°C impiden el consumo de glucosa residual por las células en reposo de *S. singularis* que contienen BHT nativa unida a la membrana, lo que a su vez limita la concentración final de GOS y la pureza (revisado por Gosling *y otros* (11)).

Las células en reposo deGS115/*rBht* incubadas a 42°C solo convirtieron el 51% de la lactosa inicial en galactosil-lactosa y glucosa residual (Fig. 4A). Estos datos tenían semejanza con la formación de galactosil-lactosa por la rBHT secretada en las mismas condiciones (Fig. 3). Además, los valores de conversión y utilización se compararon con los procesos informados previamente por *S. singularis* (Tabla 5). Se han informado valores de utilización de lactosa típicos entre el 30% y el 40% de la lactosa inicial (11), y un estudio informó la utilización de lactosa al 50% utilizando 10.8 veces más enzima por gramo de lactosa en comparación con la rBHT secretada (Tabla 5) (4).

El descubrimiento de la síntesis de GOS por *S. singularis* a mediados del siglo[20] ha alentado la exploración de β-galactosidasas superiores que producen GOS más eficientemente (9,10,37). Sin embargo, las enzimas estudiadas mostraron valores de utilización de lactosa más bajos y concentraciones finales más altas de subproductos no deseados en comparación con la BHT de *S. singularis* (1,4,12,16,27,34,35). Sin embargo, los avances en la utilización industrial de la BHT de*S. singularis* ha sido más lento de lo deseado debido a los procesos desafiantes de purificación de varios pasos necesarios para obtener BHT nativa pura (1,4,16). La rBHT bioactiva secretada o como enzima unida a la membrana de *P. pastoris* significa una clara ventaja del proceso para producir GOS. Los estudios futuros explorarán estrategias de modificación de proteínas para mejorar el rendimiento de expresión de proteínas, la estabilidad y la actividad enzimática.

La Tabla 6 a continuación resume las construcciones que se prepararon en relación con esta invención. Todas las construcciones se prepararon en pPIC9 pero subsisten como integrantes cromosómicos en P. pastoris.

6.5. Galacto-oligosacáridos del suero rico en lactosa

El mercado mundial de productos lácteos fue de $299.7B en 2009, y se espera que crezca a $370.9B en 2014, un aumento del 23.8%. Global. Perfil de la industria láctea: Global. Perfil de la industria láctea: Global [serial online]. Octubre 2010:1. Disponible de: Business Source Complete, Ipswich, MA. Consultado el 24 de febrero de 2012. Global (2012) La leche y el queso representaron el 35.2% y el 28.3% del mercado, respectivamente. Se espera que el consumo mundial de queso alcance los 21 millones de toneladas en 2015. Lenoir-Wijnkoop I. & van Aalderen WM, B.G.K.D.S.A.N.MJ. Modelo de rentabilidad para una mezcla específica de prebióticos en los Países Bajos. Eur J Health Econ (2010)) El crecimiento del mercado de productos lácteos genera grandes problemas de tratamiento de residuos industriales dado el alto contenido de lactosa de la leche y los subproductos producidos durante el procesamiento de los productos lácteos. Los líquidos residuales con alto contenido de lactosa tienen una demanda biológica de oxígeno (DBO) excepcionalmente alta, lo que significa que la cantidad de oxígeno requerido para descomponer la lactosa es lo suficientemente alta como para privar a otros organismos del oxígeno necesario para la supervivencia. Por lo tanto, muchos países han promulgado leyes de protección ambiental que restringen la eliminación de fluidos que contienen lactosa directamente en cuerpos de agua. Ganzle,M.G., Haase,G. & Jelen,P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. International Dairy Journal 18, 685-694 (2008). La carga adicional para los procesos de tratamiento de aguas municipales puede ser especialmente costosa y problemática para los países y estados que dependen de una economía láctea (4-6). Affertsholt-Allen T. Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives. IDF Symposium "Lactose and its Derivatives." Moscú. (lactosa. ru /present/1Tage_Affertsholt-Allen. pdf. Consultado el 30 de septiembre de 2009) (2007); Markets and Markets U.S. Digestive Health Ingredients Market Worth $495.3 million in 2015. (www. marketsandmarkets. com/PressReleases/us-digestive-health-ingredients-market. asp) (2010); UBIC consulting. THE WORLD GALACTO-OLIGOSACCHARIDE MARKET. (www. ubic-consulting. com/template/fs/documents / Dairy-Ingredients/Galacto-Oligosaccharide-Ingredient-Market. pdf) (2010) Por ejemplo, la fabricación de queso genera dos productos: queso y suero. Por cada libra de queso hecha, se generan nueve libras de suero, creando un excedente creciente de suero (186 millones de toneladas en 2008), que contiene -5% de lactosa. Esta fracción de lactosa tiene una DBO que es aproximadamente 175 veces mayor que el efluente de aguas residuales típico, por lo tanto, los desechos no tratados no pueden eliminarse directamente en cuerpos de agua. Smithers, G.W. Whey and whey proteins. "From Glitter to Gold". International Dairy Journal 18, 695-704 (2008). La solución tradicional a este problema ha sido biorremediar los efluentes ricos en lactosa mediante la aplicación de procesos costosos para extraer la lactosa, que luego puede venderse como un producto básico a un valor máximo de $ 1.50/kg. Solo el 50% del suero de queso que se produce anualmente se recicla en productos útiles, como ingredientes alimenticios y alimentos para animales. El resto se considera desperdicio, ya sea porque no se alcanzan volúmenes críticos para permitir el reciclado económico o por el alto grado de dificultad técnica involucrado en la biotransformación. Por lo tanto, existe una necesidad estratégica de convertir la lactosa en productos comercialmente viables y de alto valor para reducir el costo total del proceso y mejorar la economía de la industria láctea de los E.U.

Aquí proponemos la biotransformación/biorremediación simultánea del producto químico lactosa mediante la aplicación de un nuevo proceso de desarrollo de productos alimenticios como la solución ideal para este problema industrial. Nosotros mejoramos un método por el cual la lactosa puede convertirse en derivados de galactosil-lactosa llamados galacto-oligosacáridos (GOS) a través de una reacción enzimática. Los GOS se clasifican como prebióticos, que estimulan el crecimiento y la actividad de las bacterias beneficiosas en el sistema digestivo, y se usan ampliamente en productos alimenticios como fórmulas infantiles, suplementos nutricionales, yogures, productos horneados y alimentos para animales. A diferencia del producto básico de lactosa, los GOS son ingredientes alimenticios altamente valorados, y el valor económico de esta transformación se demuestra fácilmente al comparar el precio actual de mercado de la lactosa a $ 1.50/kg con el precio de mercado de los GOS de $5.20-8.50/kg. Los GOS son parte de una tendencia en ingredientes de alimentos para la salud digestiva valorados en $265.9 millones en 2010 con una velocidad de crecimiento anual de 18.3% y se espera que crezca a una velocidad de crecimiento anual compuesta de 13.2% de 2010 a 2015.

Nuestro método de conversión de lactosa a GOS es muy superior a los procesos existentes porque podemos reducir el volumen total de reacción en 50 veces mediante la utilización de un hospedero eficiente para producir la enzima, aumentar el volumen y la pureza de los GOS producidos y potencialmente generar productos sin lactosa. Euromonitor. Lactose-free Foods Maintain Their Global Appeal, 1ro de Marzo de 2011. Euromonitor (2011) El mercado global de productos sin lactosa fue de $3.4B en 2009, y se espera que crezca a medida que los consumidores continúen centrándose en alimentos funcionales para la salud y el bienestar. Mientras que otros productos lácteos son extremadamente sensibles a los precios, los alimentos funcionales como los productos sin lactosa se pueden vender a un precio superior.

Al utilizar el proceso mejorado que se describe en este documento, la industria láctea y los fabricantes de suplementos alimenticios a nivel mundial y estadounidense pueden beneficiarse claramente de tres maneras: 1) creación de grandes volúmenes de GOS de calidad, un ingrediente alimentario/suplemento dietético que promueve la salud con un alto valor de mercado, 2) generación potencial simultánea de valiosos productos lácteos o leche sin lactosa, y 3) reducción efectiva del impacto ambiental a través del reciclaje de suero y los derivados de la leche.

Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas/Plásmidos	***Descripción o genotipo***	***Referencia o Fuente***
Cepas		
	F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3)	
	F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm*Δ(*srl-recA*)306::Tn*10*(Tet^R)(DE3)	
	F2 D(ara-leu)7697 araD139 Δ(lac)X74 phoAD20 galE galK thi rpsE rpoB argE(Am) recA1	
	endA1 hsdR17(r_{K12}^- m_{K12}^+) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*F'[*proA*$^+$*B*$^+$*lacI*^{q} *Z*Δ*M15*::Tn*10*](Tet^R) (DE3)	
	Δ(*ara-leu)7697* Δ*lacX74* Δ*phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL*F'[*lac*$^+$ *lacI*^{q} *pro*]*gor522*::Tn*10 trxB*(Kan^R, Str^R, Tet^R) (DE3)	
	F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm*pRARE2 (Cam^R)(DE3)	
	*recA1 endA1 gyrA*96 *thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *pro*AB *lacI*^{q}ZΔM15 Tn*10* (Tet^R)]	
	his4 (his^- mut^+)	
	GS115 *his4*:: LacZ (*E. coli* β-galactosidasa (117 kDa) intracelularmente (su^+mut^+))	
	GS115 *arg4 his4 aox1::ARG4* (his^- mut^s)	
	GS115 integrado con el plásmido pJB108 (su^+mut^+)	Este estudio
Plásmidos		
E. coli		
	pGS21a-rBHT	Este estudio
	Marcador 6XHIS C-terminal opcional, promotor T7lac, Kan^R	Novagen
	pET24d-rBHT-6XHIS	Este estudio
	pET24d-TET promotor-rBHT-6XHIS	Este estudio
	Marcador GST, promotor T7lac, Kan^R	Novagen
	pET41a-GST-rBHT	Este estudio
	Marcador Trx, promotor T7lac, Amp^R	Novagen
	pET32a-Trx-rBHT	Este estudio
	Secuencia de codificación PelB, promotor T7lac, Amp^R	Novagen
	pET22b-pelB-rBHT	Este estudio
	Secuencia de codificación DsbA●marcador™, promotor T7lac, Kan^R	Novagen
	pET39b-DsbA-rBht	Este estudio

	pUC57-rBHT	Este estudio
P. pastoris		
	Expresión plasmídica de P. pastoris portadora del *promotor y terminador de transcripción* AOX1, *HIS4* Amp^r en *E. coli,* PBR322 ori, señal de secreción del factor α de *S. cerevisiae*	Invitrogen;
	pPIC9-αMF-6XHIS-TEV-rBHT	Este estudio
αMP, *señal de secreción del factor de apareamiento α* de S. cerevisiae.		

Tabla 4. Cebadores, anticuerpos y sustratos utilizados en este estudio (SEQ ID NOS: 21-27)

Cebadores	***Marco abierto de lectura***	***Secuencia***	***Fuente***
JBB1	Cebador directo de 6XHIS-TEV-rBHT	5´-ccgCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCACCACCACCACCACCACGAAAACCTGTATTTTCAGATGATGCTGCATGCTGCAC-3´	Este estudio
JBB2	*Cebador inverso de*rBHT	5´-aaggaaaaaaGCGGCCGCTTACAGATGATTACGCCCAAATTG-3´	Este estudio
JBB3	*Cebador directo de secuenciación interna de* rBHT	5´-ATCACTATGCCAGCACGCAGTGTA-3´	Este estudio
JBB4	*Cebador inverso de secuenciación interna de* rBHT	5´-TTTAAAGCCGATTTCACCTGCCGC-3´	Este estudio
Cebador de secuenciación 5 'AOX1	AOX1		
Secuenciación de 3 'AOX1	AOX1		
Cebador de secuenciación del factor α	factor α		
Anticuerpos	***Antígeno***		
Anti-HIS de ratón	6XHIS		
Anti-Bgal de conejo	*β-galactosidasa* de E. coli		
Anti-rBHT de conejo	β-hexosil-transferasa		Este estudio
Sustrato	***Abreviatura***		
*o*NP-β-D-glucopiranosido	ONP-Glu		Sigma
*o*NP-β-D-galactopiranosido	ONP-Gal		Sigma
*pag*NP-β-D-glucopiranosido	PNP-Glu		Sigma
*p*NP-β-D-galactopiranosido	PNP-Gal		Sigma
5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido	X-GAL		Sigma
[a] Las regiones de codificación están capitalizadas, los sitios de restricción están subrayados.			

Tabla 5. Informes que evalúan la BHT de *Sporobolomyces singularis* para la producción de galactooligosacáridos (GOS)

Nombre de la Enzima	*MM*	*SA*	*T*	*pH*	*U.g^{-1}·lac*	*L_{int}*	*L_{util}*	*C_{max}(Y)*	*Condiciones Usadas*	*Ref*
β-transglicosilo									STR. Células en crecimiento	
β-hexosil-transferasa									Extracto celular	
β-hexosidasa									Enzima purificada	
β-galactosidasa									Lote IE, enzima parcialmente purificada	
β-galactosidasa									Cont. IE, PBR, enzima parcialmente purificada	
β-galactosidasa									Enzima parcialmente purificada	
β-galactosidasa									Enzima purificada	
similar a β-galactosidasa									Enzima purificada	
β-galactosidasa									Lote, células en reposo	
β-galactosidasa									RB IE Alginato, células en reposo	
β-hexosiltransferasa									Enzima purificada	Este estudio
β-hexosiltransferasa									Lote, células en reposo recombinantes	Este estudio
β-hexosiltransferasa									Lote, células en reposo recombinantes	Este estudio

MM, masa molecular (kDa); SA, actividad específica (U.mg^{-1}de enzima); T, temperatura (°C); U.g^{-1}lac, unidades por gramo de lactosa inicial; L_{int}, concentración inicial de lactosa (%); L_{util}, lactosa utilizada (%); C_{max}, conversión máxima de GOS (%) a partir de lactosa inicial; (Y),% de conversión (GOS total formado a partir de lactosa utilizada); STR, reactor de tanque agitado; IE, enzima inmovilizada; PBR, reactor de lecho empacado; Cont. IE, enzima inmovilizada (continua); RB IE, enzima inmovilizada (lote repetido). Sustratos de la reacción enzimática. [a]ONP-Gal; [b]PNP-Gal; [C]PNP-Glu; [d]ONP-Glu. [e]GOS que incluyen disacáridos; [f]los valores de GOS informados se realizaron con el valor de acumulación máxima del trisacárido (galactosil-lactosa)

Tabla 6 *Proteínas rBHT* de Pichia pastoris

FP #	Construcción proteica			Construcción proteica sin aMF		Secuencia señal	
	Nombre	Aminoácido #	Mol. Peso	Aminoácido # sin aMF	Peso molecular sin aMF		Plásmido
						aMF y BHTss	
						aMF y BHTss	
						aMF y BHTss	
						aMF y BHTss	
						aMF	

						aMF	
						BHTss	
						aMF	
aMF =*factor de apareamiento alfa* de Saccharomyces cerevisiae encontrado en el vector pPIC9 BHTss=secuencia señal de BHT encontrada en los aminoácidos 1-22							

6.6. La secreción de β-hexositransferasa se mejora al reemplazar el dominio señal

6.6.1. Resumen

La β-hexosiltransferasa (BHT) de *Sporobolomyces singularis*se conoce por su capacidad para catalizar reacciones de transgalactosilación y sintetizar galacto-oligosacáridos (GOS). Anteriormente nosotros informamos la expresión heteróloga de un polipéptido bioactivo de longitud completa (rBHT) por una cepa recombinante de *Pichia pastoris* (GS115::*αMF*-HIS-TEV-*rBht*) Esta cepa recombinante contiene toda la longitud *del gen Bht* precedido por la señal pre pro*del factor de acoplamiento α* de Saccharomyces cerevisiae (*αMF*), un marcador de histidina y un sitio de escisión de TEV. Después de la inducción de metanol, la rBHT generada por GS115::*αMF*-HIS-TEV-*rBht* se secretó solo parcialmente y la mayor parte de la proteína permaneció asociada a la membrana celular. Para aumentar la cantidad de rBHT secretada, este trabajo examina la región aminoterminal de BHT no caracterizada (aminoácidos 1-110) que contiene dos supuestos dominios estructurales endógenos. La región aminoteminal incluye un dominio (aminoácidos 1-22) que puede servir como una señal líder de secreción clásica, mientras que los 23-110 aminoácidos restantes contienen una supuesta señal de secreción no clásica. Por lo tanto, nosotros evaluamos funcionalmente estos dominios generando *cepas GS115 recombinantes* de P. pastoris que expresan rBHT-HIS. Los resultados muestran la interferencia de la señal que afecta la secreción de proteínas cuando αMF se siguió por la señal líder clásica de$rBht_{(1-22)}$ (aminoácidos 1-22), mientras que la sustitución de la señal líder (aminoácidos 1-22) con el αMF ($\alpha MF\text{-}rBht_{(23-594)}$) mejoró *la producción de enzimas secretadas y unidas a la membrana de P. pastoris* hasta 50 y 14 veces, respectivamente. Para validar el papel de los dominios aminoterminales de BHT como promotor de la secreción de proteínas, nosotros probamos los dominios con una proteína alternativa no secretada, el fragmento scFv13R4 de anticuerpo variable de cadena sencilla anti-β-galactosidasa. Cepas recombinantes de *P. pastoris* que expresaba combinaciones de los dominios αMF y aminoterminales de rBHT, seguidas por el anticuerpo *scFv13R4* generaron resultados que se correlacionan con la fuerte secreción obtenida por los recombinantes que expresan rBHT-HIS. Finalmente, las proteínas rBHT-HIS y rBHT activas obtenidas de los recombinantes más eficientes (GS115::$\alpha MF\text{-}rBht_{(23-594)}\text{-}HIS$ y GS115::$\alpha MF\text{-}rBht_{(23-594)}$) se purificaron hasta la homogeneidad y se evaluaron las posibles alteraciones en la actividad enzimática. La actividad enzimática de las enzimas secretadas marcadas con 6XHIS y sin marcar se compararon, como lo demuestran las velocidades de generación de GOS.

6.6.2. Introducción

Existe un interés creciente en el uso de enzimas para la producción de alimentos funcionales, especialmente en el campo de la producción de prebióticos a partir de lactosa para obtener derivados de lactosa. *Sporobolomyces singularis* pueden asimilar la lactosa y la glucosa pero no la galactosa, lo que indica que solo son capaces de metabolizar la porción de glucosa de la lactosa. Además, el monómero de galactosa no utilizado solo se puede encontrar en el cultivo como componente de los galacto-oligosacáridos (GOS). Esta característica fisiológica condujo al descubrimiento de la β-hexosiltransferasa (BHT) (Blakely y Mackenzi 1021-25; Phaff y Carmo-Sousa 193-207; Spencer, de Spencer y Laluce 147-56; Gorin, Phaff y Spencer 1341-44; Gorin, Spencer y Phaff 2307-17). Los prebióticos como GOS sintetizados por BHT a partir de *S. singularis* se reconocen como GRAS y se utilizan ampliamente como aditivos alimentarios funcionales (Tzortzis y Vulevic 207-44).

Además de la síntesis de GOS a partir de la lactosa, la BHT también cataliza la hidrólisis de enlaces β-glucosídicos como ONP-Glu y PNP-Glu (Blakely y Mackenzi 1021-25). Las capacidades enzimáticas de BHT son particularmente atractivas con respecto a tecnologías competidoras, ya que es una de las pocas enzimas capaces de catalizar la producción de GOS con ventajas industriales que incluyen; la ocurrencia de la catálisis en ausencia de iones y cofactores adicionales, así como su capacidad para realizar reacciones de transgalactosilación independientemente de la concentración inicial de lactosa (Gosling*y otros* 307-18; Blakely y Mackenzi 1021-25).

En *S. singularis, el gen Bht* es un gen inducible que se reprime por glucosa y cuando está en presencia de un inductor como la lactosa, la enzima generada (BHT) se encuentra principalmente asociada a la membrana celular. Debido a la ubicación celular, la purificación de BHT requiere múltiples pasos de cromatografía y se ha recuperado de *S. singularis* con rendimientos muy bajos que van del 14% al 16% (Blakely y Mackenzi 1021-25; Cho, Shin y Bucke 2107-11; Ishikawa *y otros* 331-39). Como los protocolos convencionales de purificación de proteínas limitan la recuperación de enzimas y, por lo tanto, su aplicación tecnológica, se han evaluado estrategias alternativas. El primer enfoque consistió en exponer *S. singularis* a la selección a través de mutagénesis. Aplicando esta metodología, se seleccionó una nueva cepa sin

represión de glucosa y capaz de generar un aumento de 10 veces de la BHT unida a la membrana; sin embargo, no se informó un aumento en la producción de enzimas secretadas (Ishikawa *y otros*331-39). Alternativamente, con fecha reciente describimos que la cepa GS115 de*P. pastoris* es capaz de secretar un polipéptido rBHT recombinante biológicamente activo cuando se precede por la señal de secreción prepro de αMF que consiste en una secuencia de señal de 19 aminoácidos (secuencia previa) seguida de una secuencia de 66 aminoácidos y un sitio de procesamiento de endopeptidasa Kex2 dibásico (Kurjan y Herskowitz 933-43). En este estudio, el análisis del extracto libre de células y la actividad asociada a la membrana mostró que la mayoría de la enzima permaneció asociada a la membrana celular. Por lo tanto se muestra que la cepa GS115 de*P. pastoris* es un hospedero adecuado para la producción y secreción de la rBHT bioactiva que facilitará el procesamiento posterior y demostrará la viabilidad de la producción de la rBHT bioactiva secretada y asociada a la membrana (Dagher *y otros,* 2013).

Una mirada adicional a la secuencia de la proteína BHT nativa mostró que contiene características estructurales endógenas en el extremo aminoterminal, incluidos los dominios aminoterminales que pueden servir como señales de secreción clásicas y no clásicas adecuadas. Apoyando estos roles como señales líderes, se demostró que después del tratamiento de *S. singularis* con las enzimas líticas de la pared celular, la mayor parte de la BHT liberada carecía de la señal líder clásica del terminal amino (Ishikawa *y otros,* 331-39). Dado que la eficiencia de la expresión génica y la secreción de proteínas puede afectarse por los elementos estructurales de la proteína que participan en la asociación y secreción celular, las mismas funciones también pueden extenderse a la localización celular de la proteína cuando se expresa por la cepa GS115 de *P. pastoris*.

En este estudio, nosotros probamos el papel fisiológico de los dominios aminoterminales de BHT y su relación con la secreción de proteínas por la cepa GS115 de*P. pastoris*. Además, las funciones secretoras de los dominios aminoterminales de rBHT se validaron usando recombinantes quiméricos que contienen como carboxilo terminal el anticuerpo scFv13R4 anti-β-galactosidasa de cadena sencilla. El anticuerpo scFv13R4 es un ejemplo de una proteína de cadena única hiperestable no secretada que es independiente de la formación del puente disulfuro para la actividad de unión (Martineau, Jones y Winter 117-27). Como tal, scFv13R4 se ha expresado heterólogamente en *Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae,* y células de ovario de hámster chino (CHO) (Visintin *y otros,* 11723-28; Grage y Rehm 254-62; Bach *y otros,* 79-93).

6.6.3. Resultados

Análisis de la secuencia de proteínas de la β-hexosil transferasa (BHT) in silico. La porción carboxiterminal (aminoácidos 111 a 594) del polipéptido BHT (594 aminoácidos) tiene notable homología con las β-glucosidasas. Este dominio de glicohidrolasa I (GHI) contiene el supuesto ácido/base catalítico, el nucleófilo catalítico y tres residuos de asparagina potencialmente necesarios para la N-glicosilación de la proteína (Fig. 7A). Sorprendentemente, el extremo aminoterminal de BHT reveló una región única que abarca los primeros 110 aminoácidos. Esta región comprende un dominio de señal líder clásico aminoterminal (aminoácidos 1 a 22) seguido de una señal predicha de secreción no clásica (NC) de baja complejidad (http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP) (aminoácidos 72 a 83) (http://mendel.imp.ac.at/METHODS/seg.server.html) La señal líder del extremo aminoterinal (aminoácidos 1 a 22) se puede dividir en la región N (extremo aminoterminal; aminoácidos 1 a 5), la región H (hidrófoba; aminoácidos 6 a 17) y la región C (extremo carboxiterminal; aminoácidos 18 a 22) (Fig. 7B). Algoritmos alternativos como el programa web Phobius (http://phobius.sbc.su.se/) y el algoritmo SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) también predijeron la supuesta señal líder clásica y los posibles sitios de escisión entre los residuos 17 y 18 y entre 22 y 23. Además, se predijo que la señal líder clásica contenía cinco aminoácidos que tienen contacto con la membrana dentro de la región H (RHYTHM, http://proteinformatics.charite.de/rhythm/) y una distribución de carga que podría facilitar la localización y secreción de proteínas de membrana (Boyd y Beckwith 1031-33). El algoritmo de predicción de la región transmembrana (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) también pronosticó una región de residuos hidrofóbicos de 1-17 y 177-199 en BHT, típico para proteínas integrales que abarcan la membrana y la región no citoplasmática (aminoácidos 23-594) como se representa en el diagrama de hidropatía de Kyte y Doolittle (Fig. 7C). Estas características estructurales también pueden indicar que la señal líder clásica aminoterminal puede actuar como un ancla de membrana durante el paso a través de la vía secretora de levadura.

Los dominios aminoterminales participan en la secreción de proteínas. Para investigar las funciones fisiológicas probables de los dos dominios de secreción aminoterminales (señales de secreción clásicas y no clásicas), se probó la expresión del dominio BHT carboxiterminal (aminoácidos 111 a 594) y del anticuerpo anti-β-galactosidasa de cadena única (scFv13R4). Cepas GS115 recombinantes estables de *P. pastoris* se obtuvieron por integración cromosómica de las combinaciones genéticas modificadas apropiadas precedidas por los dominios amino terminales de*rBht* y/o la fuerte secuencia prepro de αMF de 9.3 kDa. Las combinaciones de genes de*rBht* y *scFv13R4* se insertaron posterior al promotor AOX1 y seguidas del marcador 6XHIS carboxiterminal para ayudar a la detección y purificación Fig. 8A y 8D (ver Materiales y Métodos).

El reemplazo de la señal líder (aminoácidos 1 a 22) con la fuerte señal de secreción prepro de αMF (GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$-HIS) aumentó la secreción de proteínas a más de 19 veces (9.80 μg.ml^{-1}) en comparación con la expresión de la rBHT-HIS de longitud completa precedida por la señal de secreción αMF (GS115::*αMF-rBht*-HIS) (0.49 μg.ml^{-1}) (Fig. 8B). De la misma manera, en ausencia de la αMF, la señal líder fue capaz de dirigir la proteína heteróloga para la secreción GS115::*rBht*-HIS) (6.35 μg.ml^{-1}). Además, se detectó la secreción de proteínas en ausencia de las señales αMF y líder

(GS115::*rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS) (4.65 µg.ml^{-1}), lo que sugiere que tanto la señale de secreción líder clásica como la no clásica contienen información dirigida a la proteína para la secreción.

Para validar que los dominios aminoterminales, como se describió anteriormente, dirigen las proteínas a la vía secretora, elegimos el anticuerpo scFv13R4, una proteína intracelular sin secuencias de señal. Los diagramas del anticuerpo *scFv13R4* quimérico se muestran en la Figura (8C). El scFv13R4-HIS cuando lo expresa GS115 ::*scFv13R4*-SIS (sin señales de secreción líder) no se pudo detectar en el caldo de cultivo mediante tinción con plata SDS-PAGE o análisis de transferencia Western (datos no mostrados). Secreción de scFv13R4-HIS por GS115::*rBht*$_{(1\text{-}110)}$-*scFv13R4*-HIS o GS115::*rBht*$_{(23\text{-}110)}$-*scFv13R4*-HIS manifestado cuando cualquier *scFv13R4*se fusiona con la *señal de secreción líder clásica*Bht (25.17 µg.ml^{-1}), o cuando se fusiona con la *señal no clásica*Bht (7.03 µg.ml^{-1}) De la misma manera, como ocurre con BHT-HIS, la secreción dirigida por αMF, (GS115::*αMF-scFv13R4*-HIS) proporcionó el nivel más alto de proteína secretada (91.02 µg.ml^{-1})

Actividad enzimática y análisis de Western blot de rBHT-HIS expresado por *la cepa GS115*de P. pastoris. Para confirmar que la expresión de la proteína se correlaciona con la actividad enzimática, la actividad de las rBHT-HIS secretadas y unidas a la membrana se midieron usando ONP-Glu como sustrato (ver Materiales y Métodos). Todas las cepas recombinantes secretaron rBHT-HIS en cantidades detectables y los valores de actividad reflejaron aumentos en la proteína secretada. La proteína secretada por GS115::*αMF-rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS mostró una actividad enzimática de 3.7 mU.OD^{-1} que fue 6 veces mayor que la actividad medida cuando la secreción la condujo la región aminoterminal completa (aminoácidos 1-110) (GS115::*rBht*-HIS (0.63 mU.OD^{-1})). De la misma manera, la actividad enzimática medida de la proteína secretada por GS115::*αMF-rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS fue 53 veces mayor que la obtenida del recombinante que contenía las señal αMF y la líder (GS115::*αMF-rBht*-HIS (0.07 mU.OD^{-1})). El recombinante GS115::*rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS (0.26 mU.OD^{-1}) muestra una cantidad reducida de enzima secretada activa Tabla 8.

También se probó la actividad de la enzima unida a la membrana mostrada por las células en reposo de cada recombinante. Encontramos valores de actividad que se correlacionan con la proteína secretada total, lo cual muestra un aumento en la actividad unida a la membrana de 15 veces para la cepa GS115::*αMF-rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS (21.52 mU.OD^{-1}) y un aumento de 1.3 veces para la cepa GS115::*rBht*-HIS (1.94 mU.OD^{-1}) en comparación con GS115 ::*αMF-rBht*-HIS (1.48 mU.OD^{-1}) El recombinante GS115::*rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS (0.15 mU.OD^{-1}) muestra una cantidad reducida de enzima unida a la membrana, lo cual confirma que este recombinante redirige la proteína a través de la supuesta vía de secreción no clásica. En general, estos resultados muestran que ni αMF ni la señal de secreción líder de BHT podrían completar la secreción de rBHT-HIS, lo cual puede relaionarse con la presencia de una región transmembrana predicha entre los aminoácidos 177 a 199.

El análisis por Western blot de los extractos libres de células usando el anticuerpo anti-HIS confirmó los valores de proteína secretada por GS115::*αMF-rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS, GS115::*rBht*-HIS y GS115::*rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS (Fig. 9A). En cada caso, estaba presente la banda prominente rBHT-HIS correspondiente a una masa molecular de aproximadamente 110 kDa. Estos resultados coinciden con los patrones de migración de cromatografía de exclusión por tamaño y SDS-PAGE previamente informados (Dagher, Azcarate-Peril y Bruno-Bárcena). El análisis por Western blot de los extractos celulares obtenidos de GS115::*αMF-rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS, GS115::*rBht*-HIS y GS115::*αMF-rBht*-HIS también exhibió una masa molecular de aproximadamente 110 kDa, mientras que GS115::*rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS mostró bandas prominentes entre 98 y 64 kDa que pueden indicar degradación intracelular o patrones de glicosilación alternativos (Fig. 9B).

Actividad hidrolítica de rBHT. Además, probamos las enzimas secretadas para proteínas marcadas con HIS y sin marcaje de GS115::*αMF-rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS y GS115::*αMF-rBht*$_{(23\text{-}594)}$, respectivamente. Las enzimas suministraron resultados comparables y estuvieron activas en un amplio intervalo de temperaturas (10 a 50°C) y con valores de pH (2.8 a 6). Se observó una actividad máxima de pH 3.6 a 5 (91 a 100% de la actividad máxima) seguido de una disminución constante hasta pH 2.6 (43% del máximo) y hasta pH 6.8 (29% del máximo). De la misma manera, la temperatura óptima se encontró en el intervalo de 40 y 45°C (actividad máxima del 97 al 100%) pero disminuyó rápidamente a temperaturas superiores a 50°C e inferiores a 20°C (menos del 25% del máximo) (datos no mostrados) La enzima era estable en 50 mM de tampón de fosfato de sodio a pH 5 a 4°C durante al menos 6 meses, y la actividad no se afectó por el almacenamiento a -80°C. Los valores para las constantes cinéticas para la enzima secretada por GS115::*αMF-rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS se obtuvieron de la ecuación de Hill (Km 0.79 mM y Vmax 3.97 mmol.min^{-1} por mg^{-1} de enzima a 42°C a pH 4). Esos hallazgos coincidieron con nuestros informes anteriores y los de otros (Blakely y Mackenzi 1021-25; Cho, Shin y Bucke 2107-11; Gorin, Phaff y Spencer 1341-44; Gorin, Spencer y Phaff 2307-17; Ishikawa *y otros,* 331-39; Sakai *y otros,* 285-93; Shin, Park y Yang 787-92; Shin y Yang 484-89; Dagher, Azcarate-Peril y Bruno-Bárcena).

Estabilidad de rBHT. Para examinar la estabilidad a largo plazo de la enzima, todas las cepas recombinantes recién inducidas se incubaron en un tampón que contenía glucosa al 2% y se midió la actividad hidrolítica de la rBHT secretada y unida a la membrana con el tiempo. La rBHT-HIS secretada que se obtuvo de todos los recombinantes a través de la vía de secreción clásica o no clásica se mantuvo estable durante el período de prueba de una semana y retuvo más del 95% de la actividad inicial. Se observó la misma estabilidad cuando las células en reposo que contenían la enzima asociada a la membrana se expresó por GS115::*αMF-rBht*-HIS, GS115::*rBht*-HIS y GS115::*αMF-rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS. Sin embargo, cuando se prueban células en reposo que contienen enzimas asociadas a la membrana expresadas por GS115::*rBht*$_{(23\text{-}594)}$-HIS, la actividad comenzó a disminuir dentro de las 24 h apuntando a la vía de secreción alternativa no clásica.

Purificación y caracterización de la rBHT-HIS generada por GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$-HIS. La proteína rBHT expresada por GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$-HIS se purificó utilizando la cromatografía de afinidad de níquel. La colocación del marcador 6XHIS en el extremo carboxiterminal permitió con éxito la recuperación en un solo paso de más del 73% de la actividad enzimática original y después de SDS-PAGE se observó una única banda de polipéptidos de aproximadamente 110 kDa (Fig. 9C). La purificación de proteínas de 6.54 veces del sobrenadante del cultivo recuperó 7.24 mg de enzima, lo que produjo una actividad específica de 18.45 mU.mg^{-1} a 42°C y a pH 4 (Tabla 9). Además, siguiendo la misma metodología, nosotros purificamos la rBHT-HIS secretada por los diferentes recombinantes y encontramos actividades específicas comparables que van desde 18.45 a 18.65 mU.mg^{-1}. Una determinación de las secuencias aminoterminales del polipéptido secretado por GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$-HIS mostró que todo la proteína rBHT$_{(23-594)}$-HIS estaba presente en el cultivo (residuos VXYPG) además de un producto que contenía dos aminoácidos aminoterminales adicionales (residuos E-A-V-X-Y). La variabilidad en la escisión de los aminoácidos A-E durante la secreción puede afectarse por la secuencia de aminoácidos circundante y la estructura terciaria (Cereghino y Cregg 45-66). La secuencia no clásica restante no introdujo un nuevo sitio de escisión.
Impacto de HIS en el marcador de la actividad transferasa de rBHT. Los recombinantes GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$-HIS y GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$ se emplearon además para evaluar comparativamente si la presencia del marcador HIS puede afectar la síntesis de GOS a partir de la lactosa. La acumulación de GOS se analizó cuantitativamente por HPLC a partir de mezclas de reacción que contenían 220 gL^{-1}de lactosa inicial, 0.5 U de rBHT g^{-1} de lactosa se incubó a 30°C.

La Fig. 10A muestra la acumulación comparativa de GOS y el consumo de lactosa a lo largo del tiempo cuando la reacción se catalizó por las enzimas secretadas marcadas o no marcadas con 6XHIS. En ambos casos, la tasa máxima de producción se observó durante las primeras 25 h con galactosil-lactosa como producto principal. Como confirmación de la inhibición enzimática competitiva de glucosa descrita previamente después de 125 h, la acumulación de galactosil-lactosa (75 gL^{-1}) fue estacionaria, alcanzando un promedio de conversión del 67% del 60% de lactosa inicial utilizada (Dagher, Azcarate-Peril y Bruno-Bárcena).

Cuando se utilizaron células en reposo que expresaban HIS asociado a membrana y rBHT no marcado con HIS, también se confirmó la acumulación comparativa de los GOS y el consumo de lactosa a lo largo del tiempo. (Fig. 10B) muestra que la presencia de HIS en el estremo carboxiterminal no tuvo impacto en la velocidad de reacción inicial de la formación de galactosil-lactosa (1.87 y 1.7 g.L^{-1}.h^{-1}). Como se informó anteriormente, la glucosa se consumió por las células en reposo de *P. pastoris* mientras que la galactosa se usó para sintetizar los GOS (68% de rendimiento (g/g)) acercándose al rendimiento teórico de 75% (Dagher, Azcarate-Peril y Bruno-Bárcena).

6.6.4. Discusión

Los prebióticos son derivados de carbohidratos comercializados como alimentos funcionales y promovidos activamente para mejorar la salud del consumidor, cuyo objetivo es estimular específicamente el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino. La fuerza fundamental que impulsa el desarrollo de los prebióticos es la promesa de procesos de producción más eficientes con costos operativos más bajos. Sin embargo, la producción o síntesis de derivados de carbohidratos específicos por los métodos químicos es compleja y requiere pasos de protección y desprotección debido a la presencia de varios grupos hidroxilo de reactividad similar (Sears y Wong 2344-50). Por lo tanto, el desarrollo de enfoques enzimáticos es de interés práctico y la modificación genética se ha utilizado ampliamente para modificar la actividad enzimática, para obtener un conocimiento más profundo de los mecanismos catalíticos y para aumentar la secreción de proteínas. Las proteínas destinadas a la secreción generalmente se preceden de señales líderes aminoterminales de 20-30 aminoácidos y finalmente se procesan por señales peptidasas unidas a la membrana (Von Heijne 17-21). La secreción de proteínas por *P. pastoris*está influenciada por la naturaleza de las secuencias de nucleótidos iniciales y, en ocasiones, requiere la optimización del codón, así como la consideración de los patrones de glicosilación, la estructura tridimensional final, las condiciones de cultivo y la composición del medio (Damasceno, Huang y Batt 31-39). Además, la distribución de aminoácidos cargados dentro de los dominios líderes juega un papel importante para facilitar la localización de la membrana y las proteínas secretadas (Boyd y Beckwith 1031-33).

Como se informó anteriormente, *P. pastoris* ofrece ventajas sobre *E. coli*para la expresión de la rBHT gracias a su capacidad para incorporar eficientemente las modificaciones postraduccionales que permitieron la producción heteróloga de pequeñas cantidades de rBHT bioactivo. *Los análisis* in silico de BHT sugirieron que esta enzima contiene dominios transmembrana que debían estudiarse para aumentar la secreción de la enzima por *P. pastoris.*La única región proteica de BHT (1-110 aminoácidos) contiene dos dominios que funcionan como señal líder clásica (BHT)$_{(1-22)}$) y dominios de señal de secreción no clásicos (BHT$_{(23-110)}$) La señal líder clásica también se dirige a la proteína para realizar su función en la membrana celular (de acuerdo con lo predicho por el método RHYTHM y las gráficas de hidropatía, Fig. 1). En particular, la presencia de aminoácidos básicos como la arginina en la posición 17 podría implicarse en la eficacia de la secreción y la orientación de las proteínas en la membrana (Fig. 1).

Los datos que aquí se presentan muestran la interferencia de la secreción de proteínas por GS115::αMF-*rBht-HIS* debido a la presencia simultánea de la señal αMF y la líder (BHT$_{(1-22)}$) Los niveles de secreción de proteínas se compararon a los valores informados previamente por GS115::*αMF-HIS-TEV-rBht* (Dagher, Azcarate-Peril y Bruno-Bárcena). Por otro lado, los recombinantes GS115::*rBht*-HIS y GS115::αMF-*rBht*$_{(23-594)}$-HIS obtuvieron una mayor acumulación de proteína secretada careciendo de αMF o BHT$_{(1-22)}$, respectivamente. Por lo tanto, se demostró que el dominio de señal líder (BHT$_{(1-}$

$_{22)}$) participa en el mecanismo mediado por péptidos señal (vía secretora clásica) comparable a αMF. Ambas señales líderes fueron capaces individualmente de aumentar la expresión de proteínas de la rBHT asociada a membrana y la secretada en comparación con GS115::αMF-*rBht-HIS,* que contiene ambas secuencias líderes. Los mejores valores para la proteína rBHT bioactiva secretada (aumento de 50 veces) y unida a la membrana (aumento de 14 veces) se obtuvieron mediante el recombinante GS115::αMF-*rBht*$_{(23-594)}$-HIS (tabla 3). La purificación posterior de la proteína bioactiva expresada a partir de GS115::αMF-*rBht*$_{(23-594)}$-HIS resultó en una proteína muy pura por SDS-PAGE con una actividad específica de 18.45 U.mg^{-1} (Tabla 4). La masa molecular de la rBHT (110 kDa) no se desvió entre la rBHT asociada a la membrana celular y la secretada y mostraron una actividad enzimática, termoestabilidad, reutilización y estabilidad de almacenamiento similar en comparación con la rBHT de nuestro estudio anterior (Dagher *y otros,* 2013).

Esperábamos que la eliminación de ambos dominios líderes (BHT$_{(1-22)}$) y aMF dificultaría la secreción de enzimas. Sin embargo, la eliminación de aMF y BHT$_{(1-22)}$ todavía mostró bajas cantidades de proteína secretada. Esto también confirma que la región única de 110 aminoácidos contiene una función dual por la cual el dominio líder BHT$_{(1-22)}$ actúa como una señal de secreción eficiente (vía de secreción clásica) y el dominio de la BHT predicha$_{(23-110)}$ funciona como una señal de secreción alternativa (vía de secreción no clásica). Los análisis por Western blot muestran proteólisis que indica una mayor sensibilidad a las proteínas en la célula. La mayoría de la actividad hidrolítica medida se detectó como bandas múltiples por debajo de la masa máxima de 110 kDa, lo que probablemente afecta la cantidad de enzima secretada (Fig. 9A-9C). Nosotros especulamos que las secuencias de señal pueden actuar para proteger la proteína durante la secreción al mantener la proteína alejada de las proteasas dentro de la vía secretora.

Aunque la mayor cantidad de proteínas se secreto por GS115::*αMF-rBht*$_{(23-594)}$-HIS, una cantidad significativa permaneció unidas de manera estable a la membrana, posiblemente debido a la movilidad limitada predicha en la membrana por la presencia del dominio transmembrana dentro del dominio carboxiterminal de la proteína (aminoácidos 177-199). Por lo tanto, para confirmar la función fisiológica de estos dominios como señales secretoras, generamos nuevas proteínas quiméricas reemplazando el dominio de la rBHT$_{(23-594)}$ con la proteína anticuerpo scFv13R4. El líder clásico $_{(1-110)}$ de la BHT seguido por un supuesto líder no clásico de la BHT$_{(23-110)}$ y el dominio αMF se colocaron en el marco en la posición aminoterminal con scFv13R4. Los análisis de estos nuevos recombinantes corroboraron la función secretora líder al dirigir el anticuerpo a la secreción. Nuestros resultados confirman que la elección de las secuencias de señal tiene un fuerte impacto en los niveles de producción y secreción de proteínas, incluidos la BHT recombinante y el scFv13R4. Es notable el hecho de que la nueva señal líder más pequeña (22 aminoácidos) tiene una ventaja de tamaño en comparación con αMF (66 aminoácidos) y se demostró aquí que es una nueva secuencia única capaz de dirigir la secreción de proteínas heterólogas. Este dominio de señal líder agrega una nueva característica que puede incorporarse a las enzimas intracelulares que, de lo contrario, deben extraerse por interrupción utilizando medios mecánicos o la permeabilización con tratamientos químicos (Panesar *y otros,* 530-43).

El desarrollo molecular continuo de la BHT ayudará a abordar los problemas de las industrias alimentarias para enzimas con propiedades novedosas como la termoactividad, la estabilidad al frío y la síntesis de oligosacáridos específicos. Los presentes hallazgos motivan un análisis estructural adicional para dilucidar las características que contribuyen a la actividad de transglicosilación y la especificidad del sustrato. La mutagénesis de los sitios catalíticos y la mutagénesis racional basada en la estructura 3D allanarán el camino para alteraciones en la especificidad del sustrato para la producción de nuevos GOS como candidatos prebióticos.

Tabla 7. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas/Plásmidos	***[a] Descripción o genotipo***	***Referencia o Fuente***
Cepas de E. coli		
		Estratagen
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio

		Este estudio
		Este estudio
Plásmidos		
	pPM160 que contiene el gen anti-β-galactosidasa del anticuerpo *scFv13R4*	
	Vector integrador de P. pastoris portando el promotor y terminador de la transcripción *AOX1 HIS4* Amp^{r}en *E. coli,* ori pBR322, señal de secreción del factor de acoplamiento α de *S. cerevisiae (*αMF*)*	Invitrogen;
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio
		Este estudio
[a]*αMF, señal de secreción del factor de apareamiento α de S. cerevisiae* encontrada en el vector pPIC9.		

Tabla 8. Actividad enzimática de la rBHT-HIS secretada y la unida a la membrana por diferentes recombinantes de *P. pastoris*

Actividad media (mU.OD^{-1}) ± SD [a]			
Fuente de enzimas	**Secretada**	**Unida a membrana**	**Relación secretada/unida a membrana**

Tabla 9. PURIFICACIÓN DE RBHT-HIS SECRETAA POR GS115::*AMF-RBHT*$_{(23-594)}$-HIS DE P. PASTORIS

Fuente de enzimas	**Promedio de la actividad total (UL^{-1})[a]**	**Promedio de proteína total (mg)[b]**	**Promedio de la actividad específica ($V.mg^{-1}$)[c]**	**Columna de Ni (U)[d]**	**Columna de Ni (mg)[e]**	**Actividad específica de columna de Ni ($U.mg^{-1}$)[f]**	**Purificación (plegamiento)[g]**	**Recuperación (%)[h]**

[a], 1 litro de cultivo se creció en el cultivo BMGY a 28°C.
[b], Concentración de proteínas determinada por el ensayo de Bradford.
[c], La actividad específica se expresa como la actividad total (U) dividida por la proteína total (mg).
[d], Unidades totales después de la purificación por cromatografía de níquel.
[e], Proteína total (mg) después de la purificación por cromatografía de níquel.
[f], Actividad específica expresada como actividad total (U) dividida por el rendimiento total (mg) después de la purificación por cromatografía de níquel.
[g], Aumento de la actividad específica.
[h], Rendimiento expresado como la actividad total después de la cromatografía en columna de níquel dividido por la actividad total en el cultivo.

6.7. Referencias para la Sección 6.6

Bach, Horacio y otros. "Escherichia coli maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies." Journal of Molecular Biology 312.1 (2001): 79-93.
Boyd, Dana y Jon Beckwith. "The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins." Cell 62.6 (1990): 1031-33.
Cereghino, J.L y J.M Cregg. "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris." FEMS Microbiol.Rev. 24.1 (2000): 45-66.
Damasceno, Leonardo, Chung Jr Huang y Carl Batt. "Protein secretion in Pichia pastoris and advances in protein production." Applied Microbiology and Biotechnology 93.1 (2012): 31-39.
Grage, Katrin y Bernd HA Rehm. "In Vivo Production of scFv-Displaying Biopolymer Beads Using a Self-Assembly-Promoting Fusion Partner." Bioconjugate Chemistry 19.1 (2007): 254-62.
Kurjan, Janet e Ira Herskowitz. "Structure of a yeast pheromone gene (MFa): A putative a-factor precursor contains four tandem copies of mature a-factor." Cell 30.3 (1982): 933-43. Martineau, Pierre, Peter Jones y Greg Winter. "Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm." Journal of Molecular Biology 280.1 (1998): 117-27. Panesar, Parmjit S., y otros, "Microbial production, immobilization and applications of β-D-galactosidase." Journal of Chemical Technology & Biotechnology 81.4 (2006): 530-43. Sears, P. y C. H. Wong. "Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins." Science 291.5512 (2001): 2344-50.
Spencer, J.F.T., A.L.R. de Spencer y C. Laluce. "Non-conventional yeasts." Appl. Microbiol. Biotechnol. 58.2 (2002): 147-56.
Tzortzis, George y Jelena Vulevic. "Galacto-Oligosaccharide Prebiotics." Prebiotics and Probiotics Science and Technology. Ed. Dimitris Charalampopoulos y RobertA Rastall. Springer Nueva York, 2009. 207-44.
Visintin, Michela y otros, "Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system." Proceedings of the National Academy of Sciences 96.21 (1999): 11723-28. Von Heijne, Gunnar. "Patterns of Amino Acids near Signal-Sequence Cleavage Sites." European Journal of Biochemistry 133.1 (1983): 17-21.

7. Referencias

1. Blakely, J. A. y S. L. Mackenzi. 1969. Purification and properties of a b-hexosidase from Sporobolomyces singularis. Can. J. Biochem. 47:1021-1025.

2. Boehm, G., J. Jelinek, B. Stahl, K. van Laere, J. Knol, S. Fanaro, G. Moro, y V. Vigi. 2004. Prebiotics in infant formulas. J. Clin. Gastroenterol. 38:S76-S79.

3. Boehm, G. y B. Stahl. 2007. Oligosaccharides from milk. J. Nutr. 137:847S-849S.

4. Cho, Y. J., H. J. Shin, y C. Bucke. 2003. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing b-galactosidase from Bullera singularis. Biotechnol. Lett. 25:2107-2111.

5. Cregg, J. M., T. S. Vedvick, y W. C. Raschke. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris. BioTechnol. 11:905-910.

6. Cuppa, G. V. y O. Gabrelli. 2008. Human milk oligosaccharides as prebiotics, p. 131-146. In J. Versalovic y M. Byand Wilson (eds.), Therapeutic microbology. Probiotics and related strategies. ASM Press Washington DC Chapter.

7. Dagher, S. F., J. L. Wang, y R. J. Patterson. 1995. Identification of Galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:1213-1217.

8. Gallagher, S. R. 1995. Current protocols in protein science, p. 10.3.1-10.3.11.

9. Gorin, P. A. J., H. J. Phaff, y J. F. T. Spencer. 1964. Structures of Galactosyl-lactose and Galactobiosyl-lactose produced from lactose by Sporobolomyces singularis. Can. J. Chem. 42: 1341-1344.

10. Gorin, P. A. J., J. F. T. Spencer, y H. J. Phaff. 1964. Synthesis of b-galacto-b-gluco-pyranosyl disaccharides by Sporobolomyces singularis. Can. J. Chem. 42:2307-2317.

11. Gosling, A., G. W. Stevens, A. R. Barber, S. E. Kentish, y S. L. Gras. 2010. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. Food Chem. 121:307-318.

12. Grosova', M. Rosenberg, y Rebroš. 2008. Perspectives and applications of immobilised b-galactosidase in food industry - a review. Czech J. Food Sci. 26:1-14.

13. Hestrin, S., D. S. Feingold, y M. Schramm. 1955. Hexoside hydrolases. Meth. Enzymol. 1:231-257.

14. Higgins, D. R. 1998. Introduction to Pichia pastoris. Methods Mol. Biol. 103:1-15.

15. Hofmann. 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374.

16. Ishikawa, E., T. Sakai, H. Ikemura, K. Matsumoto, y H. Abe. 2005. Identification, cloning, and characterization of a Sporobolomyces singularis b-galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. J. Biosci. Bioeng. 99:331-339.

17. Jenkins, N., R. B. Parekh, y D. C. James. 1996. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. Nat. Biotechnol. 14:975-981.

18. Katayama, K. 1984. Inhibition by copper ion of the activities of b-galactosidase and dehydrogenases of activated sludge. Japan J. Wat. Pollut. Res. 7:100-107.

19. Katayama, K. 1986. Inhibition of the activities of b-galactosidase and dehydrogenases of activated sludge by heavy metals. Water Res. 20:591-594.

20. Kim, C. S., E. S. Ji, y D. K. Oh. 2004. A new kinetic model of recombinant b-galactosidase from Kluyveromyces lactis for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. Biochem. Biophys. Res. Comm. 316:738-743.

21. Knol, J., P. Scholtens, C. Kafka, J. Steenbakkers, S. Groß,K. Helm, M. Klarczyk, H. Schopfer, H. M. Bockler, y J. Wells. 2005. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: More like breast-fed infants. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 40:36-42.

22. Kuby, S. A. y H. A. Lardy. 1953. Purification and kinetics of b-D-galactosidase from Escherichia coli strain-K-12. J. Am. Chem. Soc. 75:890-896.

23. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. Nat. 227:680-685.

24. Li, P. Z., A. Anumanthan, X. G. Gao, K. Ilangovan, V. V. Suzara, N. Duzgunes, y V. Renugopalakrishnan. 2007. Expression of recombinant proteins in Pichia pastoris. Appl. Biochem. Biotechnol. 142:105-124.

25. Neri, D. F. M., V. M. Balcão, R. S. Costa, I. C. A. P. Rocha, E. M. F. C. Ferreira, D. P. M. Torres, L. R. M. Rodrigues, L. B. Carvalho, y J. A. Teixeira. 2009. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free Aspergillus oryzae b-galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. Food Chem. 115:92-99.

26. Otieno, D. O. 2010. Synthesis of b-galactooligosaccharides from lactose using microbial b-galactosidases. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 9:471-482.

27. Park, A. R. y D. K. Oh. 2010. Galacto-oligosaccharide production using microbial b-galactosidase: current state and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85:1279-1286.

28. Phaff, H. J. y L. D. Carmo-Sousa. 1962. Four new species of yeast isolated from insect frass in bark of Tsuga heterophylla (Raf.) Sargent. Antonie Van Leeuwenhoek. 28:193-207.

29. Rastall, R. A. y V. Maitin. 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. Curr. Opin. Biotechnol. 13:490-496.

30. Roberfroid, M., G. R. Gibson, L. Hoyles, A. L. McCartney, R. Rastall, I. Rowland, D. Wolvers, B. Watzl, H. Szajewska, B. Stahl, F. Guarner, F. Respondek, K. Whelan, V. Coxam, M. J. Davicco, L. Leotoing, Y. Wittrant, N. M. Delzenne, P. D. Cani, A. M. Neyrinck, y A. Meheust. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. Br. J. Nutr. 104:S1-S63.

31. Sakai, T., H. Tsuji, S. Shibata, K. Hayakawa, y K. Matsumoto. 2008. Repeated-batch production of galactooligosaccharides from lactose at high concentration by using alginate-immobilized cells of Sporobolomyces singularis YIT 10047. J. Gen. Appl. Microbiol. 54:285-293.

32. Sambrook J. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.

33. Scopes, R. 1995. The effect of temperature on enzymes used in diagnostics. Clin. Chim. Acta 237:17-23.

34. Shin, H. J., J. M. Park, y J. W. Yang. 1998. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by Bullera singularis b-galactosidase immobilized in chitosan beads. Process Biochem. 33:787-792.

35. Shin, H. J. y J. W. Yang. 1998. Enzymatic production of galactooligosaccharide by Bullera singularis b-galactosidase. J. Microbiol. Biotechnol. 8:484-489.

36. Temple, L. M., A. A. Weiss, K. E. Walker, H. J. Barnes, V. L. Christensen, D. M. Miyamoto, C. B. Shelton, y P. E. Orndorff. 1998. Bordetella avium virulence measured in vivo and in vitro. Infect. Immun. 66:5244-5251.

37. Torres, D. P. M., M. D. F. Gonçalves, J. A. Teixeira, y L. R. Rodrigues. 2010. Galacto-oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 9:438-454.

Se entiende que, aunque la invención se ha descrito en conjunto con la descripción detallada de ésta, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, la cual se define por el alcance de las reivindicaciones anexas.

8. Listado de secuencias

SEQ ID NO. 1
>gi|345649663|gb|JF298281.1| Construcción sintética del gen de la beta-hexosil transferasa (bglA), cds parciales

```
ATGATGCTGCATGCTGCACTGCTAGTAGCGCTGCCATGTGTTGTTTTGGCGCGCCCGGCCGGAGCGGTTA
CTTATCCGGGAGCCATTCCTCTGTCCCTGACGAGCAATTACGAAACCCCAAGTCCGACAGCAATCCCGCT
GGAGCCAACACCGACGGCTACCGGTACAGCAGAATTAGATGCGCTGTGGAACTTAGTCGAAGCTCAGTAC
CCAGTTCAAACTGCTGCAGTGACAACTTTGGTGACAGTGCCCGATGATTATAAGTTTGAGGCAGATCCAC
CGAGTTATGCATTAGCAGGGTATGAAACAAGCGAGATTGCCGGACTGAAGTTTCCAAAGGGGTTTAAGTT
TGGTGTTGCGGGGGCAGCCATTCAAGTTGAAGGTGCAGCAAAAGCCGAAGGGCGGGGCCCAAGTACCTGG
GATTATCTGTGTCATCACTATGCCAGCACGCAGTGTAACAATTATGATCCCGATATTACAACCAACCATT
ACTACCTGTACCCATTGGACTTTGCGCGCCTGCAACACCTAGGCATTAACACTTACTCGTTTTCAATTTC
ATGGACGCGTATTTATCCATTGGGCGCAGGCTATGTTAATGAAGCAGGGTTAGCCCACTATGATGCCGTA
ATCCATAGTGCCAAGAAGTATGGTCTGGAACCAGTGGGCACCGTTTTTCACTGGGATACGCCACTGTCTC
TGATGCTGAAATACGGTGCCTGGCAAGATACTGGTGACCAAATTGTTAAGGACTTTGTTACCTATGCCAC
AACTGTGTTTAAGCGTTATGGTAATGAAGTCAAGACGTGGTTTACTTTCAATGAACCACGGGTTTTCTGT
TCACAAAATAGTGGTCTGCCATACAATCTGACGTATCCAGAAGGTATTAACAGCACCTCCGCTGTATTTC
GTTGCACCTACAATGTTCTGAAAGCTCATGGTCATGCTGTTAAAGTGTATCGGGATCTAGTTGCCTCCGG
GACCATTGCGGCAGGTGAAATCGGCTTTAAATCCGATGATAACTACCCAATCCCGGCCCGTCCAGGGAAC
GCCGATGACGAGGAATCAGCCAAGCGTCACGAGGCTTTTCGCATTGGGATTTTTGCGCAACCGGTTTATG
GTAATGGCGATTATCCAGATGTTGTTAAAGAAACTGTTGGAGATATGCTGCCGGCCCTGACGGATGAAGA
TAAAGGATACATTAAAGGTAGCGGAGATATTTTTGCGATTGACGGGTATCGTACCGATATTTCCCATGCG
GCTCTGAACGGGATCGCGAATTGTATTCGCAACCAAAGTGACCCGAATTGGCCAGTGTGTGAAGAAGGGT
CAGATCCTTTTGCTCATGTTTACCCATCCGGGTTTGCTATTGGTCAATCAGCCGATCCACTGTCTTCATG
GTTAGTCAACTCAGCCCCGTTTATCCGCGATCAACTGAAGTTTCTGACACAAACCTACCCTGCTAAGGGT
GGTATTTATTTCTCGGAATTTGGTTGGGCTGAAGACGCCGAATATGATCGTCAACTGCTGTATCAAATTA
CCTGGGATGGTCTGCGTACGCAATACCTGACGGACTATCTGAGCCAGCTGCTGTTGGCTGTGCACAAAGA
CGGGATTAATCTGCGAGGCGCGCTGACGTGGAGTTTTGTCGATAATTGGGAGTGGGGTTTAGGGATGCAA
CAGAAATTCGGATTTCAGTTTGTTAATCAATCAGATCCCGATCTGACACGCACGTTTAAACTGAGCGCTC

                    ACGCTTACGCCCAATTTGGGCGTAATCATCTG
```

SEQ ID NO. 2
>gi|345649664|gb|AE014215.1| beta-hexosil transferasa [construcción sintética]

```
MMLHAALLVALPCVVLARPAGAVTYPGAIPLSLTSNYETPSPTAIPLEPTPTATGTAELDALWNLVEAQY
PVQTAAVTTLVTVPDDYKFEADPPSYALAGYETSEIAGLKFPKGFKFGVAGAAIQVEGAAKAEGRGPSTW
DYLCHHYASTQCNNYDPDITTNHYYLYPLDFARLQHLGINTYSFSISWTRIYPLGAGYVNEAGLAHYDAV
IHSAKKYGLEPVGTVFHWDTPLSLMLKYGAWQDTGDQIVKDFVTYATTVFKRYGNEVKTWFTFNEPRVFC
SQNSGLPYNLTYPEGINSTSAVFRCTYNVLKAHGHAVKVYRDLVASGTIAAGEIGFKSDDNYPIPARPGN
ADDEESAKRHEAFRIGIFAQPVYGNGDYPDVVKETVGDMLPALTDEDKGYIKGSGDIFAIDGYRTDISHA
ALNGIANCIRNQSDPNWPVCEEGSDPFAHVYPSGFAIGQSADPLSSWLVNSAPFIRDQLKFLTQTYPAKG
GIYFSEFGWAEDAEYDRQLLYQITWDGLRTQYLTDYLSQLLLAVHKDGINLRGALTWSFVDNWEWGLGMQ
QKFGFQFVNQSDPDLTRTFKLSAHAYAQFGRNHL
```

SEQ ID NO. 3
FP#1 aMF-6XHIS-TEV(Q/M)-rBHT (XhoI-NotI)

ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT
CCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT
TACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT
AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA
TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT CACCACCACCACCACCACGAAAACCTGTATTTT
CAGATGATGCTGCATGCTGCACTGCTAGTAGCGCTGCCATGTGTTGTTTTGGCGCGCCCG
GCCGGAGCGGTTACTTATCCGGGAGCCATTCCTCTGTCCCTGACGAGCAATTACGAAACC
CCAAGTCCGACAGCAATCCCGCTGGAGCCAACACCGACGGCTACCGGTACAGCAGAATTA
GATGCGCTGTGGAACTTAGTCGAAGCTCAGTACCCAGTTCAAACTGCTGCAGTGACAACT
TTGGTGACAGTGCCCGATGATTATAAGTTTGAGGCAGATCCACCGAGTTATGCATTAGCA
GGGTATGAAACAAGCGAGATTGCCGGACTGAAGTTTCCAAAGGGGTTTAAGTTTGGTGTT
GCGGGGGCAGCCATTCAAGTTGAAGGTGCAGCAAAAGCCGAAGGGCGGGGCCCAAGTACC
TGGGATTATCTGTGTCATCACTATGCCAGCACGCAGTGTAACAATTATGATCCCGATATT
ACAACCAACCATTACTACCTGTACCCATTGGACTTTGCGCGCCTGCAACACCTAGGCATT
AACACTTACTCGTTTTCAATTTCATGGACGCGTATTTATCCATTGGGCGCAGGCTATGTT
AATGAAGCAGGGTTAGCCCACTATGATGCCGTAATCCATAGTGCCAAGAAGTATGGTCTG
GAACCAGTGGGCACCGTTTTTCACTGGGATACGCCACTGTCTCTGATGCTGAAATACGGT
GCCTGGCAAGATACTGGTGACCAAATTGTTAAGGACTTTGTTACCTATGCCACAACTGTG
TTTAAGCGTTATGGTAATGAAGTCAAGACGTGGTTTACTTTCAATGAACCACGGGTTTTC
TGTTCACAAAATAGTGGTCTGCCATACAATCTGACGTATCCAGAAGGTATTAACAGCACC
TCCGCTGTATTTCGTTGCACCTACAATGTTCTGAAAGCTCATGGTCATGCTGTTAAAGTG
TATCGGGATCTAGTTGCCTCCGGGACCATTGCGGCAGGTGAAATCGGCTTTAAATCCGAT
GATAACTACCCAATCCCGGCCCGTCCAGGGAACGCCGATGACGAGGAATCAGCCAAGCGT
CACGAGGCTTTTCGCATTGGGATTTTTGCGCAACCGGTTTATGGTAATGGCGATTATCCA
GATGTTGTTAAAGAAACTGTTGGAGATATGCTGCCGGCCCTGACGGATGAAGATAAAGGA
TACATTAAAGGTAGCGGAGATATTTTTGCGATTGACGGGTATCGTACCGATATTTCCCAT
GCGGCTCTGAACGGGATCGCGAATTGTATTCGCAACCAAAGTGACCCGAATTGGCCAGTG
TGTGAAGAAGGGTCAGATCCTTTTGCTCATGTTTACCCATCCGGGTTTGCTATTGGTCAA
TCAGCCGATCCACTGTCTTCATGGTTAGTCAACTCAGCCCCGTTTATCCGCGATCAACTG
AAGTTTCTGACACAAACCTACCCTGCTAAGGGTGGTATTTATTTCTCGGAATTTGGTTGG
GCTGAAGACGCCGAATATGATCGTCAACTGCTGTATCAAATTACCTGGGATGGTCTGCGT
ACGCAATACCTGACGGACTATCTGAGCCAGCTGCTGTTGGCTGTGCACAAAGACGGGATT
AATCTGCGAGGCGCGCTGACGTGGAGTTTTGTCGATAATTGGGAGTGGGGTTTAGGGATG
CAACAGAAATTCGGATTTCAGTTTGTTAATCAATCAGATCCCGATCTGACACGCACGTTT
AAACTGAGCGCTCACGCTTACGCCCAATTTGGGCGTAATCATCTGTAA

SEQ ID NO. 4
FP#1 aMF-6XHIS-TEV(Q/M)-rBHT

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTN
NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEA HHHHHHENLYFQMMLHAALLVALPCVVLARP
AGAVTYPGAIPLSLTSNYETPSPTAIPLEPTPTATGTAELDALWNLVEAQYPVQTAAVTT
LVTVPDDYKFEADPPSYALAGYETSEIAGLKFPKGFKFGVAGAAIQVEGAAKAEGRGPST
WDYLCHHYASTQCNNYDPDITTNHYYLYPLDFARLQHLGINTYSFSISWTRIYPLGAGYV
NEAGLAHYDAVIHSAKKYGLEPVGTVFHWDTPLSLMLKYGAWQDTGDQIVKDFVTYATTV
FKRYGNEVKTWFTFNEPRVFCSQNSGLPYNLTYPEGINSTSAVFRCTYNVLKAHGHAVKV
YRDLVASGTIAAGEIGFKSDDNYPIPARPGNADDEESAKRHEAFRIGIFAQPVYGNGDYP
DVVKETVGDMLPALTDEDKGYIKGSGDIFAIDGYRTDISHAALNGIANCIRNQSDPNWPV
CEEGSDPFAHVYPSGFAIGQSADPLSSWLVNSAPFIRDQLKFLTQTYPAKGGIYFSEFGW
AEDAEYDRQLLYQITWDGLRTQYLTDYLSQLLLAVHKDGINLRGALTWSFVDNWEWGLGM
QQKFGFQFVNQSDPDLTRTFKLSAHAYAQFGRNHL

SEQ ID NO. 5
FP#2 aMF-6XHIS-TEV(Q/M)-rBHT-6XHIS (XhoI-NotI)

ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT
CCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT
TACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT
AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA
TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT CACCACCACCACCACCACGAAAACCTGTATTTT
CAGATGATGCTGCATGCTGCACTGCTAGTAGCGCTGCCATGTGTTGTTTTGGCGCGCCCG
GCCGGAGCGGTTACTTATCCGGGAGCCATTCCTCTGTCCCTGACGAGCAATTACGAAACC
CCAAGTCCGACAGCAATCCCGCTGGAGCCAACACCGACGGCTACCGGTACAGCAGAATTA
GATGCGCTGTGGAACTTAGTCGAAGCTCAGTACCCAGTTCAAACTGCTGCAGTGACAACT
TTGGTGACAGTGCCCGATGATTATAAGTTTGAGGCAGATCCACCGAGTTATGCATTAGCA
GGGTATGAAACAAGCGAGATTGCCGGACTGAAGTTTCCAAAGGGGTTTAAGTTTGGTGTT
GCGGGGGCAGCCATTCAAGTTGAAGGTGCAGCAAAAGCCGAAGGGCGGGGCCCAAGTACC
TGGGATTATCTGTGTCATCACTATGCCAGCACGCAGTGTAACAATTATGATCCCGATATT
ACAACCAACCATTACTACCTGTACCCATTGGACTTTGCGCGCCTGCAACACCTAGGCATT
AACACTTACTCGTTTTCAATTTCATGGACGCGTATTTATCCATTGGGCGCAGGCTATGTT
AATGAAGCAGGGTTAGCCCACTATGATGCCGTAATCCATAGTGCCAAGAAGTATGGTCTG
GAACCAGTGGGCACCGTTTTTCACTGGGATACGCCACTGTCTCTGATGCTGAAATACGGT
GCCTGGCAAGATACTGGTGACCAAATTGTTAAGGACTTTGTTACCTATGCCACAACTGTG
TTTAAGCGTTATGGTAATGAAGTCAAGACGTGGTTTACTTTCAATGAACCACGGGTTTTC
TGTTCACAAAATAGTGGTCTGCCATACAATCTGACGTATCCAGAAGGTATTAACAGCACC
TCCGCTGTATTTCGTTGCACCTACAATGTTCTGAAAGCTCATGGTCATGCTGTTAAAGTG
TATCGGGATCTAGTTGCCTCCGGGACCATTGCGGCAGGTGAAATCGGCTTTAAATCCGAT
GATAACTACCCAATCCCGGCCCGTCCAGGGAACGCCGATGACGAGGAATCAGCCAAGCGT
CACGAGGCTTTTCGCATTGGGATTTTTGCGCAACCGGTTTATGGTAATGGCGATTATCCA
GATGTTGTTAAAGAAACTGTTGGAGATATGCTGCCGGCCCTGACGGATGAAGATAAAGGA
TACATTAAAGGTAGCGGAGATATTTTTGCGATTGACGGGTATCGTACCGATATTTCCCAT
GCGGCTCTGAACGGGATCGCGAATTGTATTCGCAACCAAAGTGACCCGAATTGGCCAGTG
TGTGAAGAAGGGTCAGATCCTTTTGCTCATGTTTACCCATCCGGGTTTGCTATTGGTCAA
TCAGCCGATCCACTGTCTTCATGGTTAGTCAACTCAGCCCCGTTTATCCGCGATCAACTG
AAGTTTCTGACACAAACCTACCCTGCTAAGGGTGGTATTTATTTCTCGGAATTTGGTTGG
GCTGAAGACGCCGAATATGATCGTCAACTGCTGTATCAAATTACCTGGGATGGTCTGCGT
ACGCAATACCTGACGGACTATCTGAGCCAGCTGCTGTTGGCTGTGCACAAAGACGGGATT
AATCTGCGAGGCGCGCTGACGTGGAGTTTTGTCGATAATTGGGAGTGGGGTTTAGGGATG
CAACAGAAATTCGGATTTCAGTTTGTTAATCAATCAGATCCCGATCTGACACGCACGTTT
AAACTGAGCGCTCACGCTTACGCCCAATTTGGGCGTAATCATCTGCACCACCACCACCAC
CACTAA

SEQ ID NO. 6
FP#2 aMF-6XHIS-TEV(Q/M)-rBHT-6XHIS

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTN

NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEA HHHHHHENLYFQMMLHAALLVALPCVVLARP
AGAVTYPGAIPLSLTSNYETPSPTAIPLEPTPTATGTAELDALWNLVEAQYPVQTAAVTT
LVTVPDDYKFEADPPSYALAGYETSEIAGLKFPKGFKFGVAGAAIQVEGAAKAEGRGPST
WDYLCHHYASTQCNNYDPDITTNHYYLYPLDFARLQHLGINTYSFSISWTRIYPLGAGYV
NEAGLAHYDAVIHSAKKYGLEPVGTVFHWDTPLSLMLKYGAWQDTGDQIVKDFVTYATTV
FKRYGNEVKTWFTFNEPRVFCSQNSGLPYNLTYPEGINSTSAVFRCTYNVLKAHGHAVKV
YRDLVASGTIAAGEIGFKSDDNYPIPARPGNADDEESAKRHEAFRIGIFAQPVYGNGDYP
DVVKETVGDMLPALTDEDKGYIKGSGDIFAIDGYRTDISHAALNGIANCIRNQSDPNWPV
CEEGSDPFAHVYPSGFAIGQSADPLSSWLVNSAPFIRDQLKFLTQTYPAKGGIYFSEFGW
AEDAEYDRQLLYQITWDGLRTQYLTDYLSQLLLAVHKDGINLRGALTWSFVDNWEWGLGM
QQKFGFQFVNQSDPDLTRTFKLSAHAYAQFGRNHLHHHHHH

SEQ ID NO. 7
FP#3 aMF-rBHT-6XHIS (XhoI-NotI)

ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT
CCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT
TACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT
AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA
TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT ATGATGCTGCATGCTGCACTGCTAGTAGCGCTG
CCATGTGTTGTTTTGGCGCGCCCGGCCGGAGCGGTTACTTATCCGGGAGCCATTCCTCTG
TCCCTGACGAGCAATTACGAAACCCCAAGTCCGACAGCAATCCCGCTGGAGCCAACACCG
ACGGCTACCGGTACAGCAGAATTAGATGCGCTGTGGAACTTAGTCGAAGCTCAGTACCCA
GTTCAAACTGCTGCAGTGACAACTTTGGTGACAGTGCCCGATGATTATAAGTTTGAGGCA
GATCCACCGAGTTATGCATTAGCAGGGTATGAAACAAGCGAGATTGCCGGACTGAAGTTT
CCAAAGGGGTTTAAGTTTGGTGTTGCGGGGGCAGCCATTCAAGTTGAAGGTGCAGCAAAA
GCCGAAGGGCGGGGCCCAAGTACCTGGGATTATCTGTGTCATCACTATGCCAGCACGCAG
TGTAACAATTATGATCCCGATATTACAACCAACCATTACTACCTGTACCCATTGGACTTT
GCGCGCCTGCAACACCTAGGCATTAACACTTACTCGTTTTCAATTTCATGGACGCGTATT
TATCCATTGGGCGCAGGCTATGTTAATGAAGCAGGGTTAGCCCACTATGATGCCGTAATC
CATAGTGCCAAGAAGTATGGTCTGGAACCAGTGGGCACCGTTTTTCACTGGGATACGCCA
CTGTCTCTGATGCTGAAATACGGTGCCTGGCAAGATACTGGTGACCAAATTGTTAAGGAC
TTTGTTACCTATGCCACAACTGTGTTTAAGCGTTATGGTAATGAAGTCAAGACGTGGTTT
ACTTTCAATGAACCACGGGTTTTCTGTTCACAAAATAGTGGTCTGCCATACAATCTGACG
TATCCAGAAGGTATTAACAGCACCTCCGCTGTATTTCGTTGCACCTACAATGTTCTGAAA
GCTCATGGTCATGCTGTTAAAGTGTATCGGGATCTAGTTGCCTCCGGGACCATTGCGGCA
GGTGAAATCGGCTTTAAATCCGATGATAACTACCCAATCCCGGCCCGTCCAGGGAACGCC
GATGACGAGGAATCAGCCAAGCGTCACGAGGCTTTTCGCATTGGGATTTTTGCGCAACCG
GTTTATGGTAATGGCGATTATCCAGATGTTGTTAAAGAAACTGTTGGAGATATGCTGCCG
GCCCTGACGGATGAAGATAAAGGATACATTAAAGGTAGCGGAGATATTTTTGCGATTGAC
GGGTATCGTACCGATATTTCCCATGCGGCTCTGAACGGGATCGCGAATTGTATTCGCAAC
CAAAGTGACCCGAATTGGCCAGTGTGTGAAGAAGGGTCAGATCCTTTTGCTCATGTTTAC
CCATCCGGGTTTGCTATTGGTCAATCAGCCGATCCACTGTCTTCATGGTTAGTCAACTCA
GCCCCGTTTATCCGCGATCAACTGAAGTTTCTGACACAAACCTACCCTGCTAAGGGTGGT
ATTTATTTCTCGGAATTTGGTTGGGCTGAAGACGCCGAATATGATCGTCAACTGCTGTAT
CAAATTACCTGGGATGGTCTGCGTACGCAATACCTGACGGACTATCTGAGCCAGCTGCTG
TTGGCTGTGCACAAAGACGGGATTAATCTGCGAGGCGCGCTGACGTGGAGTTTTGTCGAT
AATTGGGAGTGGGGTTTAGGGATGCAACAGAAATTCGGATTTCAGTTTGTTAATCAATCA
GATCCCGATCTGACACGCACGTTTAAACTGAGCGCTCACGCTTACGCCCAATTTGGGCGT
AATCATCTGCACCACCACCACCACCACTAA

SEQ ID NO. 8
FP#3 aMF-rBHT-6XHIS

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTN
NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEA MMLHAALLVALPCVVLARPAGAVTYPGAIPL
SLTSNYETPSPTAIPLEPTPTATGTAELDALWNLVEAQYPVQTAAVTTLVTVPDDYKFEA
DPPSYALAGYETSEIAGLKFPKGFKFGVAGAAIQVEGAAKAEGRGPSTWDYLCHHYASTQ

CNNYDPDITTNHYYLYPLDFARLQHLGINTYSFSISWTRIYPLGAGYVNEAGLAHYDAVI
HSAKKYGLEPVGTVFHWDTPLSLMLKYGAWQDTGDQIVKDFVTYATTVFKRYGNEVKTWF
TFNEPRVFCSQNSGLPYNLTYPEGINSTSAVFRCTYNVLKAHGHAVKVYRDLVASGTIAA
GEIGFKSDDNYPIPARPGNADDEESAKRHEAFRIGIFAQPVYGNGDYPDVVKETVGDMLP
ALTDEDKGYIKGSGDIFAIDGYRTDISHAALNGIANCIRNQSDPNWPVCEEGSDPFAHVY
PSGFAIGQSADPLSSWLVNSAPFIRDQLKFLTQTYPAKGGIYFSEFGWAEDAEYDRQLLY
QITWDGLRTQYLTDYLSQLLLAVHKDGINLRGALTWSFVDNWEWGLGMQQKFGFQFVNQS
DPDLTRTFKLSAHAYAQFGRNHLHHHHHH

SEQ ID NO. 9
FP#4 aMF-rBHT (XhoI-NotI)

ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT
CCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT
TACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT
AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA
TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT ATGATGCTGCATGCTGCACTGCTAGTAGCGCTG
CCATGTGTTGTTTTGGCGCGCCCGGCCGGAGCGGTTACTTATCCGGGAGCCATTCCTCTG
TCCCTGACGAGCAATTACGAAACCCCAAGTCCGACAGCAATCCCGCTGGAGCCAACACCG
ACGGCTACCGGTACAGCAGAATTAGATGCGCTGTGGAACTTAGTCGAAGCTCAGTACCCA
GTTCAAACTGCTGCAGTGACAACTTTGGTGACAGTGCCCGATGATTATAAGTTTGAGGCA
GATCCACCGAGTTATGCATTAGCAGGGTATGAAACAAGCGAGATTGCCGGACTGAAGTTT
CCAAAGGGGTTTAAGTTTGGTGTTGCGGGGGCAGCCATTCAAGTTGAAGGTGCAGCAAAA
GCCGAAGGGCGGGGCCCAAGTACCTGGGATTATCTGTGTCATCACTATGCCAGCACGCAG
TGTAACAATTATGATCCCGATATTACAACCAACCATTACTACCTGTACCCATTGGACTTT
GCGCGCCTGCAACACCTAGGCATTAACACTTACTCGTTTTCAATTTCATGGACGCGTATT
TATCCATTGGGCGCAGGCTATGTTAATGAAGCAGGGTTAGCCCACTATGATGCCGTAATC
CATAGTGCCAAGAAGTATGGTCTGGAACCAGTGGGCACCGTTTTTCACTGGGATACGCCA
CTGTCTCTGATGCTGAAATACGGTGCCTGGCAAGATACTGGTGACCAAATTGTTAAGGAC
TTTGTTACCTATGCCACAACTGTGTTTAAGCGTTATGGTAATGAAGTCAAGACGTGGTTT
ACTTTCAATGAACCACGGGTTTTCTGTTCACAAAATAGTGGTCTGCCATACAATCTGACG
TATCCAGAAGGTATTAACAGCACCTCCGCTGTATTTCGTTGCACCTACAATGTTCTGAAA
GCTCATGGTCATGCTGTTAAAGTGTATCGGGATCTAGTTGCCTCCGGGACCATTGCGGCA
GGTGAAATCGGCTTTAAATCCGATGATAACTACCCAATCCCGGCCCGTCCAGGGAACGCC
GATGACGAGGAATCAGCCAAGCGTCACGAGGCTTTTCGCATTGGGATTTTTGCGCAACCG
GTTTATGGTAATGGCGATTATCCAGATGTTGTTAAAGAAACTGTTGGAGATATGCTGCCG
GCCCTGACGGATGAAGATAAAGGATACATTAAAGGTAGCGGAGATATTTTTGCGATTGAC
GGGTATCGTACCGATATTTCCCATGCGGCTCTGAACGGGATCGCGAATTGTATTCGCAAC
CAAAGTGACCCGAATTGGCCAGTGTGTGAAGAAGGGTCAGATCCTTTTGCTCATGTTTAC
CCATCCGGGTTTGCTATTGGTCAATCAGCCGATCCACTGTCTTCATGGTTAGTCAACTCA
GCCCCGTTTATCCGCGATCAACTGAAGTTTCTGACACAAACCTACCCTGCTAAGGGTGGT
ATTTATTTCTCGGAATTTGGTTGGGCTGAAGACGCCGAATATGATCGTCAACTGCTGTAT
CAAATTACCTGGGATGGTCTGCGTACGCAATACCTGACGGACTATCTGAGCCAGCTGCTG
TTGGCTGTGCACAAAGACGGGATTAATCTGCGAGGCGCGCTGACGTGGAGTTTTGTCGAT
AATTGGGAGTGGGGTTTAGGGATGCAACAGAAATTCGGATTTCAGTTTGTTAATCAATCA
GATCCCGATCTGACACGCACGTTTAAACTGAGCGCTCACGCTTACGCCCAATTTGGGCGT
AATCATCTGTAA

SEQ ID NO. 10
FP#4 aMF-rBHT

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTN
NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEA MMLHAALLVALPCVVLARPAGAVTYPGAIPL
SLTSNYETPSPTAIPLEPTPTATGTAELDALWNLVEAQYPVQTAAVTTLVTVPDDYKFEA
DPPSYALAGYETSEIAGLKFPKGFKFGVAGAAIQVEGAAKAEGRGPSTWDYLCHHYASTQ
CNNYDPDITTNHYYLYPLDFARLQHLGINTYSFSISWTRIYPLGAGYVNEAGLAHYDAVI
HSAKKYGLEPVGTVFHWDTPLSLMLKYGAWQDTGDQIVKDFVTYATTVFKRYGNEVKTWF
TFNEPRVFCSQNSGLPYNLTYPEGINSTSAVFRCTYNVLKAHGHAVKVYRDLVASGTIAA

GEIGFKSDDNYPIPARPGNADDEESAKRHEAFRIGIFAQPVYGNGDYPDVVKETVGDMLP
ALTDEDKGYIKGSGDIFAIDGYRTDISHAALNGIANCIRNQSDPNWPVCEEGSDPFAHVY
PSGFAIGQSADPLSSWLVNSAPFIRDQLKFLTQTYPAKGGIYFSEFGWAEDAEYDRQLLY
QITWDGLRTQYLTDYLSQLLLAVHKDGINLRGALTWSFVDNWEWGLGMQQKFGFQFVNQS
DPDLTRTFKLSAHAYAQFGRNHL

SEQ ID NO. 11
FP#5 aMF-rBHT(Δ1-22)-6XHIS (XhoI-NotI)

ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT
CCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT
TACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT
AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA
TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT GTTACTTATCCGGGAGCCATTCCTCTGTCCCTG
ACGAGCAATTACGAAACCCCAAGTCCGACAGCAATCCCGCTGGAGCCAACACCGACGGCT
ACCGGTACAGCAGAATTAGATGCGCTGTGGAACTTAGTCGAAGCTCAGTACCCAGTTCAA
ACTGCTGCAGTGACAACTTTGGTGACAGTGCCCGATGATTATAAGTTTGAGGCAGATCCA
CCGAGTTATGCATTAGCAGGGTATGAAACAAGCGAGATTGCCGGACTGAAGTTTCCAAAG
GGGTTTAAGTTTGGTGTTGCGGGGGCAGCCATTCAAGTTGAAGGTGCAGCAAAAGCCGAA
GGGCGGGGCCCAAGTACCTGGGATTATCTGTGTCATCACTATGCCAGCACGCAGTGTAAC
AATTATGATCCCGATATTACAACCAACCATTACTACCTGTACCCATTGGACTTTGCGCGC
CTGCAACACCTAGGCATTAACACTTACTCGTTTTCAATTTCATGGACGCGTATTTATCCA
TTGGGCGCAGGCTATGTTAATGAAGCAGGGTTAGCCCACTATGATGCCGTAATCCATAGT
GCCAAGAAGTATGGTCTGGAACCAGTGGGCACCGTTTTTCACTGGGATACGCCACTGTCT
CTGATGCTGAAATACGGTGCCTGGCAAGATACTGGTGACCAAATTGTTAAGGACTTTGTT
ACCTATGCCACAACTGTGTTTAAGCGTTATGGTAATGAAGTCAAGACGTGGTTTACTTTC
AATGAACCACGGGTTTTCTGTTCACAAAATAGTGGTCTGCCATACAATCTGACGTATCCA
GAAGGTATTAACAGCACCTCCGCTGTATTTCGTTGCACCTACAATGTTCTGAAAGCTCAT
GGTCATGCTGTTAAAGTGTATCGGGATCTAGTTGCCTCCGGGACCATTGCGGCAGGTGAA
ATCGGCTTTAAATCCGATGATAACTACCCAATCCCGGCCCGTCCAGGGAACGCCGATGAC
GAGGAATCAGCCAAGCGTCACGAGGCTTTTCGCATTGGGATTTTTGCGCAACCGGTTTAT
GGTAATGGCGATTATCCAGATGTTGTTAAAGAAACTGTTGGAGATATGCTGCCGGCCCTG
ACGGATGAAGATAAAGGATACATTAAAGGTAGCGGAGATATTTTTGCGATTGACGGGTAT
CGTACCGATATTTCCCATGCGGCTCTGAACGGGATCGCGAATTGTATTCGCAACCAAAGT
GACCCGAATTGGCCAGTGTGTGAAGAAGGGTCAGATCCTTTTGCTCATGTTTACCCATCC
GGGTTTGCTATTGGTCAATCAGCCGATCCACTGTCTTCATGGTTAGTCAACTCAGCCCCG
TTTATCCGCGATCAACTGAAGTTTCTGACACAAACCTACCCTGCTAAGGGTGGTATTTAT
TTCTCGGAATTTGGTTGGGCTGAAGACGCCGAATATGATCGTCAACTGCTGTATCAAATT
ACCTGGGATGGTCTGCGTACGCAATACCTGACGGACTATCTGAGCCAGCTGCTGTTGGCT
GTGCACAAAGACGGGATTAATCTGCGAGGCGCGCTGACGTGGAGTTTTGTCGATAATTGG
GAGTGGGGTTTAGGGATGCAACAGAAATTCGGATTTCAGTTTGTTAATCAATCAGATCCC
GATCTGACACGCACGTTTAAACTGAGCGCTCACGCTTACGCCCAATTTGGGCGTAATCAT
CTGCACCACCACCACCACCACTAA

SEQ ID NO. 12
FP#5 aMF-rBHT(Δ1-22)-6XHIS

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTN
NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEA VTYPGAIPLSLTSNYETPSPTAIPLEPTPTA
TGTAELDALWNLVEAQYPVQTAAVTTLVTVPDDYKFEADPPSYALAGYETSEIAGLKFPK
GFKFGVAGAAIQVEGAAKAEGRGPSTWDYLCHHYASTQCNNYDPDITTNHYYLYPLDFAR
LQHLGINTYSFSISWTRIYPLGAGYVNEAGLAHYDAVIHSAKKYGLEPVGTVFHWDTPLS
LMLKYGAWQDTGDQIVKDFVTYATTVFKRYGNEVKTWFTFNEPRVFCSQNSGLPYNLTYP
EGINSTSAVFRCTYNVLKAHGHAVKVYRDLVASGTIAAGEIGFKSDDNYPIPARPGNADD
EESAKRHEAFRIGIFAQPVYGNGDYPDVVKETVGDMLPALTDEDKGYIKGSGDIFAIDGY
RTDISHAALNGIANCIRNQSDPNWPVCEEGSDPFAHVYPSGFAIGQSADPLSSWLVNSAP
FIRDQLKFLTQTYPAKGGIYFSEFGWAEDAEYDRQLLYQITWDGLRTQYLTDYLSQLLLA
VHKDGINLRGALTWSFVDNWEWGLGMQQKFGFQFVNQSDPDLTRTFKLSAHAYAQFGRNH

LHHHHHH

SEQ ID NO. 13
FP#6 aMF-rBHT(Δ1-22) (XhoI-NotI)

ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT
CCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT
TACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT
AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA
TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT GTTACTTATCCGGGAGCCATTCCTCTGTCCCTG
ACGAGCAATTACGAAACCCCAAGTCCGACAGCAATCCCGCTGGAGCCAACACCGACGGCT
ACCGGTACAGCAGAATTAGATGCGCTGTGGAACTTAGTCGAAGCTCAGTACCCAGTTCAA
ACTGCTGCAGTGACAACTTTGGTGACAGTGCCCGATGATTATAAGTTTGAGGCAGATCCA
CCGAGTTATGCATTAGCAGGGTATGAAACAAGCGAGATTGCCGGACTGAAGTTTCCAAAG
GGGTTTAAGTTTGGTGTTGCGGGGGCAGCCATTCAAGTTGAAGGTGCAGCAAAAGCCGAA
GGGCGGGGCCCAAGTACCTGGGATTATCTGTGTCATCACTATGCCAGCACGCAGTGTAAC
AATTATGATCCCGATATTACAACCAACCATTACTACCTGTACCCATTGGACTTTGCGCGC
CTGCAACACCTAGGCATTAACACTTACTCGTTTTCAATTTCATGGACGCGTATTTATCCA
TTGGGCGCAGGCTATGTTAATGAAGCAGGGTTAGCCCACTATGATGCCGTAATCCATAGT
GCCAAGAAGTATGGTCTGGAACCAGTGGGCACCGTTTTTCACTGGGATACGCCACTGTCT
CTGATGCTGAAATACGGTGCCTGGCAAGATACTGGTGACCAAATTGTTAAGGACTTTGTT
ACCTATGCCACAACTGTGTTTAAGCGTTATGGTAATGAAGTCAAGACGTGGTTTACTTTC
AATGAACCACGGGTTTTCTGTTCACAAAATAGTGGTCTGCCATACAATCTGACGTATCCA
GAAGGTATTAACAGCACCTCCGCTGTATTTCGTTGCACCTACAATGTTCTGAAAGCTCAT
GGTCATGCTGTTAAAGTGTATCGGGATCTAGTTGCCTCCGGGACCATTGCGGCAGGTGAA
ATCGGCTTTAAATCCGATGATAACTACCCAATCCCGGCCCGTCCAGGGAACGCCGATGAC
GAGGAATCAGCCAAGCGTCACGAGGCTTTTCGCATTGGGATTTTTGCGCAACCGGTTTAT
GGTAATGGCGATTATCCAGATGTTGTTAAAGAAACTGTTGGAGATATGCTGCCGGCCCTG
ACGGATGAAGATAAAGGATACATTAAAGGTAGCGGAGATATTTTTGCGATTGACGGGTAT
CGTACCGATATTTCCCATGCGGCTCTGAACGGGATCGCGAATTGTATTCGCAACCAAAGT
GACCCGAATTGGCCAGTGTGTGAAGAAGGGTCAGATCCTTTTGCTCATGTTTACCCATCC
GGGTTTGCTATTGGTCAATCAGCCGATCCACTGTCTTCATGGTTAGTCAACTCAGCCCCG
TTTATCCGCGATCAACTGAAGTTTCTGACACAAACCTACCCTGCTAAGGGTGGTATTTAT
TTCTCGGAATTTGGTTGGGCTGAAGACGCCGAATATGATCGTCAACTGCTGTATCAAATT
ACCTGGGATGGTCTGCGTACGCAATACCTGACGGACTATCTGAGCCAGCTGCTGTTGGCT
GTGCACAAAGACGGGATTAATCTGCGAGGCGCGCTGACGTGGAGTTTTGTCGATAATTGG
GAGTGGGGTTTAGGGATGCAACAGAAATTCGGATTTCAGTTTGTTAATCAATCAGATCCC
GATCTGACACGCACGTTTAAACTGAGCGCTCACGCTTACGCCCAATTTGGGCGTAATCAT
CTGTAA

SEQ ID NO. 14
FP#6 aMF-rBHT(Δ1-22)

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTN
NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEA VTYPGAIPLSLTSNYETPSPTAIPLEPTPTA
TGTAELDALWNLVEAQYPVQTAAVTTLVTVPDDYKFEADPPSYALAGYETSEIAGLKFPK
GFKFGVAGAAIQVEGAAKAEGRGPSTWDYLCHHYASTQCNNYDPDITTNHYYLYPLDFAR
LQHLGINTYSFSISWTRIYPLGAGYVNEAGLAHYDAVIHSAKKYGLEPVGTVFHWDTPLS
LMLKYGAWQDTGDQIVKDFVTYATTVFKRYGNEVKTWFTFNEPRVFCSQNSGLPYNLTYP
EGINSTSAVFRCTYNVLKAHGHAVKVYRDLVASGTIAAGEIGFKSDDNYPIPARPGNADD
EESAKRHEAFRIGIFAQPVYGNGDYPDVVKETVGDMLPALTDEDKGYIKGSGDIFAIDGY
RTDISHAALNGIANCIRNQSDPNWPVCEEGSDPFAHVYPSGFAIGQSADPLSSWLVNSAP
FIRDQLKFLTQTYPAKGGIYFSEFGWAEDAEYDRQLLYQITWDGLRTQYLTDYLSQLLLA
VHKDGINLRGALTWSFVDNWEWGLGMQQKFGFQFVNQSDPDLTRTFKLSAHAYAQFGRNH
L

Seq. ID No. 15
FP#7 rBHT-6XHIS (BamHI-NotI)-

ATGATGCTGCATGCTGCACTGCTAGTAGCGCTGCCATGTGTTGTTTTGGCGCGCCCGGCC
GGAGCGGTTACTTATCCGGGAGCCATTCCTCTGTCCCTGACGAGCAATTACGAAACCCCA
AGTCCGACAGCAATCCCGCTGGAGCCAACACCGACGGCTACCGGTACAGCAGAATTAGAT
GCGCTGTGGAACTTAGTCGAAGCTCAGTACCCAGTTCAAACTGCTGCAGTGACAACTTTG
GTGACAGTGCCCGATGATTATAAGTTTGAGGCAGATCCACCGAGTTATGCATTAGCAGGG
TATGAAACAAGCGAGATTGCCGGACTGAAGTTTCCAAAGGGGTTTAAGTTTGGTGTTGCG
GGGGCAGCCATTCAAGTTGAAGGTGCAGCAAAAGCCGAAGGGCGGGGCCCAAGTACCTGG
GATTATCTGTGTCATCACTATGCCAGCACGCAGTGTAACAATTATGATCCCGATATTACA
ACCAACCATTACTACCTGTACCCATTGGACTTTGCGCGCCTGCAACACCTAGGCATTAAC
ACTTACTCGTTTTCAATTTCATGGACGCGTATTTATCCATTGGGCGCAGGCTATGTTAAT
GAAGCAGGGTTAGCCCACTATGATGCCGTAATCCATAGTGCCAAGAAGTATGGTCTGGAA
CCAGTGGGCACCGTTTTTCACTGGGATACGCCACTGTCTCTGATGCTGAAATACGGTGCC
TGGCAAGATACTGGTGACCAAATTGTTAAGGACTTTGTTACCTATGCCACAACTGTGTTT
AAGCGTTATGGTAATGAAGTCAAGACGTGGTTTACTTTCAATGAACCACGGGTTTTCTGT
TCACAAAATAGTGGTCTGCCATACAATCTGACGTATCCAGAAGGTATTAACAGCACCTCC
GCTGTATTTCGTTGCACCTACAATGTTCTGAAAGCTCATGGTCATGCTGTTAAAGTGTAT
CGGGATCTAGTTGCCTCCGGGACCATTGCGGCAGGTGAAATCGGCTTTAAATCCGATGAT
AACTACCCAATCCCGGCCCGTCCAGGGAACGCCGATGACGAGGAATCAGCCAAGCGTCAC
GAGGCTTTTCGCATTGGGATTTTTGCGCAACCGGTTTATGGTAATGGCGATTATCCAGAT
GTTGTTAAAGAAACTGTTGGAGATATGCTGCCGGCCCTGACGGATGAAGATAAAGGATAC
ATTAAAGGTAGCGGAGATATTTTTGCGATTGACGGGTATCGTACCGATATTTCCCATGCG
GCTCTGAACGGGATCGCGAATTGTATTCGCAACCAAAGTGACCCGAATTGGCCAGTGTGT
GAAGAAGGGTCAGATCCTTTTGCTCATGTTTACCCATCCGGGTTTGCTATTGGTCAATCA
GCCGATCCACTGTCTTCATGGTTAGTCAACTCAGCCCCGTTTATCCGCGATCAACTGAAG
TTTCTGACACAAACCTACCCTGCTAAGGGTGGTATTTATTTCTCGGAATTTGGTTGGGCT
GAAGACGCCGAATATGATCGTCAACTGCTGTATCAAATTACCTGGGATGGTCTGCGTACG
CAATACCTGACGGACTATCTGAGCCAGCTGCTGTTGGCTGTGCACAAAGACGGGATTAAT
CTGCGAGGCGCGCTGACGTGGAGTTTTGTCGATAATTGGGAGTGGGGTTTAGGGATGCAA
CAGAAATTCGGATTTCAGTTTGTTAATCAATCAGATCCCGATCTGACACGCACGTTTAAA
CTGAGCGCTCACGCTTACGCCCAATTTGGGCGTAATCATCTGCACCACCACCACCACCAC
TAA

SEQ ID NO. 16
FP#7 rBHT-6XHIS

MMLHAALLVALPCVVLARPAGAVTYPGAIPLSLTSNYETPSPTAIPLEPTPTATGTAELD
ALWNLVEAQYPVQTAAVTTLVTVPDDYKFEADPPSYALAGYETSEIAGLKFPKGFKFGVA
GAAIQVEGAAKAEGRGPSTWDYLCHHYASTQCNNYDPDITTNHYYLYPLDFARLQHLGIN
TYSFSISWTRIYPLGAGYVNEAGLAHYDAVIHSAKKYGLEPVGTVFHWDTPLSLMLKYGA
WQDTGDQIVKDFVTYATTVFKRYGNEVKTWFTFNEPRVFCSQNSGLPYNLTYPEGINSTS
AVFRCTYNVLKAHGHAVKVYRDLVASGTIAAGEIGFKSDDNYPIPARPGNADDEESAKRH
EAFRIGIFAQPVYGNGDYPDVVKETVGDMLPALTDEDKGYIKGSGDIFAIDGYRTDISHA
ALNGIANCIRNQSDPNWPVCEEGSDPFAHVYPSGFAIGQSADPLSSWLVNSAPFIRDQLK
FLTQTYPAKGGIYFSEFGWAEDAEYDRQLLYQITWDGLRTQYLTDYLSQLLLAVHKDGIN
LRGALTWSFVDNWEWGLGMQQKFGFQFVNQSDPDLTRTFKLSAHAYAQFGRNHLHHHHHH

SEQ ID NO. 17
FP#8 rBHT(Δ1-22)-6XHIS (BamHI-NotI)

ATGGTTACTTATCCGGGAGCCATTCCTCTGTCCCTGACGAGCAATTACGAAACCCCAAGT
CCGACAGCAATCCCGCTGGAGCCAACACCGACGGCTACCGGTACAGCAGAATTAGATGCG
CTGTGGAACTTAGTCGAAGCTCAGTACCCAGTTCAAACTGCTGCAGTGACAACTTTGGTG
ACAGTGCCCGATGATTATAAGTTTGAGGCAGATCCACCGAGTTATGCATTAGCAGGGTAT

GAAACAAGCGAGATTGCCGGACTGAAGTTTCCAAAGGGGTTTAAGTTTGGTGTTGCGGGG
GCAGCCATTCAAGTTGAAGGTGCAGCAAAAGCCGAAGGGCGGGGCCCAAGTACCTGGGAT
TATCTGTGTCATCACTATGCCAGCACGCAGTGTAACAATTATGATCCCGATATTACAACC
AACCATTACTACCTGTACCCATTGGACTTTGCGCGCCTGCAACACCTAGGCATTAACACT
TACTCGTTTTCAATTTCATGGACGCGTATTTATCCATTGGGCGCAGGCTATGTTAATGAA
GCAGGGTTAGCCCACTATGATGCCGTAATCCATAGTGCCAAGAAGTATGGTCTGGAACCA
GTGGGCACCGTTTTTCACTGGGATACGCCACTGTCTCTGATGCTGAAATACGGTGCCTGG
CAAGATACTGGTGACCAAATTGTTAAGGACTTTGTTACCTATGCCACAACTGTGTTTAAG
CGTTATGGTAATGAAGTCAAGACGTGGTTTACTTTCAATGAACCACGGGTTTTCTGTTCA
CAAAATAGTGGTCTGCCATACAATCTGACGTATCCAGAAGGTATTAACAGCACCTCCGCT
GTATTTCGTTGCACCTACAATGTTCTGAAAGCTCATGGTCATGCTGTTAAAGTGTATCGG
GATCTAGTTGCCTCCGGGACCATTGCGGCAGGTGAAATCGGCTTTAAATCCGATGATAAC
TACCCAATCCCGGCCCGTCCAGGGAACGCCGATGACGAGGAATCAGCCAAGCGTCACGAG
GCTTTTCGCATTGGGATTTTTGCGCAACCGGTTTATGGTAATGGCGATTATCCAGATGTT
GTTAAAGAAACTGTTGGAGATATGCTGCCGGCCCTGACGGATGAAGATAAAGGATACATT
AAAGGTAGCGGAGATATTTTTGCGATTGACGGGTATCGTACCGATATTTCCCATGCGGCT
CTGAACGGGATCGCGAATTGTATTCGCAACCAAAGTGACCCGAATTGGCCAGTGTGTGAA
GAAGGGTCAGATCCTTTTGCTCATGTTTACCCATCCGGGTTTGCTATTGGTCAATCAGCC
GATCCACTGTCTTCATGGTTAGTCAACTCAGCCCCGTTTATCCGCGATCAACTGAAGTTT
CTGACACAAACCTACCCTGCTAAGGGTGGTATTTATTTCTCGGAATTTGGTTGGGCTGAA
GACGCCGAATATGATCGTCAACTGCTGTATCAAATTACCTGGGATGGTCTGCGTACGCAA
TACCTGACGGACTATCTGAGCCAGCTGCTGTTGGCTGTGCACAAAGACGGGATTAATCTG
CGAGGCGCGCTGACGTGGAGTTTTGTCGATAATTGGGAGTGGGGTTTAGGGATGCAACAG
AAATTCGGATTTCAGTTTGTTAATCAATCAGATCCCGATCTGACACGCACGTTTAAACTG
AGCGCTCACGCTTACGCCCAATTTGGGCGTAATCATCTGCACCACCACCACCACCACTAA

SEQ ID NO. 18
FP#8 rBHT(Δ1-22)-6XHIS

MVTYPGAIPLSLTSNYETPSPTAIPLEPTPTATGTAELDALWNLVEAQYPVQTAAVTTLV
TVPDDYKFEADPPSYALAGYETSEIAGLKFPKGFKFGVAGAAIQVEGAAKAEGRGPSTWD
YLCHHYASTQCNNYDPDITTNHYYLYPLDFARLQHLGINTYSFSISWTRIYPLGAGYVNE
AGLAHYDAVIHSAKKYGLEPVGTVFHWDTPLSLMLKYGAWQDTGDQIVKDFVTYATTVFK
RYGNEVKTWFTFNEPRVFCSQNSGLPYNLTYPEGINSTSAVFRCTYNVLKAHGHAVKVYR
DLVASGTIAAGEIGFKSDDNYPIPARPGNADDEESAKRHEAFRIGIFAQPVYGNGDYPDV
VKETVGDMLPALTDEDKGYIKGSGDIFAIDGYRTDISHAALNGIANCIRNQSDPNWPVCE
EGSDPFAHVYPSGFAIGQSADPLSSWLVNSAPFIRDQLKFLTQTYPAKGGIYFSEFGWAE
DAEYDRQLLYQITWDGLRTQYLTDYLSQLLLAVHKDGINLRGALTWSFVDNWEWGLGMQQ
KFGFQFVNQSDPDLTRTFKLSAHAYAQFGRNHLHHHHHH

SEQ ID NO. 19
FP#9 aMF-rBHT(Δ1-110)-6XHIS (EcoRI-NotI)

ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT
CCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT
TACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT
AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA
TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTACGTAGAATTC ATGTTTCCAAAGGGGTTTAAG
TTTGGTGTTGCGGGGGCAGCCATTCAAGTTGAAGGTGCAGCAAAAGCCGAAGGGCGGGGC
CCAAGTACCTGGGATTATCTGTGTCATCACTATGCCAGCACGCAGTGTAACAATTATGAT
CCCGATATTACAACCAACCATTACTACCTGTACCCATTGGACTTTGCGCGCCTGCAACAC
CTAGGCATTAACACTTACTCGTTTTCAATTTCATGGACGCGTATTTATCCATTGGGCGCA
GGCTATGTTAATGAAGCAGGGTTAGCCCACTATGATGCCGTAATCCATAGTGCCAAGAAG
TATGGTCTGGAACCAGTGGGCACCGTTTTTCACTGGGATACGCCACTGTCTCTGATGCTG
AAATACGGTGCCTGGCAAGATACTGGTGACCAAATTGTTAAGGACTTTGTTACCTATGCC
ACAACTGTGTTTAAGCGTTATGGTAATGAAGTCAAGACGTGGTTTACTTTCAATGAACCA
CGGGTTTTCTGTTCACAAAATAGTGGTCTGCCATACAATCTGACGTATCCAGAAGGTATT
AACAGCACCTCCGCTGTATTTCGTTGCACCTACAATGTTCTGAAAGCTCATGGTCATGCT

GTTAAAGTGTATCGGGATCTAGTTGCCTCCGGGACCATTGCGGCAGGTGAAATCGGCTTT
AAATCCGATGATAACTACCCAATCCCGGCCCGTCCAGGGAACGCCGATGACGAGGAATCA
GCCAAGCGTCACGAGGCTTTTCGCATTGGGATTTTTGCGCAACCGGTTTATGGTAATGGC
GATTATCCAGATGTTGTTAAAGAAACTGTTGGAGATATGCTGCCGGCCCTGACGGATGAA
GATAAAGGATACATTAAAGGTAGCGGAGATATTTTTGCGATTGACGGGTATCGTACCGAT
ATTTCCCATGCGGCTCTGAACGGGATCGCGAATTGTATTCGCAACCAAAGTGACCCGAAT
TGGCCAGTGTGTGAAGAAGGGTCAGATCCTTTTGCTCATGTTTACCCATCCGGGTTTGCT
ATTGGTCAATCAGCCGATCCACTGTCTTCATGGTTAGTCAACTCAGCCCCGTTTATCCGC
GATCAACTGAAGTTTCTGACACAAACCTACCCTGCTAAGGGTGGTATTTATTTCTCGGAA
TTTGGTTGGGCTGAAGACGCCGAATATGATCGTCAACTGCTGTATCAAATTACCTGGGAT
GGTCTGCGTACGCAATACCTGACGGACTATCTGAGCCAGCTGCTGTTGGCTGTGCACAAA
GACGGGATTAATCTGCGAGGCGCGCTGACGTGGAGTTTTGTCGATAATTGGGAGTGGGGT
TTAGGGATGCAACAGAAATTCGGATTTCAGTTTGTTAATCAATCAGATCCCGATCTGACA
CGCACGTTTAAACTGAGCGCTCACGCTTACGCCCAATTTGGGCGTAATCATCTGCACCAC
CACCACCACCACTAA

SEQ ID NO. 20
FP#9 aMF-rBHT(Δ1-110)-6XHIS

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTN
NGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEAYVEF MFPKGFKFGVAGAAIQVEGAAKAEGRG
PSTWDYLCHHYASTQCNNYDPDITTNHYYLYPLDFARLQHLGINTYSFSISWTRIYPLGA
GYVNEAGLAHYDAVIHSAKKYGLEPVGTVFHWDTPLSLMLKYGAWQDTGDQIVKDFVTYA
TTVFKRYGNEVKTWFTFNEPRVFCSQNSGLPYNLTYPEGINSTSAVFRCTYNVLKAHGHA
VKVYRDLVASGTIAAGEIGFKSDDNYPIPARPGNADDEESAKRHEAFRIGIFAQPVYGNG
DYPDVVKETVGDMLPALTDEDKGYIKGSGDIFAIDGYRTDISHAALNGIANCIRNQSDPN
WPVCEEGSDPFAHVYPSGFAIGQSADPLSSWLVNSAPFIRDQLKFLTQTYPAKGGIYFSE
FGWAEDAEYDRQLLYQITWDGLRTQYLTDYLSQLLLAVHKDGINLRGALTWSFVDNWEWG
LGMQQKFGFQFVNQSDPDLTRTFKLSAHAYAQFGRNHLHHHHHH

Listado de secuencias

<110> Universidad Estatal de Carolina del Norte
<120> Beta-Hexosil-Transferasas y usos de las mismas
<130> NS12009WO
<150> 61/734,742
<151> 2012-12-07
<160> 27
<170> versión 3.5 de la Patente
<210> 1
<211> 1782
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 1

```
atgatgctgc atgctgcact gctagtagcg ctgccatgtg ttgttttggc gcgcccggcc      60
ggagcggtta cttatccggg agccattcct ctgtccctga cgagcaatta cgaaacccca     120
agtccgacag caatcccgct ggagccaaca ccgacggcta ccggtacagc agaattagat     180
gcgctgtgga acttagtcga agctcagtac ccagttcaaa ctgctgcagt gacaactttg     240
gtgacagtgc ccgatgatta taagtttgag gcagatccac cgagttatgc attagcaggg     300
tatgaaacaa gcgagattgc cggactgaag tttccaaagg ggtttaagtt tggtgttgcg     360
ggggcagcca ttcaagttga aggtgcagca aaagccgaag ggcggggccc aagtacctgg     420
gattatctgt gtcatcacta tgccagcacg cagtgtaaca attatgatcc cgatattaca     480
accaaccatt actacctgta cccattggac tttgcgcgcc tgcaacacct aggcattaac     540
acttactcgt tttcaatttc atggacgcgt atttatccat tgggcgcagg ctatgttaat     600
gaagcagggt tagcccacta tgatgccgta atccatagtg ccaagaagta tggtctggaa     660
ccagtgggca ccgtttttca ctgggatacg ccactgtctc tgatgctgaa atacggtgcc     720
tggcaagata ctggtgacca aattgttaag gactttgtta cctatgccac aactgtgttt     780
aagcgttatg gtaatgaagt caagacgtgg tttactttca atgaaccacg ggttttctgt     840
tcacaaaata gtggtctgcc atacaatctg acgtatccag aaggtattaa cagcacctcc     900
gctgtatttc gttgcaccta caatgttctg aaagctcatg gtcatgctgt taaagtgtat     960
cgggatctag ttgcctccgg gaccattgcg gcaggtgaaa tcggctttaa atccgatgat    1020
aactacccaa tcccggcccg tccagggaac gccgatgacg aggaatcagc caagcgtcac    1080
gaggcttttc gcattgggat ttttgcgcaa ccggtttatg gtaatggcga ttatccagat    1140
gttgttaaag aaactgttgg agatatgctg ccggccctga cggatgaaga taaaggatac    1200
attaaaggta gcggagatat ttttgcgatt gacgggtatc gtaccgatat ttcccatgcg    1260
gctctgaacg ggatcgcgaa ttgtattcgc aaccaaagtg acccgaattg gccagtgtgt    1320
gaagaagggt cagatccttt tgctcatgtt tacccatccg ggtttgctat tggtcaatca    1380
gccgatccac tgtcttcatg gttagtcaac tcagccccgt ttatccgcga tcaactgaag    1440
tttctgacac aaacctaccc tgctaagggt ggtatttatt tctcggaatt tggttgggct    1500
gaagacgccg aatatgatcg tcaactgctg tatcaaatta cctgggatgg tctgcgtacg    1560
caatacctga cggactatct gagccagctg ctgttggctg tgcacaaaga cgggattaat    1620
ctgcgaggcg cgctgacgtg gagttttgtc gataattggg agtggggttt agggatgcaa    1680
cagaaattcg gatttcagtt tgttaatcaa tcagatcccg atctgacacg cacgtttaaa    1740
ctgagcgctc acgcttacgc ccaatttggg cgtaatcatc tg                       1782
```

<210> 2

<211> 594
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 2

```
Met Met Leu His Ala Ala Leu Leu Val Ala Leu Pro Cys Val Val Leu
1               5                   10                  15

Ala Arg Pro Ala Gly Ala Val Thr Tyr Pro Gly Ala Ile Pro Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Thr Ser Asn Tyr Glu Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ile Pro Leu Glu
        35                  40                  45

Pro Thr Pro Thr Ala Thr Gly Thr Ala Glu Leu Asp Ala Leu Trp Asn
    50                  55                  60

Leu Val Glu Ala Gln Tyr Pro Val Gln Thr Ala Ala Val Thr Thr Leu
65                  70                  75                  80

Val Thr Val Pro Asp Asp Tyr Lys Phe Glu Ala Asp Pro Pro Ser Tyr
                85                  90                  95

Ala Leu Ala Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ile Ala Gly Leu Lys Phe Pro
            100                 105                 110

Lys Gly Phe Lys Phe Gly Val Ala Gly Ala Ala Ile Gln Val Glu Gly
        115                 120                 125
```

Ala Ala Lys Ala Glu Gly Arg Gly Pro Ser Thr Trp Asp Tyr Leu Cys
130 135 140

His His Tyr Ala Ser Thr Gln Cys Asn Asn Tyr Asp Pro Asp Ile Thr
145 150 155 160

Thr Asn His Tyr Tyr Leu Tyr Pro Leu Asp Phe Ala Arg Leu Gln His
165 170 175

Leu Gly Ile Asn Thr Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Trp Thr Arg Ile Tyr
180 185 190

Pro Leu Gly Ala Gly Tyr Val Asn Glu Ala Gly Leu Ala His Tyr Asp
195 200 205

Ala Val Ile His Ser Ala Lys Lys Tyr Gly Leu Glu Pro Val Gly Thr
210 215 220

Val Phe His Trp Asp Thr Pro Leu Ser Leu Met Leu Lys Tyr Gly Ala
225 230 235 240

Trp Gln Asp Thr Gly Asp Gln Ile Val Lys Asp Phe Val Thr Tyr Ala
245 250 255

Thr Thr Val Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Glu Val Lys Thr Trp Phe Thr
260 265 270

Phe Asn Glu Pro Arg Val Phe Cys Ser Gln Asn Ser Gly Leu Pro Tyr
275 280 285

Asn Leu Thr Tyr Pro Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ser Ala Val Phe Arg
290 295 300

Cys Thr Tyr Asn Val Leu Lys Ala His Gly His Ala Val Lys Val Tyr
305 310 315 320

Arg Asp Leu Val Ala Ser Gly Thr Ile Ala Ala Gly Glu Ile Gly Phe
325 330 335

Lys Ser Asp Asp Asn Tyr Pro Ile Pro Ala Arg Pro Gly Asn Ala Asp
340 345 350

Asp Glu Glu Ser Ala Lys Arg His Glu Ala Phe Arg Ile Gly Ile Phe
355 360 365

Ala Gln Pro Val Tyr Gly Asn Gly Asp Tyr Pro Asp Val Val Lys Glu
370 375 380

Thr Val Gly Asp Met Leu Pro Ala Leu Thr Asp Glu Asp Lys Gly Tyr
385 390 395 400

Ile Lys Gly Ser Gly Asp Ile Phe Ala Ile Asp Gly Tyr Arg Thr Asp
405 410 415

Ile Ser His Ala Ala Leu Asn Gly Ile Ala Asn Cys Ile Arg Asn Gln
420 425 430

Ser Asp Pro Asn Trp Pro Val Cys Glu Glu Gly Ser Asp Pro Phe Ala
435 440 445

His Val Tyr Pro Ser Gly Phe Ala Ile Gly Gln Ser Ala Asp Pro Leu
450 455 460

Ser Ser Trp Leu Val Asn Ser Ala Pro Phe Ile Arg Asp Gln Leu Lys
465 470 475 480

Phe Leu Thr Gln Thr Tyr Pro Ala Lys Gly Gly Ile Tyr Phe Ser Glu
485 490 495

Phe Gly Trp Ala Glu Asp Ala Glu Tyr Asp Arg Gln Leu Leu Tyr Gln
500 505 510

Ile Thr Trp Asp Gly Leu Arg Thr Gln Tyr Leu Thr Asp Tyr Leu Ser
515 520 525

Gln Leu Leu Leu Ala Val His Lys Asp Gly Ile Asn Leu Arg Gly Ala
530 535 540

Leu Thr Trp Ser Phe Val Asp Asn Trp Glu Trp Gly Leu Gly Met Gln
545 550 555 560

Gln Lys Phe Gly Phe Gln Phe Val Asn Gln Ser Asp Pro Asp Leu Thr
565 570 575

Arg Thr Phe Lys Leu Ser Ala His Ala Tyr Ala Gln Phe Gly Arg Asn
580 585 590

His Leu
<210> 3
<211> 2088
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético

<400> 3

```
atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt     120
tactcagatt tagaagggga tttcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat     180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta     240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagctcac caccaccacc accacgaaaa cctgtatttt     300
cagatgatgc tgcatgctgc actgctagta gcgctgccat gtgttgtttt ggcgcgcccg     360
gccggagcgg ttacttatcc gggagccatt cctctgtccc tgacgagcaa ttacgaaacc     420
ccaagtccga cagcaatccc gctggagcca acaccgacgg ctaccggtac agcagaatta     480
gatgcgctgt ggaacttagt cgaagctcag tacccagttc aaactgctgc agtgacaact     540
ttggtgacag tgcccgatga ttataagttt gaggcagatc caccgagtta tgcattagca     600
gggtatgaaa caagcgagat tgccggactg aagtttccaa aggggtttaa gtttggtgtt     660
gcgggggcag ccattcaagt tgaaggtgca gcaaaagccg aagggcgggg cccaagtacc     720
tgggattatc tgtgtcatca ctatgccagc acgcagtgta acaattatga tcccgatatt     780
acaaccaacc attactacct gtacccattg gactttgcgc gcctgcaaca cctaggcatt     840
aacacttact cgttttcaat ttcatggacg cgtatttatc cattgggcgc aggctatgtt     900
aatgaagcag ggttagccca ctatgatgcc gtaatccata gtgccaagaa gtatggtctg     960
gaaccagtgg gcaccgtttt tcactgggat acgccactgt ctctgatgct gaaatacggt    1020
gcctggcaag atactggtga ccaaattgtt aaggactttg ttacctatgc cacaactgtg    1080
tttaagcgtt atggtaatga agtcaagacg tggtttactt tcaatgaacc acgggttttc    1140
tgttcacaaa atagtggtct gccatacaat ctgacgtatc cagaaggtat taacagcacc    1200
tccgctgtat ttcgttgcac ctacaatgtt ctgaaagctc atggtcatgc tgttaaagtg    1260
tatcgggatc tagttgcctc cgggaccatt gcggcaggtg aaatcggctt taaatccgat    1320
gataactacc caatcccggc ccgtccaggg aacgccgatg acgaggaatc agccaagcgt    1380
cacgaggctt ttcgcattgg gatttttgcg caaccggttt atggtaatgg cgattatcca    1440
gatgttgtta aagaaactgt tggagatatg ctgccggccc tgacggatga agataaagga    1500
tacattaaag gtagcggaga tatttttgcg attgacgggt atcgtaccga tatttcccat    1560
gcggctctga acgggatcgc gaattgtatt cgcaaccaaa gtgacccgaa ttggccagtg    1620
tgtgaagaag ggtcagatcc ttttgctcat gtttacccat ccgggtttgc tattggtcaa    1680
tcagccgatc cactgtcttc atggttagtc aactcagccc cgtttatccg cgatcaactg    1740
aagtttctga cacaaaccta ccctgctaag ggtggtattt atttctcgga atttggttgg    1800
```

gctgaagacg ccgaatatga tcgtcaactg ctgtatcaaa ttacctggga tggtctgcgt 1860

acgcaatacc tgacggacta tctgagccag ctgctgttgg ctgtgcacaa agacgggatt 1920

aatctgcgag gcgcgctgac gtggagtttt gtcgataatt gggagtgggg tttagggatg 1980

caacagaaat tcggatttca gtttgttaat caatcagatc ccgatctgac acgcacgttt 2040

aaactgagcg ctcacgctta cgcccaattt gggcgtaatc atctgtaa 2088

<210> 4
<211> 695
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 4

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

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

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

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala His His His His His His Glu
85 90 95

Asn Leu Tyr Phe Gln Met Met Leu His Ala Ala Leu Leu Val Ala Leu
100 105 110

Pro Cys Val Val Leu Ala Arg Pro Ala Gly Ala Val Thr Tyr Pro Gly
115 120 125

Ala Ile Pro Leu Ser Leu Thr Ser Asn Tyr Glu Thr Pro Ser Pro Thr
130 135 140

Ala Ile Pro Leu Glu Pro Thr Pro Thr Ala Thr Gly Thr Ala Glu Leu
145 150 155 160

Asp Ala Leu Trp Asn Leu Val Glu Ala Gln Tyr Pro Val Gln Thr Ala

165 170 175

Ala Val Thr Thr Leu Val Thr Val Pro Asp Asp Tyr Lys Phe Glu Ala
180 185 190

Asp Pro Pro Ser Tyr Ala Leu Ala Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ile Ala
195 200 205

Gly Leu Lys Phe Pro Lys Gly Phe Lys Phe Gly Val Ala Gly Ala Ala
210 215 220

Ile Gln Val Glu Gly Ala Ala Lys Ala Glu Gly Arg Gly Pro Ser Thr
225 230 235 240

Trp Asp Tyr Leu Cys His His Tyr Ala Ser Thr Gln Cys Asn Asn Tyr
245 250 255

Asp Pro Asp Ile Thr Thr Asn His Tyr Tyr Leu Tyr Pro Leu Asp Phe
260 265 270

Ala Arg Leu Gln His Leu Gly Ile Asn Thr Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
275 280 285

Trp Thr Arg Ile Tyr Pro Leu Gly Ala Gly Tyr Val Asn Glu Ala Gly
290 295 300

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

Glu Pro Val Gly Thr Val Phe His Trp Asp Thr Pro Leu Ser Leu Met
325 330 335

Leu Lys Tyr Gly Ala Trp Gln Asp Thr Gly Asp Gln Ile Val Lys Asp
340 345 350

Phe Val Thr Tyr Ala Thr Thr Val Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Glu Val
355 360 365

Lys Thr Trp Phe Thr Phe Asn Glu Pro Arg Val Phe Cys Ser Gln Asn
370 375 380

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

Ser Ala Val Phe Arg Cys Thr Tyr Asn Val Leu Lys Ala His Gly His
405 410 415

Ala Val Lys Val Tyr Arg Asp Leu Val Ala Ser Gly Thr Ile Ala Ala
420 425 430

Gly Glu Ile Gly Phe Lys Ser Asp Asp Asn Tyr Pro Ile Pro Ala Arg
435 440 445

Pro Gly Asn Ala Asp Asp Glu Glu Ser Ala Lys Arg His Glu Ala Phe
450 455 460

Arg Ile Gly Ile Phe Ala Gln Pro Val Tyr Gly Asn Gly Asp Tyr Pro
465 470 475 480

Asp Val Val Lys Glu Thr Val Gly Asp Met Leu Pro Ala Leu Thr Asp
485 490 495

Glu Asp Lys Gly Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Asp Ile Phe Ala Ile Asp
500 505 510

Gly Tyr Arg Thr Asp Ile Ser His Ala Ala Leu Asn Gly Ile Ala Asn
515 520 525

Cys Ile Arg Asn Gln Ser Asp Pro Asn Trp Pro Val Cys Glu Glu Gly
530 535 540

Ser Asp Pro Phe Ala His Val Tyr Pro Ser Gly Phe Ala Ile Gly Gln
545 550 555 560

Ser Ala Asp Pro Leu Ser Ser Trp Leu Val Asn Ser Ala Pro Phe Ile
565 570 575

Arg Asp Gln Leu Lys Phe Leu Thr Gln Thr Tyr Pro Ala Lys Gly Gly
580 585 590

Ile Tyr Phe Ser Glu Phe Gly Trp Ala Glu Asp Ala Glu Tyr Asp Arg
595 600 605

Gln Leu Leu Tyr Gln Ile Thr Trp Asp Gly Leu Arg Thr Gln Tyr Leu
610 615 620

Thr Asp Tyr Leu Ser Gln Leu Leu Leu Ala Val His Lys Asp Gly Ile
625 630 635 640

Asn Leu Arg Gly Ala Leu Thr Trp Ser Phe Val Asp Asn Trp Glu Trp
645 650 655

Gly Leu Gly Met Gln Gln Lys Phe Gly Phe Gln Phe Val Asn Gln Ser
660 665 670

Asp Pro Asp Leu Thr Arg Thr Phe Lys Leu Ser Ala His Ala Tyr Ala
675 680 685

Gln Phe Gly Arg Asn His Leu
690 695

<210> 5
<211> 2106
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 5

```
atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt     120
tactcagatt tagaagggga tttcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat     180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta     240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagctcac caccaccacc accacgaaaa cctgtatttt     300
cagatgatgc tgcatgctgc actgctagta gcgctgccat gtgttgtttt ggcgcgcccg     360
gccggagcgg ttacttatcc gggagccatt cctctgtccc tgacgagcaa ttacgaaacc     420
ccaagtccga cagcaatccc gctggagcca acaccgacgg ctaccggtac agcagaatta     480
gatgcgctgt ggaacttagt cgaagctcag tacccagttc aaactgctgc agtgacaact     540
ttggtgacag tgcccgatga ttataagttt gaggcagatc caccgagtta tgcattagca     600
gggtatgaaa caagcgagat tgccggactg aagtttccaa aggggtttaa gtttggtgtt     660
gcgggggcag ccattcaagt tgaaggtgca gcaaaagccg aagggcgggg cccaagtacc     720
tgggattatc tgtgtcatca ctatgccagc acgcagtgta acaattatga tcccgatatt     780
acaaccaacc attactacct gtacccattg gactttgcgc gcctgcaaca cctaggcatt     840
aacacttact cgttttcaat ttcatggacg cgtatttatc cattgggcgc aggctatgtt     900
aatgaagcag ggttagccca ctatgatgcc gtaatccata gtgccaagaa gtatggtctg     960
gaaccagtgg gcaccgtttt tcactgggat acgccactgt ctctgatgct gaaatacggt    1020
gcctggcaag atactggtga ccaaattgtt aaggactttg ttacctatgc cacaactgtg    1080
tttaagcgtt atggtaatga agtcaagacg tggtttactt tcaatgaacc acgggttttc    1140
tgttcacaaa atagtggtct gccatacaat ctgacgtatc cagaaggtat taacagcacc    1200
tccgctgtat ttcgttgcac ctacaatgtt ctgaaagctc atggtcatgc tgttaaagtg    1260
tatcgggatc tagttgcctc cgggaccatt gcggcaggtg aaatcggctt taaatccgat    1320
gataactacc caatcccggc ccgtccaggg aacgccgatg acgaggaatc agccaagcgt    1380
```

cacgaggctt ttcgcattgg gatttttgcg caaccggttt atggtaatgg cgattatcca 1440

gatgttgtta aagaaactgt tggagatatg ctgccggccc tgacggatga agataaagga 1500

tacattaaag gtagcggaga tatttttgcg attgacgggt atcgtaccga tatttcccat 1560

gcggctctga acgggatcgc gaattgtatt cgcaaccaaa gtgacccgaa ttggccagtg 1620

tgtgaagaag ggtcagatcc ttttgctcat gtttacccat ccgggtttgc tattggtcaa 1680

tcagccgatc cactgtcttc atggttagtc aactcagccc cgtttatccg cgatcaactg 1740

aagtttctga cacaaaccta ccctgctaag ggtggtattt atttctcgga atttggttgg 1800

gctgaagacg ccgaatatga tcgtcaactg ctgtatcaaa ttacctggga tggtctgcgt 1860

acgcaatacc tgacggacta tctgagccag ctgctgttgg ctgtgcacaa agacgggatt 1920

aatctgcgag gcgcgctgac gtggagtttt gtcgataatt gggagtgggg tttagggatg 1980

caacagaaat tcggatttca gtttgttaat caatcagatc ccgatctgac acgcacgttt 2040

aaactgagcg ctcacgctta cgcccaattt gggcgtaatc atctgcacca ccaccaccac 2100

cactaa 2106

<210> 6
<211> 701
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 6

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

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

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

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala His His His His His His Glu
85 90 95

Asn Leu Tyr Phe Gln Met Met Leu His Ala Ala Leu Leu Val Ala Leu

100 105 110

Pro Cys Val Val Leu Ala Arg Pro Ala Gly Ala Val Thr Tyr Pro Gly
115 120 125

Ala Ile Pro Leu Ser Leu Thr Ser Asn Tyr Glu Thr Pro Ser Pro Thr
130 135 140

Ala Ile Pro Leu Glu Pro Thr Pro Thr Ala Thr Gly Thr Ala Glu Leu
145 150 155 160

Asp Ala Leu Trp Asn Leu Val Glu Ala Gln Tyr Pro Val Gln Thr Ala
165 170 175

Ala Val Thr Thr Leu Val Thr Val Pro Asp Asp Tyr Lys Phe Glu Ala
180 185 190

Asp Pro Pro Ser Tyr Ala Leu Ala Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ile Ala
195 200 205

Gly Leu Lys Phe Pro Lys Gly Phe Lys Phe Gly Val Ala Gly Ala Ala
210 215 220

Ile Gln Val Glu Gly Ala Ala Lys Ala Glu Gly Arg Gly Pro Ser Thr
225 230 235 240

Trp Asp Tyr Leu Cys His His Tyr Ala Ser Thr Gln Cys Asn Asn Tyr
245 250 255

Asp Pro Asp Ile Thr Thr Asn His Tyr Tyr Leu Tyr Pro Leu Asp Phe
260 265 270

Ala Arg Leu Gln His Leu Gly Ile Asn Thr Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
275 280 285

Trp Thr Arg Ile Tyr Pro Leu Gly Ala Gly Tyr Val Asn Glu Ala Gly
290 295 300

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

Glu Pro Val Gly Thr Val Phe His Trp Asp Thr Pro Leu Ser Leu Met
325 330 335

Leu Lys Tyr Gly Ala Trp Gln Asp Thr Gly Asp Gln Ile Val Lys Asp
340 345 350

Phe Val Thr Tyr Ala Thr Thr Val Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Glu Val
355 360 365

Lys Thr Trp Phe Thr Phe Asn Glu Pro Arg Val Phe Cys Ser Gln Asn
370 375 380

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

Ser Ala Val Phe Arg Cys Thr Tyr Asn Val Leu Lys Ala His Gly His
405 410 415

Ala Val Lys Val Tyr Arg Asp Leu Val Ala Ser Gly Thr Ile Ala Ala
420 425 430

Gly Glu Ile Gly Phe Lys Ser Asp Asp Asn Tyr Pro Ile Pro Ala Arg
435 440 445

Pro Gly Asn Ala Asp Asp Glu Glu Ser Ala Lys Arg His Glu Ala Phe
450 455 460

Arg Ile Gly Ile Phe Ala Gln Pro Val Tyr Gly Asn Gly Asp Tyr Pro
465 470 475 480

Asp Val Val Lys Glu Thr Val Gly Asp Met Leu Pro Ala Leu Thr Asp
485 490 495

Glu Asp Lys Gly Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Asp Ile Phe Ala Ile Asp
500 505 510

Gly Tyr Arg Thr Asp Ile Ser His Ala Ala Leu Asn Gly Ile Ala Asn
515 520 525

Cys Ile Arg Asn Gln Ser Asp Pro Asn Trp Pro Val Cys Glu Glu Gly
530 535 540

Ser Asp Pro Phe Ala His Val Tyr Pro Ser Gly Phe Ala Ile Gly Gln
545 550 555 560

Ser Ala Asp Pro Leu Ser Ser Trp Leu Val Asn Ser Ala Pro Phe Ile
565 570 575

Arg Asp Gln Leu Lys Phe Leu Thr Gln Thr Tyr Pro Ala Lys Gly Gly
580 585 590

Ile Tyr Phe Ser Glu Phe Gly Trp Ala Glu Asp Ala Glu Tyr Asp Arg
595 600 605

Gln Leu Leu Tyr Gln Ile Thr Trp Asp Gly Leu Arg Thr Gln Tyr Leu
610 615 620

Thr Asp Tyr Leu Ser Gln Leu Leu Leu Ala Val His Lys Asp Gly Ile
625 630 635 640

Asn Leu Arg Gly Ala Leu Thr Trp Ser Phe Val Asp Asn Trp Glu Trp
645 650 655

Gly Leu Gly Met Gln Gln Lys Phe Gly Phe Gln Phe Val Asn Gln Ser
660 665 670

Asp Pro Asp Leu Thr Arg Thr Phe Lys Leu Ser Ala His Ala Tyr Ala
675 680 685

Gln Phe Gly Arg Asn His Leu His His His His His His
690 695 700

<210> 7
<211> 2070
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 7

```
atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt     120
tactcagatt tagaagggga tttcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat     180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta     240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagctatg atgctgcatg ctgcactgct agtagcgctg     300
ccatgtgttg ttttggcgcg cccggccgga gcggttactt atccgggagc cattcctctg     360
tccctgacga gcaattacga aaccccaagt ccgacagcaa tcccgctgga gccaacaccg     420
acggctaccg gtacagcaga attagatgcg ctgtggaact tagtcgaagc tcagtaccca     480
gttcaaactg ctgcagtgac aactttggtg acagtgcccg atgattataa gtttgaggca     540
gatccaccga gttatgcatt agcagggtat gaaacaagcg agattgccgg actgaagttt     600
ccaaaggggt ttaagtttgg tgttgcgggg gcagccattc aagttgaagg tgcagcaaaa     660
gccgaagggc ggggcccaag tacctgggat tatctgtgtc atcactatgc cagcacgcag     720
tgtaacaatt atgatcccga tattacaacc aaccattact acctgtaccc attggacttt     780
gcgcgcctgc aacacctagg cattaacact tactcgtttt caatttcatg gacgcgtatt     840
tatccattgg gcgcaggcta tgttaatgaa gcagggttag cccactatga tgccgtaatc     900
```

catagtgcca agaagtatgg tctggaacca gtgggcaccg tttttcactg ggatacgcca 960

ctgtctctga tgctgaaata cggtgcctgg caagatactg gtgaccaaat tgttaaggac 1020

tttgttacct atgccacaac tgtgtttaag cgttatggta atgaagtcaa gacgtggttt 1080

actttcaatg aaccacgggt tttctgttca caaaatagtg gtctgccata caatctgacg 1140

tatccagaag gtattaacag cacctccgct gtatttcgtt gcacctacaa tgttctgaaa 1200

gctcatggtc atgctgttaa agtgtatcgg gatctagttg cctccgggac cattgcggca 1260

ggtgaaatcg gctttaaatc cgatgataac tacccaatcc cggcccgtcc agggaacgcc 1320

gatgacgagg aatcagccaa gcgtcacgag gcttttcgca ttgggatttt tgcgcaaccg 1380

gtttatggta atggcgatta tccagatgtt gttaaagaaa ctgttggaga tatgctgccg 1440

gccctgacgg atgaagataa aggatacatt aaaggtagcg gagatatttt tgcgattgac 1500

gggtatcgta ccgatatttc ccatgcggct ctgaacggga tcgcgaattg tattcgcaac 1560

caaagtgacc cgaattggcc agtgtgtgaa gaagggtcag atccttttgc tcatgtttac 1620

ccatccgggt ttgctattgg tcaatcagcc gatccactgt cttcatggtt agtcaactca 1680

gccccgttta tccgcgatca actgaagttt ctgacacaaa cctaccctgc taagggtggt 1740

atttatttct cggaatttgg ttgggctgaa gacgccgaat atgatcgtca actgctgtat 1800

caaattacct gggatggtct gcgtacgcaa tacctgacgg actatctgag ccagctgctg 1860

ttggctgtgc acaaagacgg gattaatctg cgaggcgcgc tgacgtggag ttttgtcgat 1920

aattgggagt ggggtttagg gatgcaacag aaattcggat ttcagtttgt taatcaatca 1980

gatcccgatc tgacacgcac gtttaaactg agcgctcacg cttacgccca atttgggcgt 2040

aatcatctgc accaccacca ccaccactaa 2070

<210> 8
<211> 689
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 8

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

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

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

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Met Met Leu His Ala Ala Leu
85 90 95

Leu Val Ala Leu Pro Cys Val Val Leu Ala Arg Pro Ala Gly Ala Val
100 105 110

Thr Tyr Pro Gly Ala Ile Pro Leu Ser Leu Thr Ser Asn Tyr Glu Thr
115 120 125

Pro Ser Pro Thr Ala Ile Pro Leu Glu Pro Thr Pro Thr Ala Thr Gly
130 135 140

Thr Ala Glu Leu Asp Ala Leu Trp Asn Leu Val Glu Ala Gln Tyr Pro
145 150 155 160

Val Gln Thr Ala Ala Val Thr Thr Leu Val Thr Val Pro Asp Asp Tyr
165 170 175

Lys Phe Glu Ala Asp Pro Pro Ser Tyr Ala Leu Ala Gly Tyr Glu Thr
180 185 190

Ser Glu Ile Ala Gly Leu Lys Phe Pro Lys Gly Phe Lys Phe Gly Val
195 200 205

Ala Gly Ala Ala Ile Gln Val Glu Gly Ala Ala Lys Ala Glu Gly Arg
210 215 220

Gly Pro Ser Thr Trp Asp Tyr Leu Cys His His Tyr Ala Ser Thr Gln
225 230 235 240

Cys Asn Asn Tyr Asp Pro Asp Ile Thr Thr Asn His Tyr Tyr Leu Tyr
245 250 255

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

Phe Ser Ile Ser Trp Thr Arg Ile Tyr Pro Leu Gly Ala Gly Tyr Val
275 280 285

Asn Glu Ala Gly Leu Ala His Tyr Asp Ala Val Ile His Ser Ala Lys
290 295 300

Lys Tyr Gly Leu Glu Pro Val Gly Thr Val Phe His Trp Asp Thr Pro
305 310 315 320

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

Ile Val Lys Asp Phe Val Thr Tyr Ala Thr Thr Val Phe Lys Arg Tyr
340 345 350

Gly Asn Glu Val Lys Thr Trp Phe Thr Phe Asn Glu Pro Arg Val Phe
355 360 365

Cys Ser Gln Asn Ser Gly Leu Pro Tyr Asn Leu Thr Tyr Pro Glu Gly
370 375 380

Ile Asn Ser Thr Ser Ala Val Phe Arg Cys Thr Tyr Asn Val Leu Lys
385 390 395 400

Ala His Gly His Ala Val Lys Val Tyr Arg Asp Leu Val Ala Ser Gly
405 410 415

Thr Ile Ala Ala Gly Glu Ile Gly Phe Lys Ser Asp Asp Asn Tyr Pro
420 425 430

Ile Pro Ala Arg Pro Gly Asn Ala Asp Asp Glu Glu Ser Ala Lys Arg
435 440 445

His Glu Ala Phe Arg Ile Gly Ile Phe Ala Gln Pro Val Tyr Gly Asn
450 455 460

Gly Asp Tyr Pro Asp Val Val Lys Glu Thr Val Gly Asp Met Leu Pro
465 470 475 480

Ala Leu Thr Asp Glu Asp Lys Gly Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Asp Ile
485 490 495

Phe Ala Ile Asp Gly Tyr Arg Thr Asp Ile Ser His Ala Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Ile Ala Asn Cys Ile Arg Asn Gln Ser Asp Pro Asn Trp Pro Val
515 520 525

Cys Glu Glu Gly Ser Asp Pro Phe Ala His Val Tyr Pro Ser Gly Phe
530 535 540

Ala Ile Gly Gln Ser Ala Asp Pro Leu Ser Ser Trp Leu Val Asn Ser

545 550 555 560

Ala Pro Phe Ile Arg Asp Gln Leu Lys Phe Leu Thr Gln Thr Tyr Pro
565 570 575

Ala Lys Gly Gly Ile Tyr Phe Ser Glu Phe Gly Trp Ala Glu Asp Ala
580 585 590

Glu Tyr Asp Arg Gln Leu Leu Tyr Gln Ile Thr Trp Asp Gly Leu Arg
595 600 605

Thr Gln Tyr Leu Thr Asp Tyr Leu Ser Gln Leu Leu Leu Ala Val His
610 615 620

Lys Asp Gly Ile Asn Leu Arg Gly Ala Leu Thr Trp Ser Phe Val Asp
625 630 635 640

Asn Trp Glu Trp Gly Leu Gly Met Gln Gln Lys Phe Gly Phe Gln Phe
645 650 655

Val Asn Gln Ser Asp Pro Asp Leu Thr Arg Thr Phe Lys Leu Ser Ala
660 665 670

His Ala Tyr Ala Gln Phe Gly Arg Asn His Leu His His His His His
675 680 685

His
<210> 9
<211> 2052
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 9

```
atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt     120
tactcagatt tagaagggga tttcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat     180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta     240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagctatg atgctgcatg ctgcactgct agtagcgctg     300
ccatgtgttg ttttggcgcg cccggccgga gcggttactt atccgggagc cattcctctg     360
tccctgacga gcaattacga aaccccaagt ccgacagcaa tcccgctgga gccaacaccg     420
acggctaccg gtacagcaga attagatgcg ctgtggaact tagtcgaagc tcagtaccca     480
```

gttcaaactg ctgcagtgac aactttggtg acagtgcccg atgattataa gtttgaggca 540

gatccaccga gttatgcatt agcagggtat gaaacaagcg agattgccgg actgaagttt 600

ccaaaggggt ttaagtttgg tgttgcgggg gcagccattc aagttgaagg tgcagcaaaa 660

gccgaagggc ggggcccaag tacctgggat tatctgtgtc atcactatgc cagcacgcag 720

tgtaacaatt atgatcccga tattacaacc aaccattact acctgtaccc attggacttt 780

gcgcgcctgc aacacctagg cattaacact tactcgtttt caatttcatg gacgcgtatt 840

tatccattgg gcgcaggcta tgttaatgaa gcagggttag cccactatga tgccgtaatc 900

catagtgcca agaagtatgg tctggaacca gtgggcaccg tttttcactg ggatacgcca 960

ctgtctctga tgctgaaata cggtgcctgg caagatactg gtgaccaaat tgttaaggac 1020

tttgttacct atgccacaac tgtgtttaag cgttatggta atgaagtcaa gacgtggttt 1080

actttcaatg aaccacgggt tttctgttca caaaatagtg gtctgccata caatctgacg 1140

tatccagaag gtattaacag cacctccgct gtatttcgtt gcacctacaa tgttctgaaa 1200

gctcatggtc atgctgttaa agtgtatcgg gatctagttg cctccgggac cattgcggca 1260

ggtgaaatcg gctttaaatc cgatgataac tacccaatcc cggcccgtcc agggaacgcc 1320

gatgacgagg aatcagccaa gcgtcacgag gcttttcgca ttgggatttt tgcgcaaccg 1380

gtttatggta atggcgatta tccagatgtt gttaaagaaa ctgttggaga tatgctgccg 1440

gccctgacgg atgaagataa aggatacatt aaaggtagcg gagatatttt tgcgattgac 1500

gggtatcgta ccgatatttc ccatgcggct ctgaacggga tcgcgaattg tattcgcaac 1560

caaagtgacc cgaattggcc agtgtgtgaa gaagggtcag atccttttgc tcatgtttac 1620

ccatccgggt ttgctattgg tcaatcagcc gatccactgt cttcatggtt agtcaactca 1680

gccccgttta tccgcgatca actgaagttt ctgacacaaa cctaccctgc taagggtggt 1740

atttatttct cggaatttgg ttgggctgaa gacgccgaat atgatcgtca actgctgtat 1800

caaattacct gggatggtct gcgtacgcaa tacctgacgg actatctgag ccagctgctg 1860

ttggctgtgc acaaagacgg gattaatctg cgaggcgcgc tgacgtggag ttttgtcgat 1920

aattgggagt ggggtttagg gatgcaacag aaattcggat ttcagtttgt taatcaatca 1980

gatcccgatc tgacacgcac gtttaaactg agcgctcacg cttacgccca atttgggcgt 2040

aatcatctgt aa 2052

<210> 10
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético

<400> 10
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

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

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Met Met Leu His Ala Ala Leu
85 90 95

Leu Val Ala Leu Pro Cys Val Val Leu Ala Arg Pro Ala Gly Ala Val
100 105 110

Thr Tyr Pro Gly Ala Ile Pro Leu Ser Leu Thr Ser Asn Tyr Glu Thr
115 120 125

Pro Ser Pro Thr Ala Ile Pro Leu Glu Pro Thr Pro Thr Ala Thr Gly
130 135 140

Thr Ala Glu Leu Asp Ala Leu Trp Asn Leu Val Glu Ala Gln Tyr Pro
145 150 155 160

Val Gln Thr Ala Ala Val Thr Thr Leu Val Thr Val Pro Asp Asp Tyr
165 170 175

Lys Phe Glu Ala Asp Pro Pro Ser Tyr Ala Leu Ala Gly Tyr Glu Thr
180 185 190

Ser Glu Ile Ala Gly Leu Lys Phe Pro Lys Gly Phe Lys Phe Gly Val
195 200 205

Ala Gly Ala Ala Ile Gln Val Glu Gly Ala Ala Lys Ala Glu Gly Arg
210 215 220

Gly Pro Ser Thr Trp Asp Tyr Leu Cys His His Tyr Ala Ser Thr Gln
225 230 235 240

Cys Asn Asn Tyr Asp Pro Asp Ile Thr Thr Asn His Tyr Tyr Leu Tyr
245 250 255

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

Phe Ser Ile Ser Trp Thr Arg Ile Tyr Pro Leu Gly Ala Gly Tyr Val
275 280 285

Asn Glu Ala Gly Leu Ala His Tyr Asp Ala Val Ile His Ser Ala Lys
290 295 300

Lys Tyr Gly Leu Glu Pro Val Gly Thr Val Phe His Trp Asp Thr Pro
305 310 315 320

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

Ile Val Lys Asp Phe Val Thr Tyr Ala Thr Thr Val Phe Lys Arg Tyr
340 345 350

Gly Asn Glu Val Lys Thr Trp Phe Thr Phe Asn Glu Pro Arg Val Phe
355 360 365

Cys Ser Gln Asn Ser Gly Leu Pro Tyr Asn Leu Thr Tyr Pro Glu Gly
370 375 380

Ile Asn Ser Thr Ser Ala Val Phe Arg Cys Thr Tyr Asn Val Leu Lys
385 390 395 400

Ala His Gly His Ala Val Lys Val Tyr Arg Asp Leu Val Ala Ser Gly
405 410 415

Thr Ile Ala Ala Gly Glu Ile Gly Phe Lys Ser Asp Asp Asn Tyr Pro
420 425 430

Ile Pro Ala Arg Pro Gly Asn Ala Asp Asp Glu Glu Ser Ala Lys Arg
435 440 445

His Glu Ala Phe Arg Ile Gly Ile Phe Ala Gln Pro Val Tyr Gly Asn
450 455 460

Gly Asp Tyr Pro Asp Val Val Lys Glu Thr Val Gly Asp Met Leu Pro
465 470 475 480

Ala Leu Thr Asp Glu Asp Lys Gly Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Asp Ile
485 490 495

Phe Ala Ile Asp Gly Tyr Arg Thr Asp Ile Ser His Ala Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Ile Ala Asn Cys Ile Arg Asn Gln Ser Asp Pro Asn Trp Pro Val
515 520 525

Cys Glu Glu Gly Ser Asp Pro Phe Ala His Val Tyr Pro Ser Gly Phe
530 535 540

Ala Ile Gly Gln Ser Ala Asp Pro Leu Ser Ser Trp Leu Val Asn Ser
545 550 555 560

Ala Pro Phe Ile Arg Asp Gln Leu Lys Phe Leu Thr Gln Thr Tyr Pro
565 570 575

Ala Lys Gly Gly Ile Tyr Phe Ser Glu Phe Gly Trp Ala Glu Asp Ala
580 585 590

Glu Tyr Asp Arg Gln Leu Leu Tyr Gln Ile Thr Trp Asp Gly Leu Arg
595 600 605

Thr Gln Tyr Leu Thr Asp Tyr Leu Ser Gln Leu Leu Leu Ala Val His
610 615 620

Lys Asp Gly Ile Asn Leu Arg Gly Ala Leu Thr Trp Ser Phe Val Asp
625 630 635 640

Asn Trp Glu Trp Gly Leu Gly Met Gln Gln Lys Phe Gly Phe Gln Phe
645 650 655

Val Asn Gln Ser Asp Pro Asp Leu Thr Arg Thr Phe Lys Leu Ser Ala
660 665 670

His Ala Tyr Ala Gln Phe Gly Arg Asn His Leu
675 680

<210> 11
<211> 2004
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 11

```
atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt     120
tactcagatt tagaagggga tttcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat     180
```

```
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta     240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagctgtt acttatccgg gagccattcc tctgtccctg     300
acgagcaatt acgaaacccc aagtccgaca gcaatcccgc tggagccaac accgacggct     360
accggtacag cagaattaga tgcgctgtgg aacttagtcg aagctcagta cccagttcaa     420
actgctgcag tgacaacttt ggtgacagtg cccgatgatt ataagtttga ggcagatcca     480
ccgagttatg cattagcagg gtatgaaaca agcgagattg ccggactgaa gtttccaaag     540
gggtttaagt ttggtgttgc gggggcagcc attcaagttg aaggtgcagc aaaagccgaa     600
gggcggggcc caagtacctg ggattatctg tgtcatcact atgccagcac gcagtgtaac     660
aattatgatc ccgatattac aaccaaccat tactacctgt acccattgga ctttgcgcgc     720
ctgcaacacc taggcattaa cacttactcg ttttcaattt catggacgcg tatttatcca     780
ttgggcgcag gctatgttaa tgaagcaggg ttagcccact atgatgccgt aatccatagt     840
gccaagaagt atggtctgga accagtgggc accgtttttc actgggatac gccactgtct     900
ctgatgctga aatacggtgc ctggcaagat actggtgacc aaattgttaa ggactttgtt     960
acctatgcca caactgtgtt taagcgttat ggtaatgaag tcaagacgtg gtttactttc    1020
aatgaaccac gggttttctg ttcacaaaat agtggtctgc catacaatct gacgtatcca    1080
gaaggtatta acagcacctc cgctgtattt cgttgcacct acaatgttct gaaagctcat    1140
ggtcatgctg ttaaagtgta tcgggatcta gttgcctccg ggaccattgc ggcaggtgaa    1200
atcggcttta aatccgatga taactaccca atcccggccc gtccagggaa cgccgatgac    1260
gaggaatcag ccaagcgtca cgaggctttt cgcattggga tttttgcgca accggtttat    1320
ggtaatggcg attatccaga tgttgttaaa gaaactgttg gagatatgct gccggccctg    1380
acggatgaag ataaaggata cattaaaggt agcggagata tttttgcgat tgacgggtat    1440
cgtaccgata tttcccatgc ggctctgaac gggatcgcga attgtattcg caaccaaagt    1500
gacccgaatt ggccagtgtg tgaagaaggg tcagatcctt ttgctcatgt ttacccatcc    1560
gggtttgcta ttggtcaatc agccgatcca ctgtcttcat ggttagtcaa ctcagccccg    1620
tttatccgcg atcaactgaa gtttctgaca caaacctacc ctgctaaggg tggtatttat    1680
ttctcggaat ttggttgggc tgaagacgcc gaatatgatc gtcaactgct gtatcaaatt    1740
acctgggatg gtctgcgtac gcaatacctg acggactatc tgagccagct gctgttggct    1800
gtgcacaaag acgggattaa tctgcgaggc gcgctgacgt ggagttttgt cgataattgg    1860
gagtggggtt tagggatgca acagaaattc ggatttcagt ttgttaatca atcagatccc    1920
gatctgacac gcacgtttaa actgagcgct cacgcttacg cccaatttgg gcgtaatcat    1980
ctgcaccacc accaccacca ctaa                                           2004
```

<210> 12
<211> 667
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 12

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

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
            20                  25                  30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
        35                  40                  45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
    50                  55                  60

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

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Val Thr Tyr Pro Gly Ala Ile
                85                  90                  95

Pro Leu Ser Leu Thr Ser Asn Tyr Glu Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ile
            100                 105                 110

Pro Leu Glu Pro Thr Pro Thr Ala Thr Gly Thr Ala Glu Leu Asp Ala
        115                 120                 125

Leu Trp Asn Leu Val Glu Ala Gln Tyr Pro Val Gln Thr Ala Ala Val
    130                 135                 140

Thr Thr Leu Val Thr Val Pro Asp Asp Tyr Lys Phe Glu Ala Asp Pro
145                 150                 155                 160

Pro Ser Tyr Ala Leu Ala Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ile Ala Gly Leu
                165                 170                 175

Lys Phe Pro Lys Gly Phe Lys Phe Gly Val Ala Gly Ala Ala Ile Gln
            180                 185                 190

Val Glu Gly Ala Ala Lys Ala Glu Gly Arg Gly Pro Ser Thr Trp Asp
        195                 200                 205
```

Tyr Leu Cys His His Tyr Ala Ser Thr Gln Cys Asn Asn Tyr Asp Pro
210 215 220

Asp Ile Thr Thr Asn His Tyr Tyr Leu Tyr Pro Leu Asp Phe Ala Arg
225 230 235 240

Leu Gln His Leu Gly Ile Asn Thr Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Trp Thr
245 250 255

Arg Ile Tyr Pro Leu Gly Ala Gly Tyr Val Asn Glu Ala Gly Leu Ala
260 265 270

His Tyr Asp Ala Val Ile His Ser Ala Lys Lys Tyr Gly Leu Glu Pro
275 280 285

Val Gly Thr Val Phe His Trp Asp Thr Pro Leu Ser Leu Met Leu Lys
290 295 300

Tyr Gly Ala Trp Gln Asp Thr Gly Asp Gln Ile Val Lys Asp Phe Val
305 310 315 320

Thr Tyr Ala Thr Thr Val Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Glu Val Lys Thr
325 330 335

Trp Phe Thr Phe Asn Glu Pro Arg Val Phe Cys Ser Gln Asn Ser Gly
340 345 350

Leu Pro Tyr Asn Leu Thr Tyr Pro Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ser Ala
355 360 365

Val Phe Arg Cys Thr Tyr Asn Val Leu Lys Ala His Gly His Ala Val
370 375 380

Lys Val Tyr Arg Asp Leu Val Ala Ser Gly Thr Ile Ala Ala Gly Glu
385 390 395 400

Ile Gly Phe Lys Ser Asp Asp Asn Tyr Pro Ile Pro Ala Arg Pro Gly
405 410 415

Asn Ala Asp Asp Glu Glu Ser Ala Lys Arg His Glu Ala Phe Arg Ile
420 425 430

Gly Ile Phe Ala Gln Pro Val Tyr Gly Asn Gly Asp Tyr Pro Asp Val
435 440 445

Val Lys Glu Thr Val Gly Asp Met Leu Pro Ala Leu Thr Asp Glu Asp
450 455 460

Lys Gly Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Asp Ile Phe Ala Ile Asp Gly Tyr
465 470 475 480

Arg Thr Asp Ile Ser His Ala Ala Leu Asn Gly Ile Ala Asn Cys Ile
485 490 495

Arg Asn Gln Ser Asp Pro Asn Trp Pro Val Cys Glu Glu Gly Ser Asp
500 505 510

Pro Phe Ala His Val Tyr Pro Ser Gly Phe Ala Ile Gly Gln Ser Ala
515 520 525

Asp Pro Leu Ser Ser Trp Leu Val Asn Ser Ala Pro Phe Ile Arg Asp
530 535 540

Gln Leu Lys Phe Leu Thr Gln Thr Tyr Pro Ala Lys Gly Gly Ile Tyr
545 550 555 560

Phe Ser Glu Phe Gly Trp Ala Glu Asp Ala Glu Tyr Asp Arg Gln Leu
565 570 575

Leu Tyr Gln Ile Thr Trp Asp Gly Leu Arg Thr Gln Tyr Leu Thr Asp
580 585 590

Tyr Leu Ser Gln Leu Leu Leu Ala Val His Lys Asp Gly Ile Asn Leu
595 600 605

Arg Gly Ala Leu Thr Trp Ser Phe Val Asp Asn Trp Glu Trp Gly Leu
610 615 620

Gly Met Gln Gln Lys Phe Gly Phe Gln Phe Val Asn Gln Ser Asp Pro
625 630 635 640

Asp Leu Thr Arg Thr Phe Lys Leu Ser Ala His Ala Tyr Ala Gln Phe
645 650 655

Gly Arg Asn His Leu His His His His His His His
660 665

<210> 13
<211> 1986
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 13

atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60

```
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt      120
tactcagatt tagaagggga tttcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat      180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta      240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagctgtt acttatccgg gagccattcc tctgtccctg      300
acgagcaatt acgaaacccc aagtccgaca gcaatcccgc tggagccaac accgacggct      360
accggtacag cagaattaga tgcgctgtgg aacttagtcg aagctcagta cccagttcaa      420
actgctgcag tgacaacttt ggtgacagtg cccgatgatt ataagtttga ggcagatcca      480
ccgagttatg cattagcagg gtatgaaaca agcgagattg ccggactgaa gtttccaaag      540
gggtttaagt ttggtgttgc gggggcagcc attcaagttg aaggtgcagc aaaagccgaa      600
gggcggggcc caagtacctg ggattatctg tgtcatcact atgccagcac gcagtgtaac      660
aattatgatc ccgatattac aaccaaccat tactacctgt acccattgga ctttgcgcgc      720
ctgcaacacc taggcattaa cacttactcg ttttcaattt catggacgcg tatttatcca      780
ttgggcgcag gctatgttaa tgaagcaggg ttagcccact atgatgccgt aatccatagt      840
gccaagaagt atggtctgga accagtgggc accgtttttc actgggatac gccactgtct      900
ctgatgctga aatacggtgc ctggcaagat actggtgacc aaattgttaa ggactttgtt      960
acctatgcca caactgtgtt taagcgttat ggtaatgaag tcaagacgtg gtttactttc     1020
aatgaaccac gggttttctg ttcacaaaat agtggtctgc catacaatct gacgtatcca     1080
gaaggtatta acagcacctc cgctgtattt cgttgcacct acaatgttct gaaagctcat     1140
ggtcatgctg ttaaagtgta tcgggatcta gttgcctccg ggaccattgc ggcaggtgaa     1200
atcggcttta aatccgatga taactaccca atcccggccc gtccagggaa cgccgatgac     1260
gaggaatcag ccaagcgtca cgaggctttt cgcattggga tttttgcgca accggtttat     1320
ggtaatggcg attatccaga tgttgttaaa gaaactgttg gagatatgct gccggccctg     1380
acggatgaag ataaaggata cattaaaggt agcggagata tttttgcgat tgacgggtat     1440
cgtaccgata tttcccatgc ggctctgaac gggatcgcga attgtattcg caaccaaagt     1500
gacccgaatt ggccagtgtg tgaagaaggg tcagatcctt ttgctcatgt ttacccatcc     1560
gggtttgcta ttggtcaatc agccgatcca ctgtcttcat ggttagtcaa ctcagccccg     1620
tttatccgcg atcaactgaa gtttctgaca caaacctacc ctgctaaggg tggtatttat     1680
ttctcggaat ttggttgggc tgaagacgcc gaatatgatc gtcaactgct gtatcaaatt     1740
acctgggatg gtctgcgtac gcaatacctg acggactatc tgagccagct gctgttggct     1800
gtgcacaaag acgggattaa tctgcgaggc gcgctgacgt ggagttttgt cgataattgg     1860
gagtggggtt tagggatgca acagaaattc ggatttcagt ttgttaatca atcagatccc     1920
```

gatctgacac gcacgtttaa actgagcgct cacgcttacg cccaatttgg gcgtaatcat 1980

ctgtaa 1986

<210> 14
<211> 661
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 14

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

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

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

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Val Thr Tyr Pro Gly Ala Ile
85 90 95

Pro Leu Ser Leu Thr Ser Asn Tyr Glu Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ile
100 105 110

Pro Leu Glu Pro Thr Pro Thr Ala Thr Gly Thr Ala Glu Leu Asp Ala
115 120 125

Leu Trp Asn Leu Val Glu Ala Gln Tyr Pro Val Gln Thr Ala Ala Val
130 135 140

Thr Thr Leu Val Thr Val Pro Asp Asp Tyr Lys Phe Glu Ala Asp Pro
145 150 155 160

Pro Ser Tyr Ala Leu Ala Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ile Ala Gly Leu
165 170 175

Lys Phe Pro Lys Gly Phe Lys Phe Gly Val Ala Gly Ala Ala Ile Gln
180 185 190

Val Glu Gly Ala Ala Lys Ala Glu Gly Arg Gly Pro Ser Thr Trp Asp
195 200 205

Tyr Leu Cys His His Tyr Ala Ser Thr Gln Cys Asn Asn Tyr Asp Pro
210 215 220

Asp Ile Thr Thr Asn His Tyr Tyr Leu Tyr Pro Leu Asp Phe Ala Arg
225 230 235 240

Leu Gln His Leu Gly Ile Asn Thr Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Trp Thr
245 250 255

Arg Ile Tyr Pro Leu Gly Ala Gly Tyr Val Asn Glu Ala Gly Leu Ala
260 265 270

His Tyr Asp Ala Val Ile His Ser Ala Lys Lys Tyr Gly Leu Glu Pro
275 280 285

Val Gly Thr Val Phe His Trp Asp Thr Pro Leu Ser Leu Met Leu Lys
290 295 300

Tyr Gly Ala Trp Gln Asp Thr Gly Asp Gln Ile Val Lys Asp Phe Val
305 310 315 320

Thr Tyr Ala Thr Thr Val Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Glu Val Lys Thr
325 330 335

Trp Phe Thr Phe Asn Glu Pro Arg Val Phe Cys Ser Gln Asn Ser Gly
340 345 350

Leu Pro Tyr Asn Leu Thr Tyr Pro Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ser Ala
355 360 365

Val Phe Arg Cys Thr Tyr Asn Val Leu Lys Ala His Gly His Ala Val
370 375 380

Lys Val Tyr Arg Asp Leu Val Ala Ser Gly Thr Ile Ala Ala Gly Glu
385 390 395 400

Ile Gly Phe Lys Ser Asp Asp Asn Tyr Pro Ile Pro Ala Arg Pro Gly
405 410 415

Asn Ala Asp Asp Glu Glu Ser Ala Lys Arg His Glu Ala Phe Arg Ile
420 425 430

Gly Ile Phe Ala Gln Pro Val Tyr Gly Asn Gly Asp Tyr Pro Asp Val
435 440 445

Val Lys Glu Thr Val Gly Asp Met Leu Pro Ala Leu Thr Asp Glu Asp
450 455 460

Lys Gly Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Asp Ile Phe Ala Ile Asp Gly Tyr
465 470 475 480

Arg Thr Asp Ile Ser His Ala Ala Leu Asn Gly Ile Ala Asn Cys Ile
485 490 495

Arg Asn Gln Ser Asp Pro Asn Trp Pro Val Cys Glu Glu Gly Ser Asp
500 505 510

Pro Phe Ala His Val Tyr Pro Ser Gly Phe Ala Ile Gly Gln Ser Ala
515 520 525

Asp Pro Leu Ser Ser Trp Leu Val Asn Ser Ala Pro Phe Ile Arg Asp
530 535 540

Gln Leu Lys Phe Leu Thr Gln Thr Tyr Pro Ala Lys Gly Gly Ile Tyr
545 550 555 560

Phe Ser Glu Phe Gly Trp Ala Glu Asp Ala Glu Tyr Asp Arg Gln Leu
565 570 575

Leu Tyr Gln Ile Thr Trp Asp Gly Leu Arg Thr Gln Tyr Leu Thr Asp
580 585 590

Tyr Leu Ser Gln Leu Leu Leu Ala Val His Lys Asp Gly Ile Asn Leu
595 600 605

Arg Gly Ala Leu Thr Trp Ser Phe Val Asp Asn Trp Glu Trp Gly Leu
610 615 620

Gly Met Gln Gln Lys Phe Gly Phe Gln Phe Val Asn Gln Ser Asp Pro
625 630 635 640

Asp Leu Thr Arg Thr Phe Lys Leu Ser Ala His Ala Tyr Ala Gln Phe
645 650 655

Gly Arg Asn His Leu
660

<210> 15
<211> 1803
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

<223> Sintético
<400> 15

```
atgatgctgc atgctgcact gctagtagcg ctgccatgtg ttgttttggc gcgcccggcc      60
ggagcggtta cttatccggg agccattcct ctgtccctga cgagcaatta cgaaacccca     120
agtccgacag caatcccgct ggagccaaca ccgacggcta ccggtacagc agaattagat     180
gcgctgtgga acttagtcga agctcagtac ccagttcaaa ctgctgcagt gacaactttg     240
gtgacagtgc ccgatgatta taagtttgag gcagatccac cgagttatgc attagcaggg     300
tatgaaacaa gcgagattgc cggactgaag tttccaaagg ggtttaagtt tggtgttgcg     360
ggggcagcca ttcaagttga aggtgcagca aaagccgaag ggcggggccc aagtacctgg     420
gattatctgt gtcatcacta tgccagcacg cagtgtaaca attatgatcc cgatattaca     480
accaaccatt actacctgta cccattggac tttgcgcgcc tgcaacacct aggcattaac     540
acttactcgt tttcaatttc atggacgcgt atttatccat tgggcgcagg ctatgttaat     600
gaagcagggt tagcccacta tgatgccgta atccatagtg ccaagaagta tggtctggaa     660
ccagtgggca ccgtttttca ctgggatacg ccactgtctc tgatgctgaa atacggtgcc     720
tggcaagata ctggtgacca aattgttaag gactttgtta cctatgccac aactgtgttt     780
aagcgttatg gtaatgaagt caagacgtgg tttactttca atgaaccacg ggttttctgt     840
tcacaaaata gtggtctgcc atacaatctg acgtatccag aaggtattaa cagcacctcc     900
gctgtatttc gttgcaccta caatgttctg aaagctcatg gtcatgctgt taaagtgtat     960
cgggatctag ttgcctccgg gaccattgcg gcaggtgaaa tcggctttaa atccgatgat    1020
aactacccaa tcccggcccg tccagggaac gccgatgacg aggaatcagc caagcgtcac    1080
gaggcttttc gcattgggat ttttgcgcaa ccggtttatg gtaatggcga ttatccagat    1140
gttgttaaag aaactgttgg agatatgctg ccggccctga cggatgaaga taaaggatac    1200
attaaaggta gcggagatat ttttgcgatt gacgggtatc gtaccgatat ttcccatgcg    1260
gctctgaacg ggatcgcgaa ttgtattcgc aaccaaagtg acccgaattg gccagtgtgt    1320
gaagaagggt cagatccttt tgctcatgtt tacccatccg ggtttgctat tggtcaatca    1380
gccgatccac tgtcttcatg gttagtcaac tcagccccgt ttatccgcga tcaactgaag    1440
tttctgacac aaacctaccc tgctaagggt ggtatttatt tctcggaatt tggttgggct    1500
gaagacgccg aatatgatcg tcaactgctg tatcaaatta cctgggatgg tctgcgtacg    1560
caatacctga cggactatct gagccagctg ctgttggctg tgcacaaaga cgggattaat    1620
ctgcgaggcg cgctgacgtg gagttttgtc gataattggg agtggggttt agggatgcaa    1680
cagaaattcg gatttcagtt tgttaatcaa tcagatcccg atctgacacg cacgtttaaa    1740
ctgagcgctc acgcttacgc ccaatttggg cgtaatcatc tgcaccacca ccaccaccac    1800
```

taa 1803
<210> 16
<211> 600
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 16

```
Met Met Leu His Ala Ala Leu Leu Val Ala Leu Pro Cys Val Val Leu
1               5                   10                  15

Ala Arg Pro Ala Gly Ala Val Thr Tyr Pro Gly Ala Ile Pro Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Thr Ser Asn Tyr Glu Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ile Pro Leu Glu
        35                  40                  45

Pro Thr Pro Thr Ala Thr Gly Thr Ala Glu Leu Asp Ala Leu Trp Asn
    50                  55                  60

Leu Val Glu Ala Gln Tyr Pro Val Gln Thr Ala Ala Val Thr Thr Leu
65                  70                  75                  80

Val Thr Val Pro Asp Asp Tyr Lys Phe Glu Ala Asp Pro Pro Ser Tyr
                85                  90                  95

Ala Leu Ala Gly Tyr Glu Thr Ser Glu Ile Ala Gly Leu Lys Phe Pro
            100                 105                 110

Lys Gly Phe Lys Phe Gly Val Ala Gly Ala Ala Ile Gln Val Glu Gly
        115                 120                 125

Ala Ala Lys Ala Glu Gly Arg Gly Pro Ser Thr Trp Asp Tyr Leu Cys
    130                 135                 140

His His Tyr Ala Ser Thr Gln Cys Asn Asn Tyr Asp Pro Asp Ile Thr
145                 150                 155                 160

Thr Asn His Tyr Tyr Leu Tyr Pro Leu Asp Phe Ala Arg Leu Gln His
                165                 170                 175

Leu Gly Ile Asn Thr Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Trp Thr Arg Ile Tyr
            180                 185                 190

Pro Leu Gly Ala Gly Tyr Val Asn Glu Ala Gly Leu Ala His Tyr Asp
        195                 200                 205
```

Ala Val Ile His Ser Ala Lys Lys Tyr Gly Leu Glu Pro Val Gly Thr
210 215 220

Val Phe His Trp Asp Thr Pro Leu Ser Leu Met Leu Lys Tyr Gly Ala
225 230 235 240

Trp Gln Asp Thr Gly Asp Gln Ile Val Lys Asp Phe Val Thr Tyr Ala
245 250 255

Thr Thr Val Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Glu Val Lys Thr Trp Phe Thr
260 265 270

Phe Asn Glu Pro Arg Val Phe Cys Ser Gln Asn Ser Gly Leu Pro Tyr
275 280 285

Asn Leu Thr Tyr Pro Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ser Ala Val Phe Arg
290 295 300

Cys Thr Tyr Asn Val Leu Lys Ala His Gly His Ala Val Lys Val Tyr
305 310 315 320

Arg Asp Leu Val Ala Ser Gly Thr Ile Ala Ala Gly Glu Ile Gly Phe
325 330 335

Lys Ser Asp Asp Asn Tyr Pro Ile Pro Ala Arg Pro Gly Asn Ala Asp
340 345 350

Asp Glu Glu Ser Ala Lys Arg His Glu Ala Phe Arg Ile Gly Ile Phe
355 360 365

Ala Gln Pro Val Tyr Gly Asn Gly Asp Tyr Pro Asp Val Val Lys Glu
370 375 380

Thr Val Gly Asp Met Leu Pro Ala Leu Thr Asp Glu Asp Lys Gly Tyr
385 390 395 400

Ile Lys Gly Ser Gly Asp Ile Phe Ala Ile Asp Gly Tyr Arg Thr Asp
405 410 415

Ile Ser His Ala Ala Leu Asn Gly Ile Ala Asn Cys Ile Arg Asn Gln
420 425 430

Ser Asp Pro Asn Trp Pro Val Cys Glu Glu Gly Ser Asp Pro Phe Ala
435 440 445

His Val Tyr Pro Ser Gly Phe Ala Ile Gly Gln Ser Ala Asp Pro Leu

450 455 460

Ser Ser Trp Leu Val Asn Ser Ala Pro Phe Ile Arg Asp Gln Leu Lys
465 470 475 480

Phe Leu Thr Gln Thr Tyr Pro Ala Lys Gly Gly Ile Tyr Phe Ser Glu
485 490 495

Phe Gly Trp Ala Glu Asp Ala Glu Tyr Asp Arg Gln Leu Leu Tyr Gln
500 505 510

Ile Thr Trp Asp Gly Leu Arg Thr Gln Tyr Leu Thr Asp Tyr Leu Ser
515 520 525

Gln Leu Leu Leu Ala Val His Lys Asp Gly Ile Asn Leu Arg Gly Ala
530 535 540

Leu Thr Trp Ser Phe Val Asp Asn Trp Glu Trp Gly Leu Gly Met Gln
545 550 555 560

Gln Lys Phe Gly Phe Gln Phe Val Asn Gln Ser Asp Pro Asp Leu Thr
565 570 575

Arg Thr Phe Lys Leu Ser Ala His Ala Tyr Ala Gln Phe Gly Arg Asn
580 585 590

His Leu His His His His His His
595 600

<210> 17
<211> 1740
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 17

atggttactt atccgggagc cattcctctg tccctgacga gcaattacga aaccccaagt 60
ccgacagcaa tcccgctgga gccaacaccg acggctaccg gtacagcaga attagatgcg 120
ctgtggaact tagtcgaagc tcagtaccca gttcaaactg ctgcagtgac aactttggtg 180
acagtgcccg atgattataa gtttgaggca gatccaccga gttatgcatt agcagggtat 240
gaaacaagcg agattgccgg actgaagttt ccaaaggggt ttaagtttgg tgttgcgggg 300
gcagccattc aagttgaagg tgcagcaaaa gccgaagggc ggggcccaag tacctgggat 360
tatctgtgtc atcactatgc cagcacgcag tgtaacaatt atgatcccga tattacaacc 420
aaccattact acctgtaccc attggacttt gcgcgcctgc aacacctagg cattaacact 480
tactcgtttt caatttcatg gacgcgtatt tatccattgg gcgcaggcta tgttaatgaa 540
gcagggttag cccactatga tgccgtaatc catagtgcca agaagtatgg tctggaacca 600
gtgggcaccg tttttcactg ggatacgcca ctgtctctga tgctgaaata cggtgcctgg 660
caagatactg gtgaccaaat tgttaaggac tttgttacct atgccacaac tgtgtttaag 720
cgttatggta atgaagtcaa gacgtggttt actttcaatg aaccacgggt tttctgttca 780
caaaatagtg gtctgccata caatctgacg tatccagaag gtattaacag cacctccgct 840
gtatttcgtt gcacctacaa tgttctgaaa gctcatggtc atgctgttaa agtgtatcgg 900
gatctagttg cctccgggac cattgcggca ggtgaaatcg gctttaaatc cgatgataac 960
tacccaatcc cggcccgtcc agggaacgcc gatgacgagg aatcagccaa gcgtcacgag 1020
gcttttcgca ttgggatttt tgcgcaaccg gtttatggta atggcgatta tccagatgtt 1080
gttaaagaaa ctgttggaga tatgctgccg gccctgacgg atgaagataa aggatacatt 1140
aaaggtagcg gagatatttt tgcgattgac gggtatcgta ccgatatttc ccatgcggct 1200
ctgaacggga tcgcgaattg tattcgcaac caaagtgacc cgaattggcc agtgtgtgaa 1260
gaagggtcag atccttttgc tcatgtttac ccatccgggt ttgctattgg tcaatcagcc 1320
gatccactgt cttcatggtt agtcaactca gccccgttta tccgcgatca actgaagttt 1380
ctgacacaaa cctaccctgc taagggtggt atttatttct cggaatttgg ttgggctgaa 1440
gacgccgaat atgatcgtca actgctgtat caaattacct gggatggtct gcgtacgcaa 1500
tacctgacgg actatctgag ccagctgctg ttggctgtgc acaaagacgg gattaatctg 1560
cgaggcgcgc tgacgtggag ttttgtcgat aattgggagt ggggtttagg gatgcaacag 1620
aaattcggat ttcagtttgt taatcaatca gatcccgatc tgacacgcac gtttaaactg 1680
agcgctcacg cttacgccca atttgggcgt aatcatctgc accaccacca ccaccactaa 1740
<210> 18
<211> 579

<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 18

```
Met Val Thr Tyr Pro Gly Ala Ile Pro Leu Ser Leu Thr Ser Asn Tyr
1               5                   10                  15

Glu Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ile Pro Leu Glu Pro Thr Pro Thr Ala
            20                  25                  30

Thr Gly Thr Ala Glu Leu Asp Ala Leu Trp Asn Leu Val Glu Ala Gln
```

35 40 45

Tyr Pro Val Gln Thr Ala Ala Val Thr Thr Leu Val Thr Val Pro Asp
50 55 60

Asp Tyr Lys Phe Glu Ala Asp Pro Pro Ser Tyr Ala Leu Ala Gly Tyr
65 70 75 80

Glu Thr Ser Glu Ile Ala Gly Leu Lys Phe Pro Lys Gly Phe Lys Phe
85 90 95

Gly Val Ala Gly Ala Ala Ile Gln Val Glu Gly Ala Ala Lys Ala Glu
100 105 110

Gly Arg Gly Pro Ser Thr Trp Asp Tyr Leu Cys His His Tyr Ala Ser
115 120 125

Thr Gln Cys Asn Asn Tyr Asp Pro Asp Ile Thr Thr Asn His Tyr Tyr
130 135 140

Leu Tyr Pro Leu Asp Phe Ala Arg Leu Gln His Leu Gly Ile Asn Thr
145 150 155 160

Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Trp Thr Arg Ile Tyr Pro Leu Gly Ala Gly
165 170 175

Tyr Val Asn Glu Ala Gly Leu Ala His Tyr Asp Ala Val Ile His Ser
180 185 190

Ala Lys Lys Tyr Gly Leu Glu Pro Val Gly Thr Val Phe His Trp Asp
195 200 205

Thr Pro Leu Ser Leu Met Leu Lys Tyr Gly Ala Trp Gln Asp Thr Gly
210 215 220

Asp Gln Ile Val Lys Asp Phe Val Thr Tyr Ala Thr Thr Val Phe Lys
225 230 235 240

Arg Tyr Gly Asn Glu Val Lys Thr Trp Phe Thr Phe Asn Glu Pro Arg
245 250 255

Val Phe Cys Ser Gln Asn Ser Gly Leu Pro Tyr Asn Leu Thr Tyr Pro
260 265 270

Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ser Ala Val Phe Arg Cys Thr Tyr Asn Val
275 280 285

Leu Lys Ala His Gly His Ala Val Lys Val Tyr Arg Asp Leu Val Ala
290 295 300

Ser Gly Thr Ile Ala Ala Gly Glu Ile Gly Phe Lys Ser Asp Asp Asn
305 310 315 320

Tyr Pro Ile Pro Ala Arg Pro Gly Asn Ala Asp Asp Glu Glu Ser Ala
325 330 335

Lys Arg His Glu Ala Phe Arg Ile Gly Ile Phe Ala Gln Pro Val Tyr
340 345 350

Gly Asn Gly Asp Tyr Pro Asp Val Val Lys Glu Thr Val Gly Asp Met
355 360 365

Leu Pro Ala Leu Thr Asp Glu Asp Lys Gly Tyr Ile Lys Gly Ser Gly
370 375 380

Asp Ile Phe Ala Ile Asp Gly Tyr Arg Thr Asp Ile Ser His Ala Ala
385 390 395 400

Leu Asn Gly Ile Ala Asn Cys Ile Arg Asn Gln Ser Asp Pro Asn Trp
405 410 415

Pro Val Cys Glu Glu Gly Ser Asp Pro Phe Ala His Val Tyr Pro Ser
420 425 430

Gly Phe Ala Ile Gly Gln Ser Ala Asp Pro Leu Ser Ser Trp Leu Val
435 440 445

Asn Ser Ala Pro Phe Ile Arg Asp Gln Leu Lys Phe Leu Thr Gln Thr
450 455 460

Tyr Pro Ala Lys Gly Gly Ile Tyr Phe Ser Glu Phe Gly Trp Ala Glu
465 470 475 480

Asp Ala Glu Tyr Asp Arg Gln Leu Leu Tyr Gln Ile Thr Trp Asp Gly
485 490 495

Leu Arg Thr Gln Tyr Leu Thr Asp Tyr Leu Ser Gln Leu Leu Leu Ala
500 505 510

Val His Lys Asp Gly Ile Asn Leu Arg Gly Ala Leu Thr Trp Ser Phe
515 520 525

Val Asp Asn Trp Glu Trp Gly Leu Gly Met Gln Gln Lys Phe Gly Phe
530 535 540

Gln Phe Val Asn Gln Ser Asp Pro Asp Leu Thr Arg Thr Phe Lys Leu
545 550 555 560

Ser Ala His Ala Tyr Ala Gln Phe Gly Arg Asn His Leu His His His
565 570 575

His His His
<210> 19
<211> 1755
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 19

```
atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt     120
tactcagatt tagaagggga tttcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat     180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta     240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagcttac gtagaattca tgtttccaaa ggggtttaag     300
tttggtgttg cgggggcagc cattcaagtt gaaggtgcag caaaagccga agggcggggc     360
ccaagtacct gggattatct gtgtcatcac tatgccagca cgcagtgtaa caattatgat     420
cccgatatta caaccaacca ttactacctg tacccattgg actttgcgcg cctgcaacac     480
ctaggcatta acacttactc gttttcaatt tcatggacgc gtatttatcc attgggcgca     540
ggctatgtta atgaagcagg gttagcccac tatgatgccg taatccatag tgccaagaag     600
tatggtctgg aaccagtggg caccgttttt cactgggata cgccactgtc tctgatgctg     660
aaatacggtg cctggcaaga tactggtgac caaattgtta aggactttgt tacctatgcc     720
acaactgtgt ttaagcgtta tggtaatgaa gtcaagacgt ggtttacttt caatgaacca     780
cgggttttct gttcacaaaa tagtggtctg ccatacaatc tgacgtatcc agaaggtatt     840
aacagcacct ccgctgtatt tcgttgcacc tacaatgttc tgaaagctca tggtcatgct     900
gttaaagtgt atcgggatct agttgcctcc gggaccattg cggcaggtga aatcggcttt     960
aaatccgatg ataactaccc aatcccggcc cgtccaggga acgccgatga cgaggaatca    1020
gccaagcgtc acgaggcttt tcgcattggg atttttgcgc aaccggttta tggtaatggc    1080
gattatccag atgttgttaa agaaactgtt ggagatatgc tgccggccct gacggatgaa    1140
gataaaggat acattaaagg tagcggagat atttttgcga ttgacgggta tcgtaccgat    1200
atttcccatg cggctctgaa cgggatcgcg aattgtattc gcaaccaaag tgacccgaat    1260
tggccagtgt gtgaagaagg gtcagatcct tttgctcatg tttacccatc cgggtttgct    1320
attggtcaat cagccgatcc actgtcttca tggttagtca actcagcccc gtttatccgc    1380
gatcaactga agtttctgac acaaacctac cctgctaagg gtggtattta tttctcggaa    1440
tttggttggg ctgaagacgc cgaatatgat cgtcaactgc tgtatcaaat tacctgggat    1500
ggtctgcgta cgcaatacct gacggactat ctgagccagc tgctgttggc tgtgcacaaa    1560
gacgggatta atctgcgagg cgcgctgacg tggagttttg tcgataattg ggagtggggt    1620
ttagggatgc aacagaaatt cggatttcag tttgttaatc aatcagatcc cgatctgaca    1680
cgcacgttta aactgagcgc tcacgcttac gcccaatttg ggcgtaatca tctgcaccac    1740
caccaccacc actaa                                                     1755
```

<210> 20
<211> 584
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 20

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

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
            20                  25                  30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
        35                  40                  45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
    50                  55                  60

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

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Tyr Val Glu Phe Met Phe Pro
                85                  90                  95

Lys Gly Phe Lys Phe Gly Val Ala Gly Ala Ala Ile Gln Val Glu Gly
            100                 105                 110

Ala Ala Lys Ala Glu Gly Arg Gly Pro Ser Thr Trp Asp Tyr Leu Cys
        115                 120                 125

His His Tyr Ala Ser Thr Gln Cys Asn Asn Tyr Asp Pro Asp Ile Thr
```

130 135 140

Thr Asn His Tyr Tyr Leu Tyr Pro Leu Asp Phe Ala Arg Leu Gln His
145 150 155 160

Leu Gly Ile Asn Thr Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Trp Thr Arg Ile Tyr
165 170 175

Pro Leu Gly Ala Gly Tyr Val Asn Glu Ala Gly Leu Ala His Tyr Asp
180 185 190

Ala Val Ile His Ser Ala Lys Lys Tyr Gly Leu Glu Pro Val Gly Thr
195 200 205

Val Phe His Trp Asp Thr Pro Leu Ser Leu Met Leu Lys Tyr Gly Ala
210 215 220

Trp Gln Asp Thr Gly Asp Gln Ile Val Lys Asp Phe Val Thr Tyr Ala
225 230 235 240

Thr Thr Val Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Glu Val Lys Thr Trp Phe Thr
245 250 255

Phe Asn Glu Pro Arg Val Phe Cys Ser Gln Asn Ser Gly Leu Pro Tyr
260 265 270

Asn Leu Thr Tyr Pro Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ser Ala Val Phe Arg
275 280 285

Cys Thr Tyr Asn Val Leu Lys Ala His Gly His Ala Val Lys Val Tyr
290 295 300

Arg Asp Leu Val Ala Ser Gly Thr Ile Ala Ala Gly Glu Ile Gly Phe
305 310 315 320

Lys Ser Asp Asp Asn Tyr Pro Ile Pro Ala Arg Pro Gly Asn Ala Asp
325 330 335

Asp Glu Glu Ser Ala Lys Arg His Glu Ala Phe Arg Ile Gly Ile Phe
340 345 350

Ala Gln Pro Val Tyr Gly Asn Gly Asp Tyr Pro Asp Val Val Lys Glu
355 360 365

Thr Val Gly Asp Met Leu Pro Ala Leu Thr Asp Glu Asp Lys Gly Tyr
370 375 380

Ile Lys Gly Ser Gly Asp Ile Phe Ala Ile Asp Gly Tyr Arg Thr Asp
385 390 395 400

Ile Ser His Ala Ala Leu Asn Gly Ile Ala Asn Cys Ile Arg Asn Gln
405 410 415

Ser Asp Pro Asn Trp Pro Val Cys Glu Glu Gly Ser Asp Pro Phe Ala
420 425 430

His Val Tyr Pro Ser Gly Phe Ala Ile Gly Gln Ser Ala Asp Pro Leu
435 440 445

Ser Ser Trp Leu Val Asn Ser Ala Pro Phe Ile Arg Asp Gln Leu Lys
450 455 460

Phe Leu Thr Gln Thr Tyr Pro Ala Lys Gly Gly Ile Tyr Phe Ser Glu
465 470 475 480

Phe Gly Trp Ala Glu Asp Ala Glu Tyr Asp Arg Gln Leu Leu Tyr Gln
485 490 495

Ile Thr Trp Asp Gly Leu Arg Thr Gln Tyr Leu Thr Asp Tyr Leu Ser
500 505 510

Gln Leu Leu Leu Ala Val His Lys Asp Gly Ile Asn Leu Arg Gly Ala
515 520 525

Leu Thr Trp Ser Phe Val Asp Asn Trp Glu Trp Gly Leu Gly Met Gln
530 535 540

Gln Lys Phe Gly Phe Gln Phe Val Asn Gln Ser Asp Pro Asp Leu Thr
545 550 555 560

Arg Thr Phe Lys Leu Ser Ala His Ala Tyr Ala Gln Phe Gly Arg Asn
565 570 575

His Leu His His His His His His
580

<210> 21
<211> 82
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 21

ccgctcgaga aaagagaggc tgaagctcac caccaccacc accacgaaaa cctgtatttt 60

cagatgatgc tgcatgctgc ac 82

<210> 22
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 22
aaggaaaaaa gcggccgctt acagatgatt acgcccaaat tg 42
<210> 23
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 23
atcactatgc cagcacgcag tgta 24
<210> 24
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 24
tttaaagccg atttcacctg ccgc 24
<210> 25
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 25
gactggttcc aattgacaag c 21
<210> 26
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético

<400> 26
gcaaatggca ttctgacatc c 21
<210> 27
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sintético
<400> 27
tactattgcc agcattgctg c 21

REIVINDICACIONES

1. Un ADN aislado que codifica una proteína recombinante β-hexosiltransferasa (rBHT) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO. 12, 14 o 20, preferiblemente que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO. 12 o 14.

2. El ADN aislado de la reivindicación 1, en donde el ADN tiene al menos un 97% de identidad con la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO. 11, 13 o 19, preferentemente con la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEC ID NO NO. 11 o 13.

3. El ADN aislado de la reivindicación 2, en donde el ADN tiene la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO. 11, 13 o 19, preferentemente con la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEC ID NO. 11 o 13.

4. Una proteína recombinante β-hexosil-transferasa enzimáticamente activa (rBHT) en donde la proteína tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO. 12, 14 o 20.

5. La proteína rBHT enzimáticamente activa de la reivindicación 4, en donde la proteína está unida a la membrana o una enzima soluble.

6. Un método para producir la proteína recombinante β-hexosil-transferasa enzimáticamente activa (rBHT) en una célula hospedera de levadura el cual comprende transformar la célula hospedera con un plásmido bajo el control de un promotor adecuado en donde el plásmido contiene un ADN aislado que codifica una proteína rBHT de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el promotor adecuado es un promotor de alcohol oxidasa.

8. El método de las reivindicaciones 6 o 7, en donde la proteína rBHT enzimáticamente activa tiene una actividad específica de aproximadamente 8 $U.mg^{-1}$ a 20°C.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en donde la célula hospedera de levadura es de *Pichia pastoris*.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende además el uso de la proteína recombinante β-hexosiltransferasa enzimáticamente activa (rBHT) producida en condiciones adecuadas para convertir la lactosa en galacto-oligosacáridos (GOS).

11. El método de la reivindicación 10, en donde la proteína rBHT enzimáticamente activa se inmoviliza sobre un soporte sólido.

12. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que las condiciones adecuadas son un reactor de tanque agitado continuo o discontinuo, un reactor de lecho empaquetado o un reactor de membrana de ultrafiltración.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10-12, que comprende además un organismo generalmente reconocido como seguro (GRAS) como un sistema de eliminación de la glucosa para evitar la inhibición competitiva de la glucosa, preferentemente el sistema de eliminación de la glucosa se usa simultáneamente con la proteína rBHT enzimáticamente activa.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende además usar la proteína recombinante β-hexosiltransferasa (rBHT) producida en un producto o subproducto alimentario que contiene lactosa modificada, preferentemente en donde el producto alimentario es un producto lácteo o subproducto.

15. El método de la reivindicación 14, en el que el producto o subproducto alimentario es un postre para bebés, un jugo para bebés, una merienda para bebés, una bebida de yogurt para bebés, una bebida energética, un agua para hacer ejercicio o un calmante de sed, un postre lácteo congelado, una bebida de frutas (enriquecido con vitaminas/minerales), un relleno de tarta de frutas, una preparación de frutas, una fórmula infantil, una bebida sustitutiva de comidas para bebés, una gelatia mermelada, una bebida sustitutiva de comidas, una leche, una bebida a base de leche, un sustituto de leche, un saborizante de jarabe para leche, yogur o suero de leche.

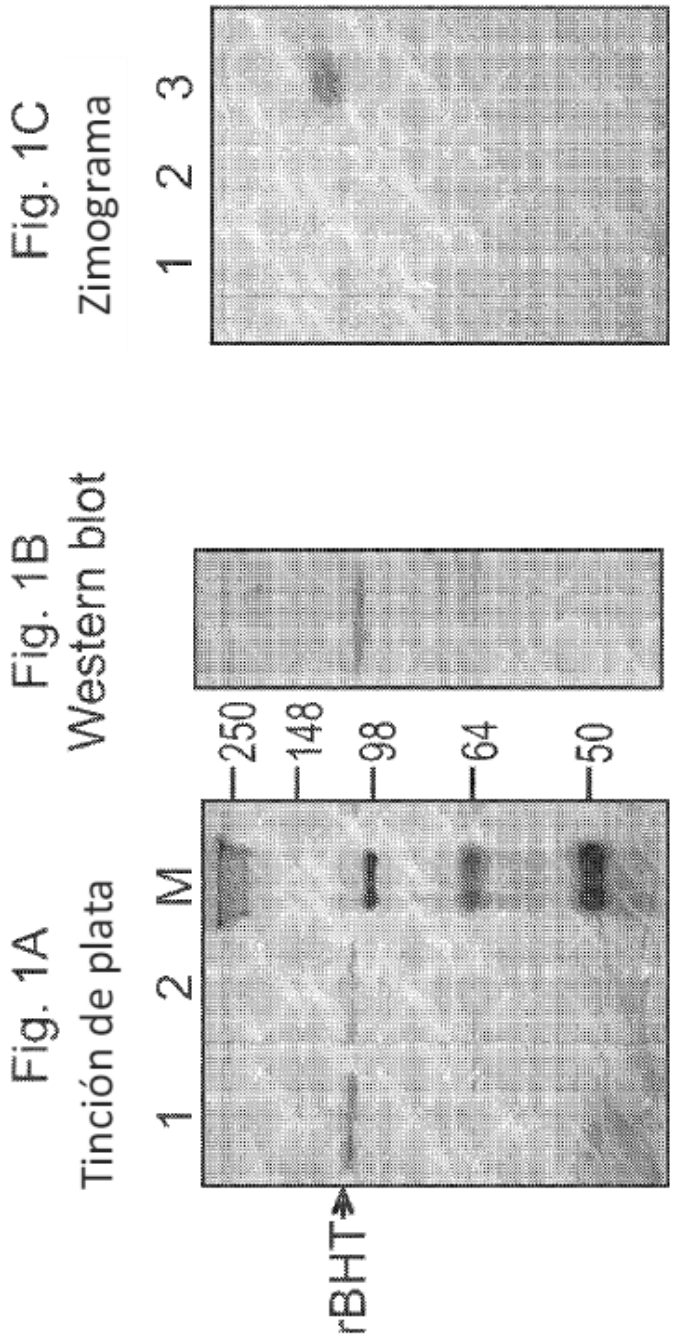


Fig. 1A
Tinción de plata
1
2
M
rBHT
250
148
98
64
50
Fig. 1B
Western blot
Fig. 1C
Zimograma
1
2
3

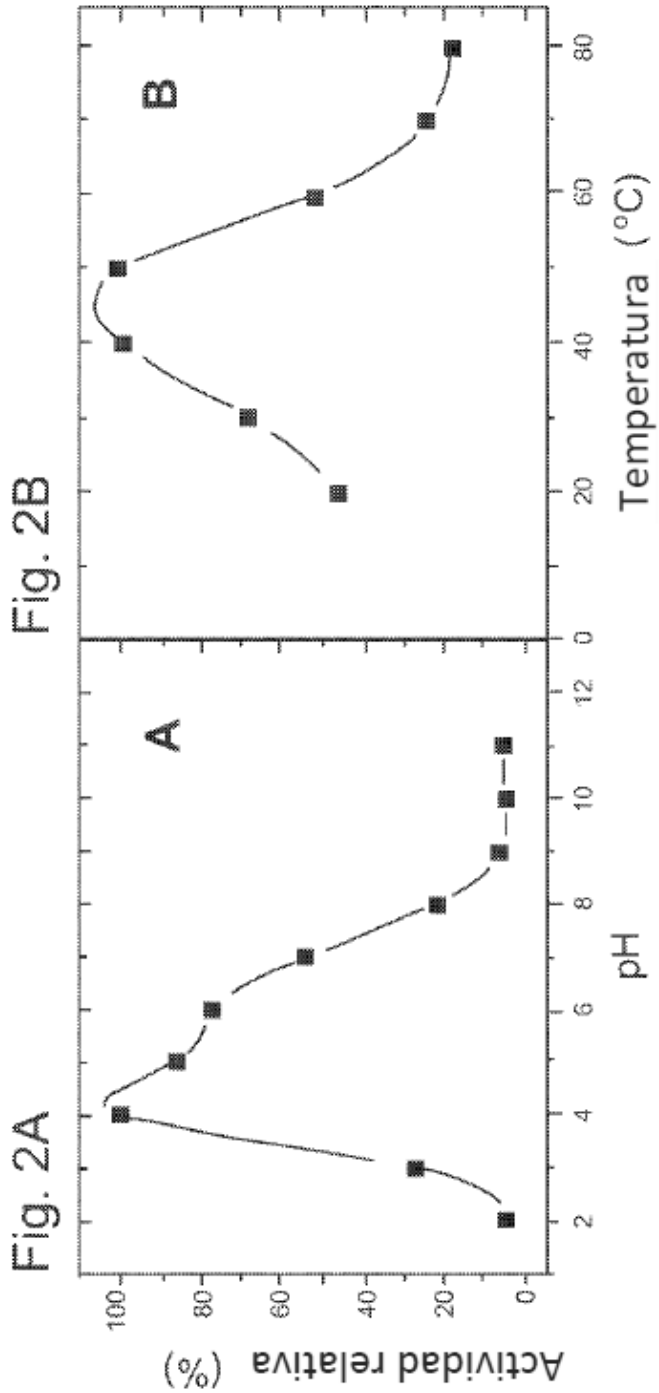


Fig. 2A
Fig. 2B
A
B
Actividad relativa (%)
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
10
12
pH
0
20
40
60
80
Temperatura (°C)

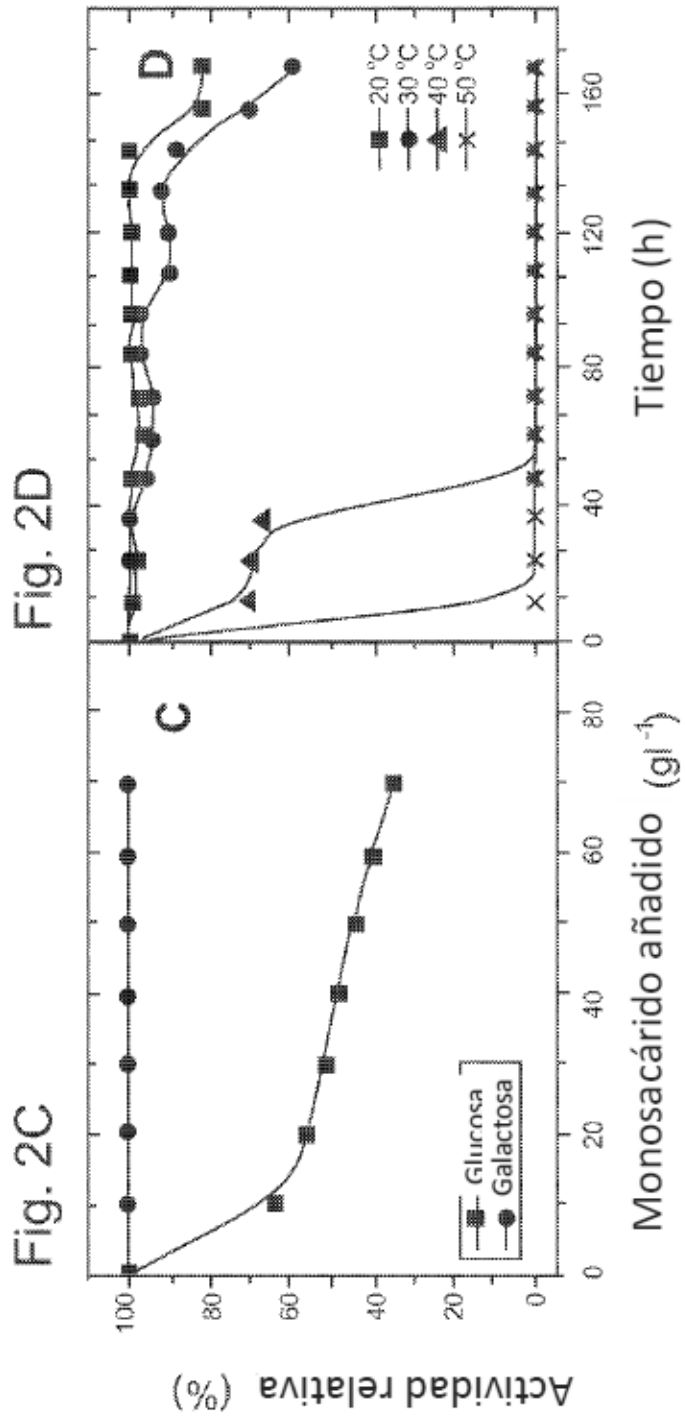
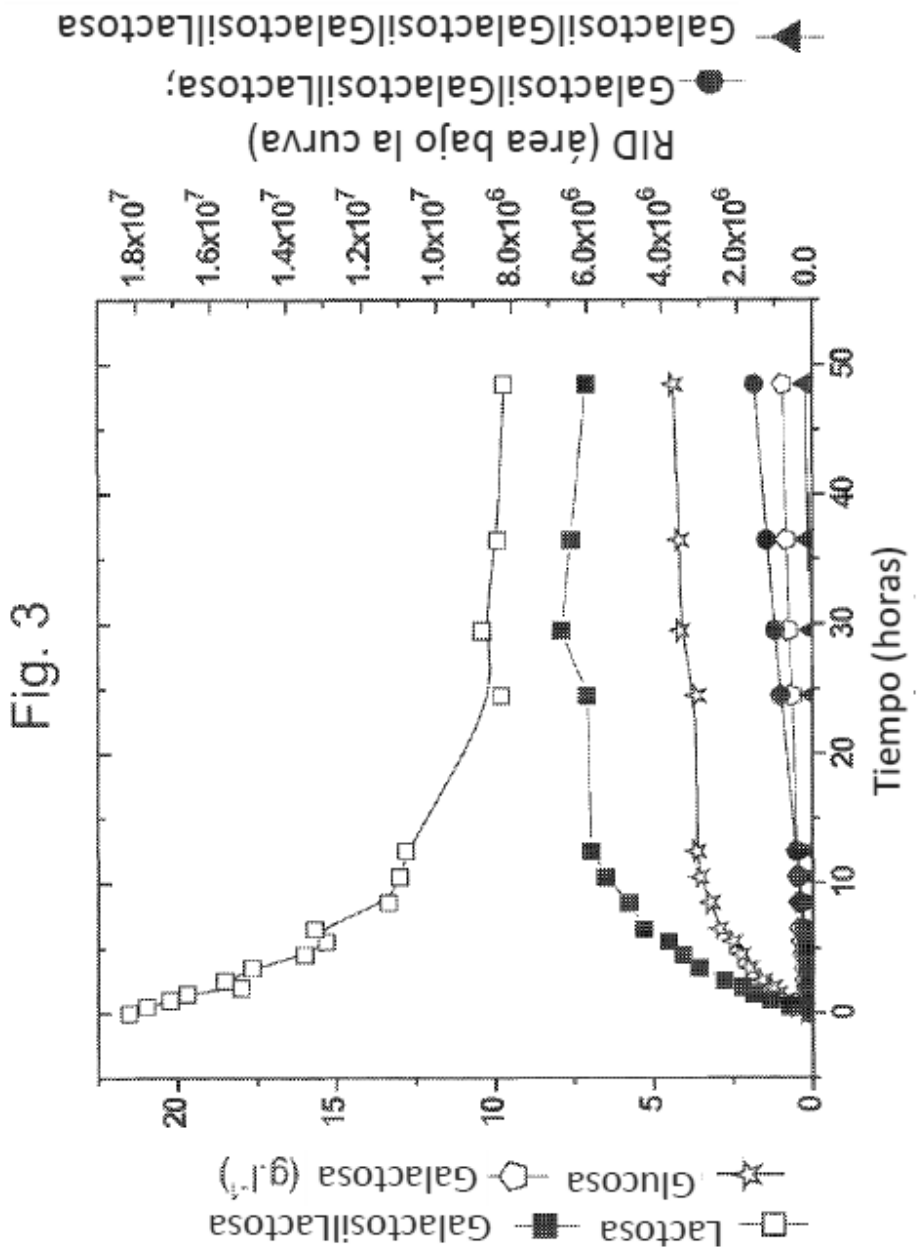


Fig. 2C
Fig. 2D
C
D
Actividad relativa (%)
Monosacárido añadido (gl-1)
Tiempo (h)
Glucosa
Galactosa
20 °C
30 °C
40 °C
50 °C
0
20
40
60
80
100
120
160

Fig. 3


Lactosa
GalactosilLactosa
Glucosa
Galactosa (g.l-1)
0
5
10
15
20
0
10
20
30
40
50
Tiempo (horas)
0.0
2.0x10^6
4.0x10^6
6.0x10^6
8.0x10^6
1.0x10^7
1.2x10^7
1.4x10^7
1.6x10^7
1.8x10^7
RID (área bajo la curva)
GalactosilGalactosilLactosa;
GalactosilGalactosilGalactosilLactosa

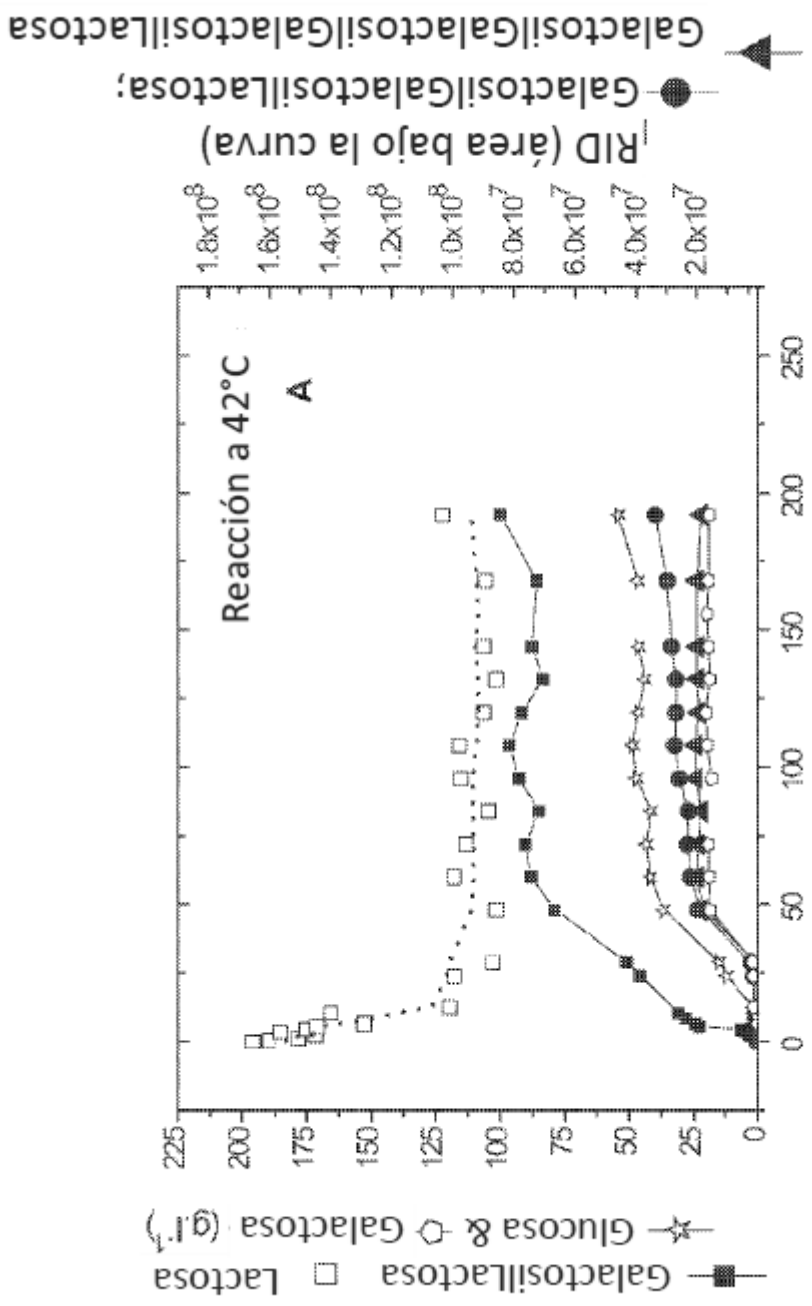

Galactosil Lactosa
Lactosa
Glucosa & Galactosa (g.l-1)
Reacción a 42°C
A
Tiempo (h)
RID (área bajo la curva)
GalactosilGalactosilLactosa;
GalactosilGalactosilGalactosilLactosa

Fig. 4A

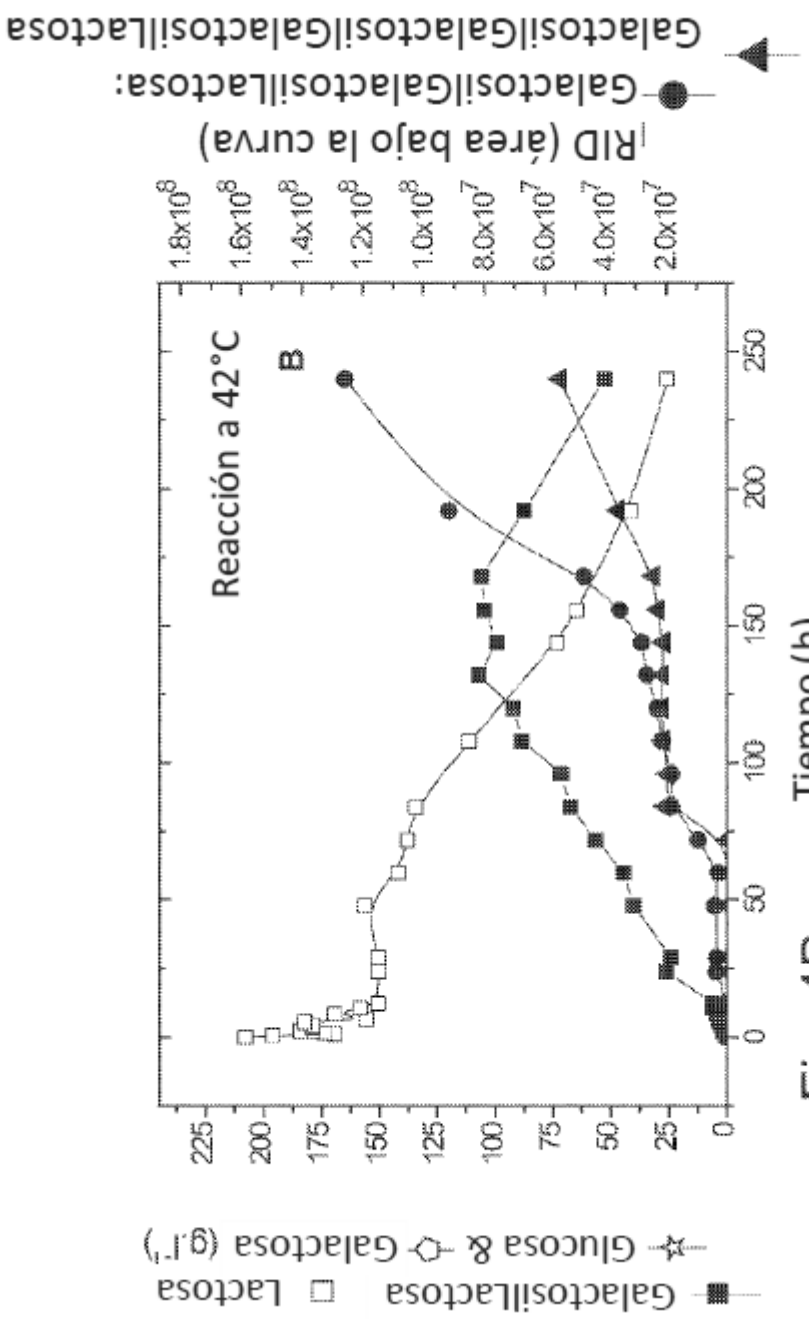

Reacción a 42°C
B
Tiempo (h)
RID (área bajo la curva)
GalactosilLactosa
Lactosa
Glucosa & Galactosa (g.l-1)
GalactosilGalactosilLactosa:
GalactosilGalactosilGalactosilLactosa

Fig. 4B

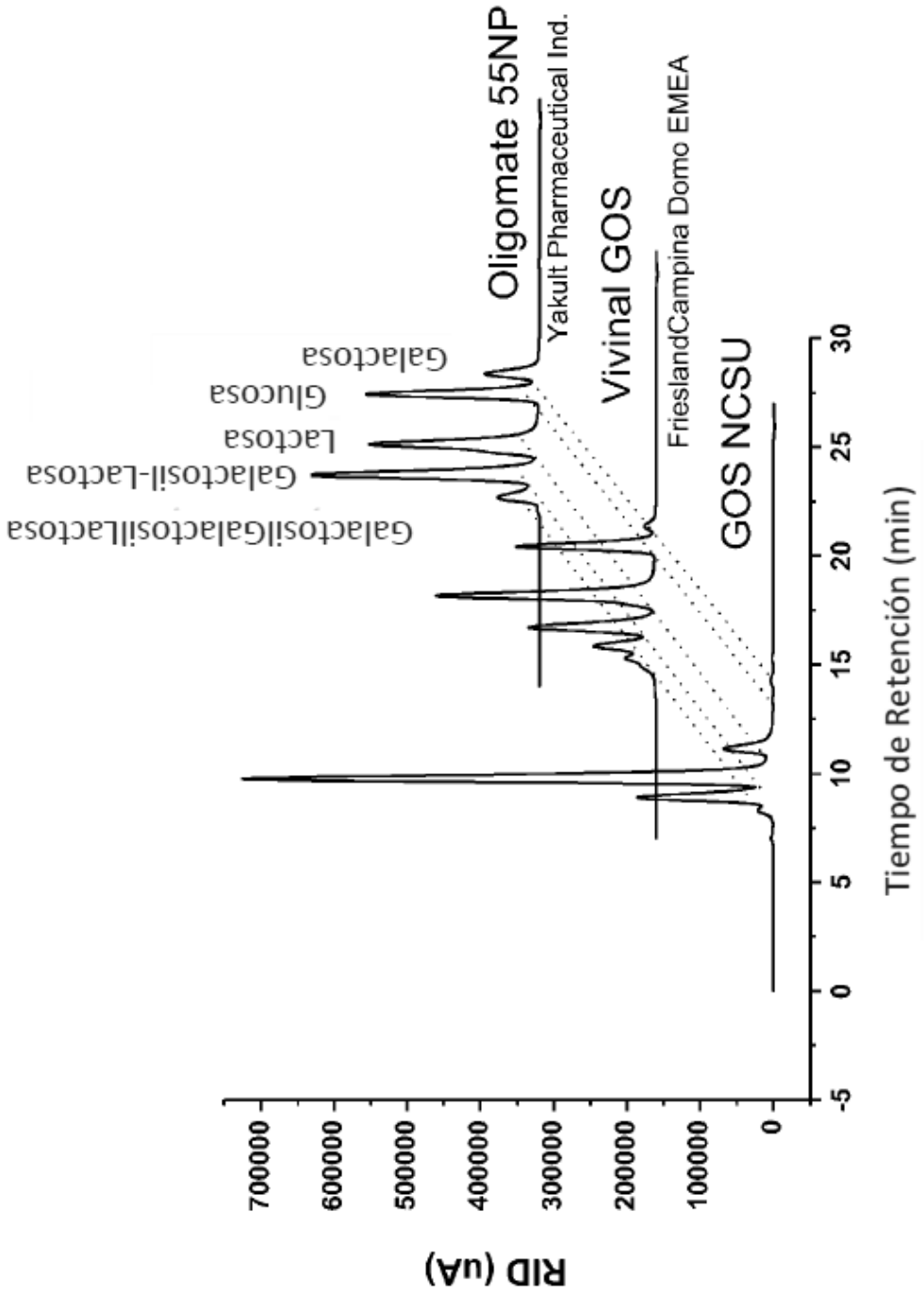

RID (uA)
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
-5
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo de Retención (min)
GalactosilGalactosilLactosa
Galactosil-Lactosa
Lactosa
Glucosa
Galactosa
Oligomate 55NP
Yakult Pharmaceutical Ind.
Vivinal GOS
FrieslandCampina Domo EMEA
GOS NCSU

Fig. 5

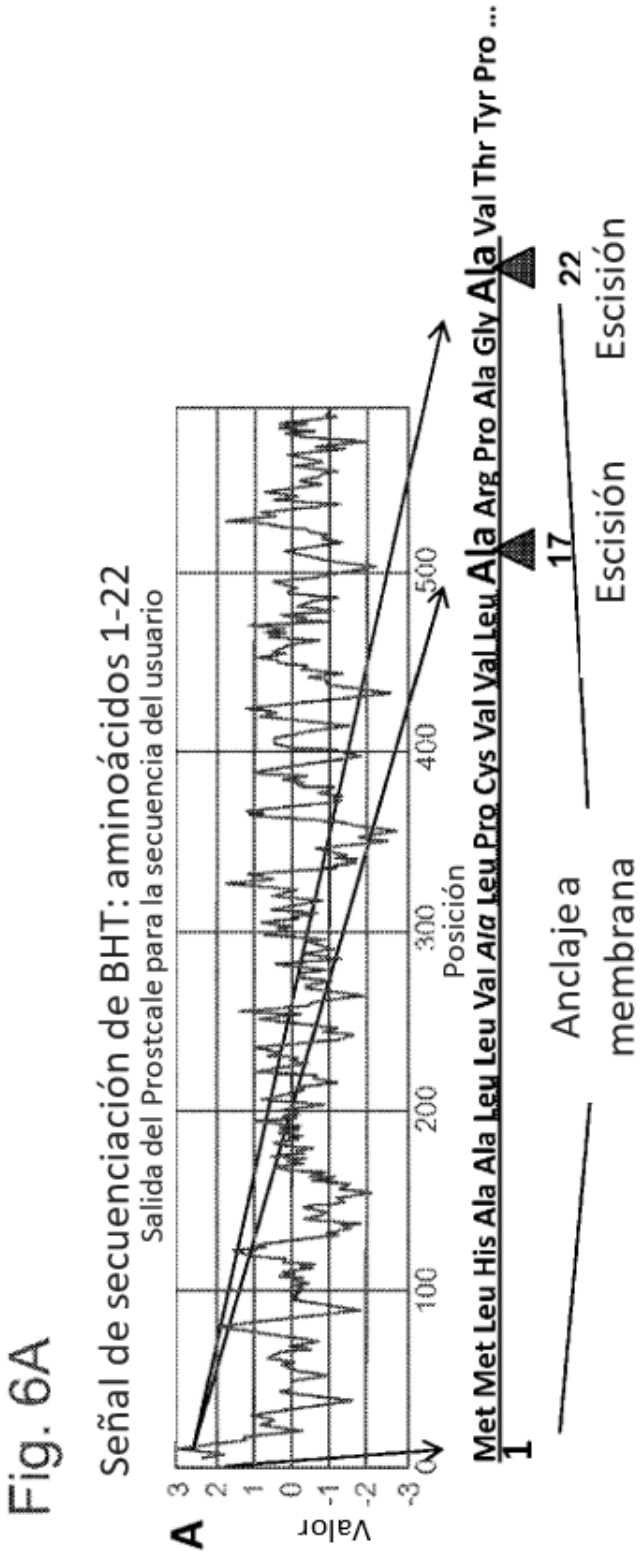


Fig. 6A
Señal de secuenciación de BHT: aminoácidos 1-22
Salida del Prostcale para la secuencia del usuario
A
Valor
3
2
1
0
-1
-2
-3
0
100
200
300
400
500
Posición
Met Met Leu His Ala Ala Leu Leu Val Ala Leu Pro Cys Val Val Leu Ala Arg Pro Ala Gly Ala Val Thr Tyr Pro ...
1
17
22
Anclaje a membrana
Escisión
Escisión

FP #	Construcción proteica					
	Nombre					
1	aMF- 6XHIS -TEV(Q/M)-rBHT	aMF— 6XHIS—TEV —	1-22	23-110	111-594	—COOH
2	aMF-6XHIS -TEV(Q/M) -rBHT-6XHIS	aMF— 6XHIS—TEV —	1-22	23-110	111-594	—6XHIS—COOH
3	aMF-rBHT-6XHIS	aMF—	1-22	23-110	111-594	—6XHIS—COOH
4	aMF -rBHT	aMF—	1-22	23-110	111-594	—COOH
5	aMF-rBHT(Δ1- 22) - 6XHIS	aMF—		23-110	111-594	—6XHIS—COOH
6	aMF-rBHT(Δ1-22)	aMF—		23-110	111-594	—COOH
7	rBHT-6XHIS		1-22	23-110	111-594	—6XHIS—COOH
8	rBHT(Δ1-22)-6XHIS			23-110	111-594	—6XHIS—COOH
9	aMF-rBHT(Δ1-110)-6XHIS	aMF—			111-594	—6XHIS—COOH

(A) Gráfico de hidropatía de Kyte y Doolittle para BHT. (B) Representación gráfica de las construcciones creadas. Codones de contacto: *Ala* contacto de hélice, Xxx contacto de mebrana, **Xxx** Escisión

Fig. 6B

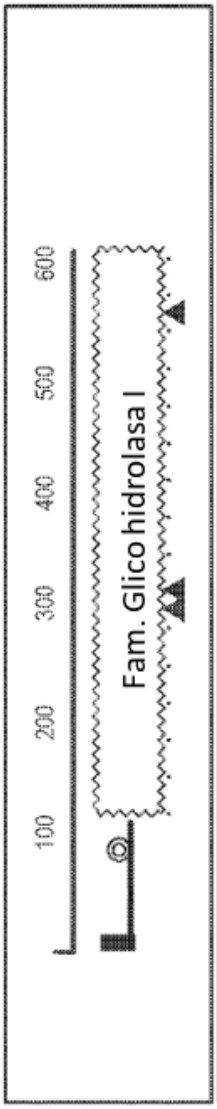


Fig. 7A

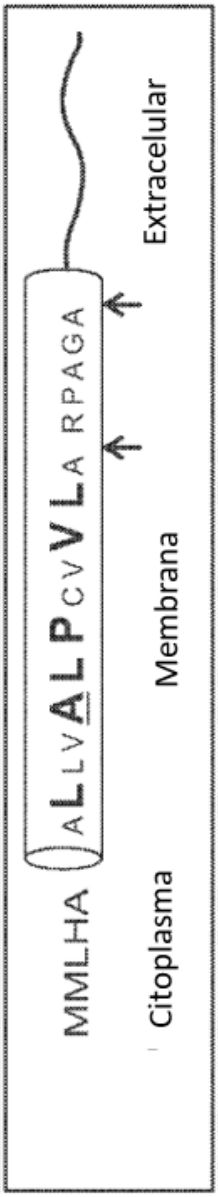


Fig. 7B

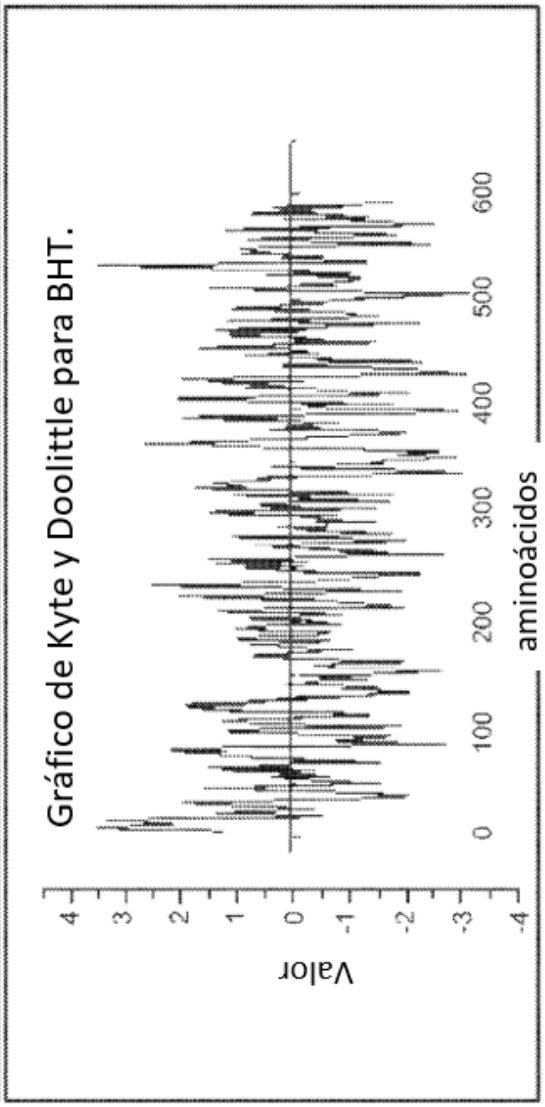


Fig. 7C

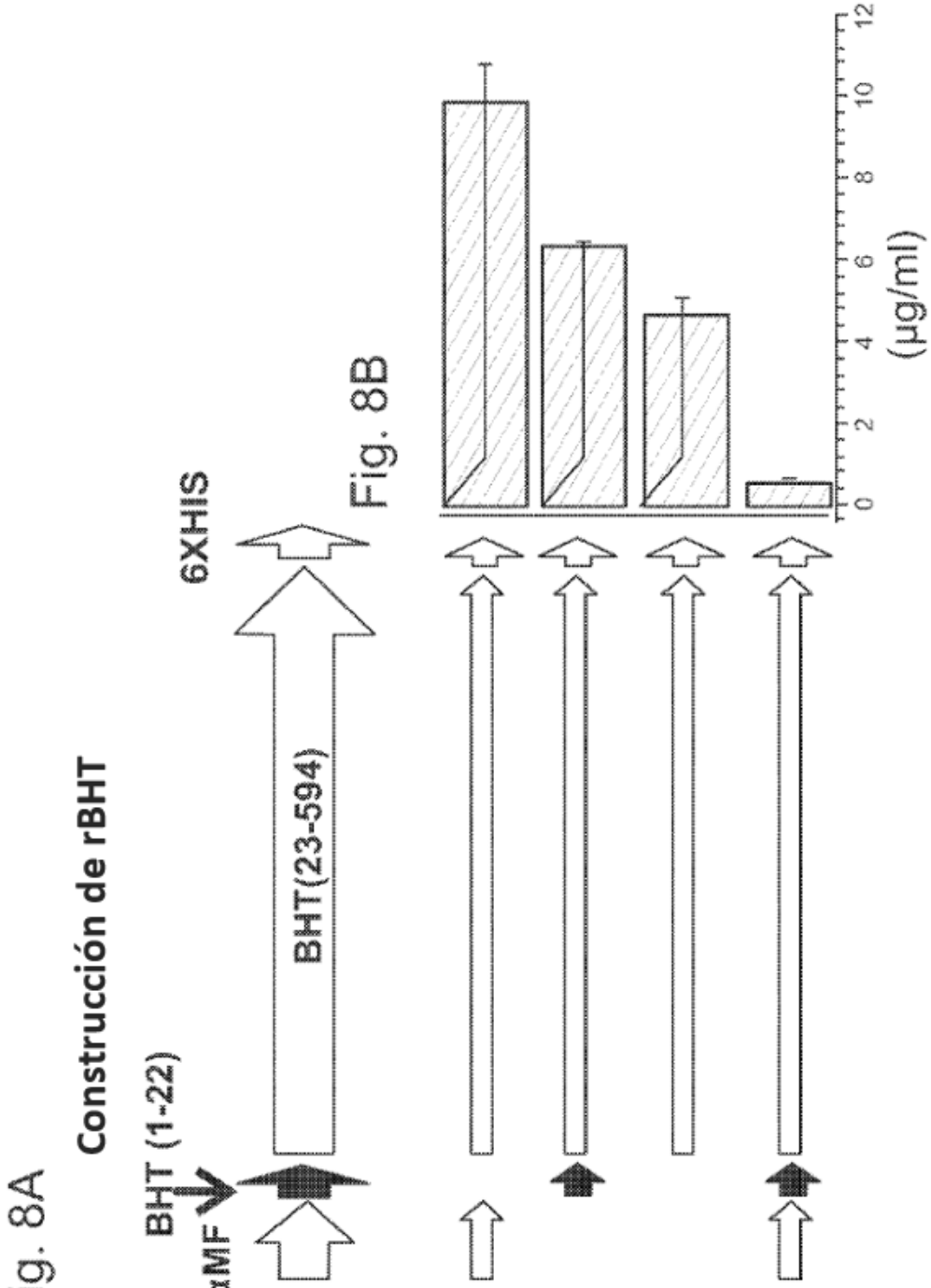


Fig. 8A
Construcción de rBHT
αMF
BHT (1-22)
BHT(23-594)
6XHIS
Fig. 8B
0
2
4
6
8
10
12
(µg/ml)

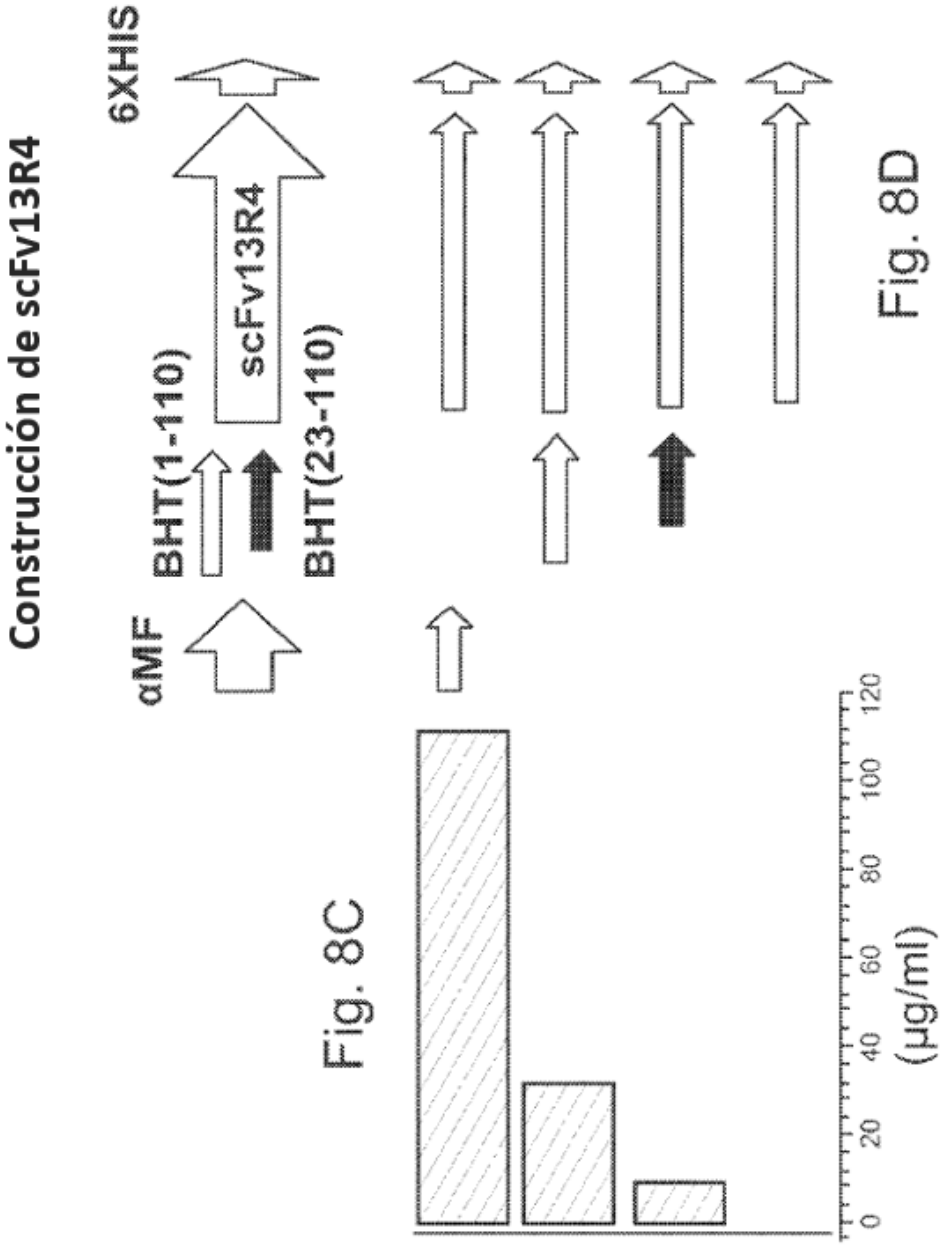

Construcción de scFv13R4
αMF
BHT(1-110)
BHT(23-110)
scFv13R4
6XHIS
0
20
40
60
80
100
120
(µg/ml)

Fig. 8C

Fig. 8D

Fig. 9A

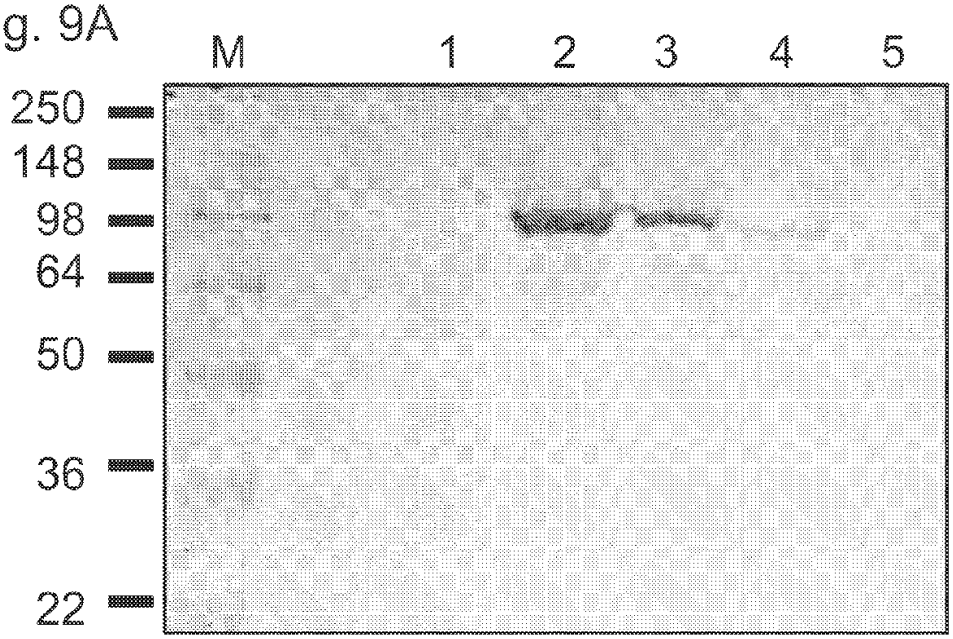
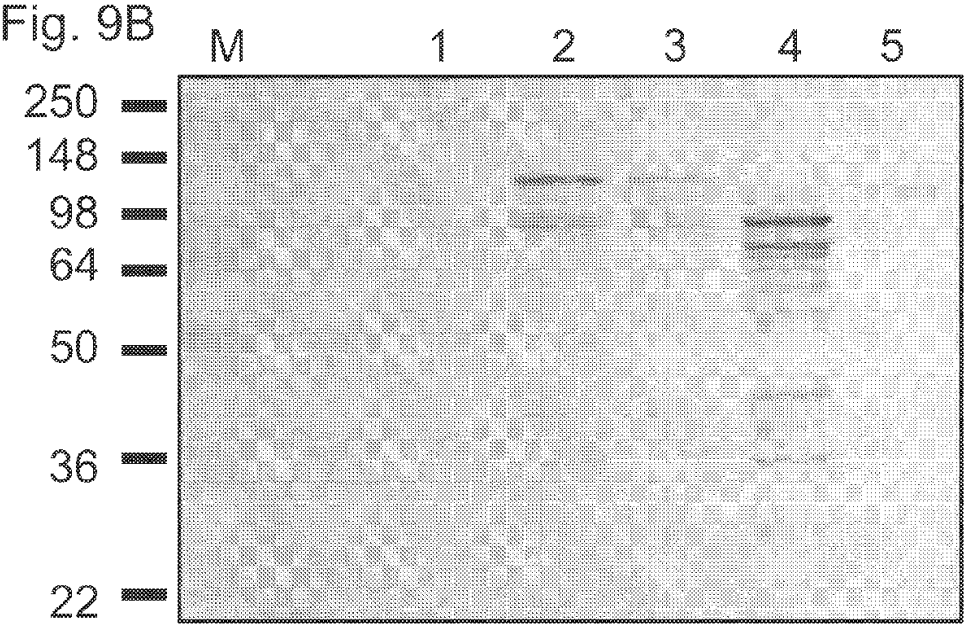


Fig. 9B



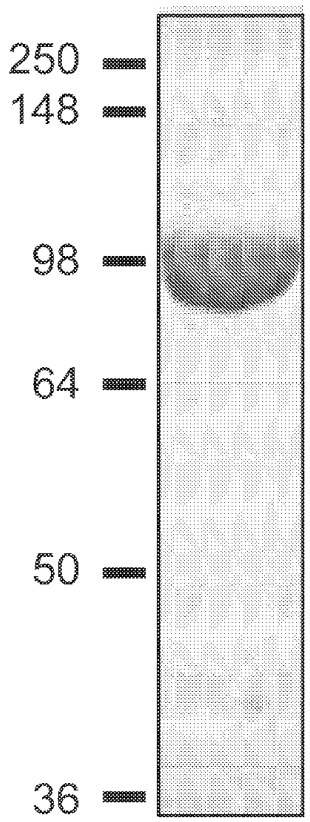


Fig. 9C

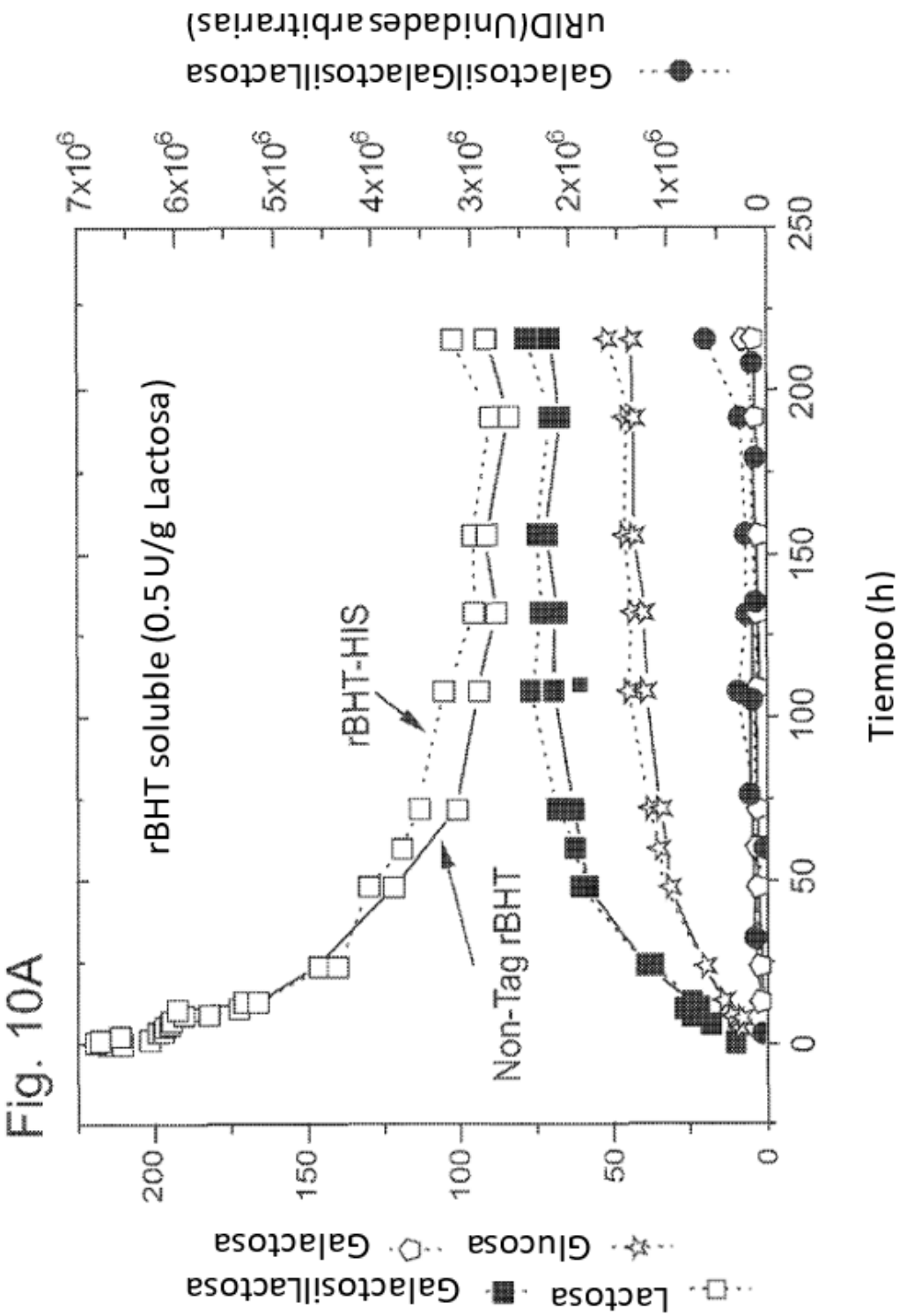
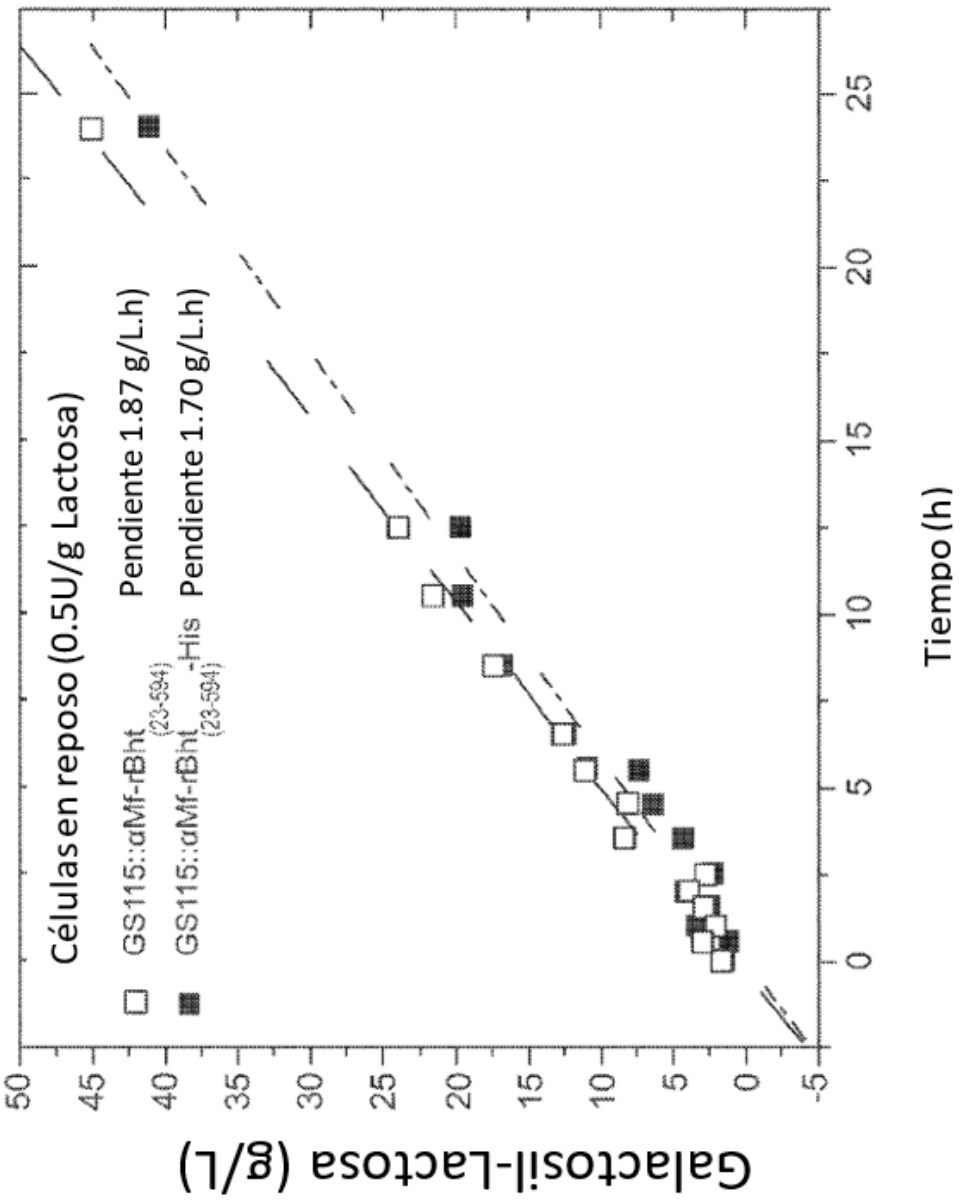


Fig. 10A
rBHT soluble (0.5 U/g Lactosa)
rBHT-HIS
Non-Tag rBHT
Lactosa
GalactosilLactosa
Glucosa
Galactosa
GalactosilGalactosilLactosa
uRID(Unidades arbitrarias)
Tiempo (h)
0
50
100
150
200
250
1x10^6
2x10^6
3x10^6
4x10^6
5x10^6
6x10^6
7x10^6

Fig. 10B


Células en reposo (0.5U/g Lactosa)
GS115::αMf-rBht(23-594)
Pendiente 1.87 g/L.h)
GS115::αMf-rBht(23-594)-His
Pendiente 1.70 g/L.h)
Galactosil-Lactosa (g/L)
Tiempo (h)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
0
5
10
15
20
25