



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 078**

51 Int. Cl.:  
**D06M 16/00** (2006.01)  
**C12N 9/42** (2006.01)  
**C11D 3/386** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96905208 .3**  
86 Fecha de presentación : **29.01.1996**  
87 Número de publicación de la solicitud: **0807193**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.1997**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento de tejidos que contienen celulosa usando composiciones de la enzima celulolasa truncaada.**

30 Prioridad: **01.02.1995 US 382452**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2007**

73 Titular/es: **GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.**  
**925 Page Mill Road**  
**Palo Alto, California 94304, US**

72 Inventor/es: **Fowler, Timothy;**  
**Clarkson, Kathleen, A.;**  
**Ward, Michael;**  
**Collier, Katherine, D. y**  
**Larenas, Edmund**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 281 078 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

Procedimiento de tratamiento de tejidos que contienen celulosa usando composiciones de la enzima celulolasa truncada.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para tratar con celulosa tejidos que contienen algodón y tejidos con celulosa que no contienen algodón. En particular, el procedimiento de la presente invención se refiere a poner en contacto tejidos que contienen algodón y tejidos que no contienen algodón con una composición que contiene una composición de celulosa que comprende uno o más enzimas celulosa truncados.

10 **Estado de la técnica**

Durante su fabricación o poco después, los tejidos que contienen algodón pueden tratarse con celulosa para proporcionar al tejido propiedades deseables. Por ejemplo, en la industria textil, la celulosa ha sido utilizada para mejorar el tacto y/o la apariencia de tejidos que contienen algodón, para eliminar fibras superficiales de los tejidos que contienen algodón, para proporcionar la apariencia de lavado a la piedra a tejanos y similares que contienen algodón.

20 En particular, las solicitudes de patente japonesas 58-36217 y 58-54032 así como también Ohishi *et al.*, "Reformation of Cotton Fabric by Cellulase" y el artículo de JTN en Diciembre de 1988 "What's New - Weight Loss Treatment to Soften the Touch of Cotton Fabric" describen que el tratamiento con celulosa de telas que contienen algodón proporciona un tacto mejorado a la tela. Generalmente se cree que este tratamiento con celulosa elimina la borrilla y/o las fibras superficiales del algodón reduciendo el peso de la tela. La combinación de estos efectos proporciona un tacto mejorado a la tela.

25 Adicionalmente, en el campo de la técnica era conocido el tratamiento de telas con una solución de celulosa, bajo condiciones de agitación y en cascada, por ejemplo mediante la utilización de un chorro, con el propósito de eliminar las fibras e hilos rotos habituales en estas telas tejidas.

30 Las prendas de vestir confeccionadas con telas de celulosa, como los tejanos de algodón, tienen una textura rígida debido a la presencia de composiciones de apresto utilizadas para facilitar la fabricación, el manejo y el conjuntado de artículos de confección y normalmente la apariencia es de un teñido reciente e intenso. Una característica deseable de la ropa tejana teñida con índigo es la modificación de los hilos teñidos con hilos blancos, lo que proporciona al tejano una apariencia de blanco sobre azul.

35 Después de un periodo largo de uso y lavado, en los artículos de confección, en particular los tejanos, se pueden desarrollar variaciones en la profundidad o la densidad del color, en forma de aclarado, localizadas en las piezas y las costuras de la prenda de vestir. Adicionalmente, a menudo puede aparecer un desgaste general de las prendas de vestir, así como fruncidos y algunas arrugas en las piezas de tela. Adicionalmente, después del lavado, se elimina sustancialmente el apresto de la tela resultando en una sensación más suave. En los últimos años, la apariencia de usado o "lavado a la piedra" se ha convertido en muy deseable para una parte sustancial del público.

40 Los procedimientos anteriores para proporcionar esa apariencia de usado incluían el lavado a la piedra de una pieza de vestir en un baño de grandes dimensiones con piedras pómez con un tamaño de partícula de aproximadamente 1 a 10 pulgadas y con partículas de piedra pómez más pequeñas generadas por la naturaleza abrasiva del procedimiento. Normalmente, la prenda de vestir se voltea con la piedra pómez mientras está húmeda durante un periodo suficiente como para que la piedra pómez desgaste la tela para provocar zonas desgastadas de color más claro localizadas en las piezas de tela y zonas más claras similares en las costuras. Adicionalmente la piedra pómez suaviza la tela y provoca una superficie con pelusa parecida a la producida por el uso y el lavado de la tela durante un periodo largo. Este procedimiento genera el efecto deseado de contraste de blanco sobre azul descrito arriba.

50 El uso de las piedras pómez tiene varias desventajas, incluyendo los daños por sobrecarga de los motores de las máquinas, el daño mecánico en los mecanismos de transporte y en los tambores de lavado, problemas con la eliminación al medio de la arena que se produce y gastos elevados de costura asociados con la eliminación manual de las piedras que quedan en los bolsillos de las prendas.

55 En vista de los problemas asociados con las piedras pómez en el lavado a la piedra, se utilizan las soluciones de celulosa como un sustituto de las piedras pómez bajo condiciones de agitación y en cascada, es decir, en una máquina de lavado de tambor rotatorio, para generar una apariencia de "lavado a la piedra" a los tejanos (Patente US 4832864). El documento EP-A-0307564 también describe el uso de la celulosa para proporcionar una apariencia de tela lavada a la piedra.

60 Las celulasas son enzimas que hidrolizan celulosa (enlaces  $\beta$ -1,4-D-glucano) y proporcionan glucosa, celobiosa, celooligosacáridos, y similares como productos principales. Las celulasas las producen varios microorganismos y comprenden varias clasificaciones enzimáticas diferentes que incluyen aquellas identificadas como exo-celobiohidrolasas (*en inglés exo-cellobiohydrolases*, CBH), endoglucanasas (EG) y  $\beta$ -glucosidasas (BG) (Schulein, M, 1988 Methods in Enzymology 160: 235-242).

Los enzimas incluidos en estas clases pueden separarse en componentes individuales. Por ejemplo, la celulosa producida por los hongos filamentosos, *Trichoderma longibrachiatum*, en adelante *T. longibrachiatum*, consiste en al menos dos componentes CBH, es decir CBHI y CBHII, y al menos cuatro componentes EG, es decir, los componentes EGI, EGII, EGIII y EGV (Saloheimo, A. *et al.* 1993 in Proceedings of the second TRICEL symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases, Espoo, Finland, ed. por P. Suominen & T. Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8:139-146), y al menos una  $\beta$ -glucosidasa. Los genes que codifican estos componentes se denominan cbh1, cbh2, egl1, egl2, egl3, y egl5 respectivamente.

El sistema completo de celulasa que comprende los componentes CBH, EG y BG actúa sinérgicamente en la conversión de celulosa cristalina a glucosa. Las dos exo-celobiohidrolasas y las cuatro endoglucanasas conocidas actúan conjuntamente para hidrolizar la celulosa a celo-oligosacáridos pequeños. Los oligosacáridos (principalmente celobiosas) se hidrolizan a glucosa mediante las principales  $\beta$ -glucosidasas (con una hidrólisis adicional de componentes menores de las  $\beta$ -glucosidasas).

Un problema con el uso de composiciones completas de celulasa de microorganismos *Trichoderma sp.* y de otras fuentes fúngicas para el lavado a la piedra de la ropa tejana teñida es la eliminación incompleta del colorante provocada por la redeposición o el reteñido de parte del tinte que vuelve a teñir la ropa durante el procedimiento de lavado a la piedra. En el caso de telas tejanas, esto causa la recoloración de los hilos azules y la coloración de los hilos blancos, resultando en menos contraste entre los hilo azules y los blancos y los puntos de abrasión (es decir, una apariencia de azul sobre azul en vez del blanco sobre azul preferido). Ver, American Dyestuff Reporter, Sept. 1990, pp. 24-28. Esta redeposición es inaceptable para parte de los usuarios.

Son preferidas las celulasas de *Trichoderma* a causa de su actividad superior sobre las telas tejanas, incluso aunque provoquen el reteñido. Adicionalmente, las celulasas con un alto nivel de pureza pueden ser beneficiosas en la presente invención. La alta actividad específica o un alto nivel de pureza resultan en un nivel de abrasión más elevado con un procesamiento significativamente más corto y por lo tanto es preferible para los fabricantes de ropa tejana.

Los intentos de reducir la cantidad del tinte que se redeposita incluyen la adición de productos químicos adicionales, como surfactantes, proteasas u otros agentes, en el lavado de celulasa para ayudar a dispersar el tinte desprendido. Adicionalmente, los fabricantes utilizan una celulasa completa menos activa, conjuntamente con lavados extra. Aún así, esto resulta en costes adicionales y en tiempos de procesamiento mayores. Otro procedimiento incluye el uso de un agente suave del tipo lejía o un agente para la eliminación del tinte. Este procedimiento afecta al tono final de la prenda e incrementa el tiempo de procesamiento. Finalmente, para el fabricante la utilización conjunta de enzimas y piedras comporta todos los problemas que causa la utilización sólo de piedras. Por lo tanto, es deseable encontrar un procedimiento para prevenir la redeposición del colorante durante el lavado a la piedra con celulasas.

El análisis de proteínas de las celobiohidrolasas (CBHI y CBHII) y de las principales endoglucanasas (EGI y EGII) de *T. longibrachiatum* muestra que existe una organización bifuncional en forma de un dominio del centro catalítico y un dominio de unión para celulosa más pequeño separados por un conector o una región bisagra flexible de aminoácidos rica en prolina y hidroxiaminoácidos. A partir de *T. longibrachiatum* se han aislado genes para las dos celobiohidrolasas, CBHI y CBHII (Shoemaker, S *et al* 1983 Bio/Technology 1, 691-696, Teeri, T *et al* 1983, Bio/Technology 1, 696-699 y Teeri, T. *et al.*, 1987, Gene 51, 43-52) y para dos de las endoglucanasas principales, EGI y EGII (Penttila, M. *et al* 1986, Gene 45, 253-263, Van Arsdell, J.N/ *et al* 1987 Bio/Technology 5, 60-64 y Saloheimo, M. *et al* 1988, Gene 63, 11-21) y se ha confirmado la estructura del dominio proteico.

En las celulasas bacterianas se encuentra una organización bifuncional de enzimas celulasa similar. Se han estudiado extensivamente el dominio de unión celulasa (CBD) y el centro catalítico de la endoglucanasa A de *Cellulomonas fimi* (*C. fimi* Cen A) (Ong E. *et al* 1989, Trends Biotechnol. 7:239-243, Pilz *et al* 1990, Biochem J. 271:277-280 y Warren *et al* 1987, Proteins 1:335-341). Se han clonado los fragmentos génicos que codifican el CBD y el CBD con el conector, expresado en *E. coli* y han demostrado tener nuevos efectos sobre las fibras de celulosa (Gilkes, N.R. *et al* 1991, Microbiol. Rev. 55:305-315 y Din, N *et al* 1991, Bio/Technology 9:1096-1099). Por ejemplo, el CBD aislado a partir de *C. fimi* Cen A expresado genéticamente en *E. coli* rompe la estructura de las fibras de celulosa y libera pequeñas partículas pero no tiene una actividad hidrolítica detectable. El CBD además tiene un amplio espectro de aplicaciones en la purificación de proteínas y en la inmovilización enzimática. Por otro lado, el dominio catalítico de *C. fimi* Cen A aislado a partir de la celulasa escindida por proteasa no rompe la estructura fibrosa de la celulosa y en vez de ello suaviza la superficie de la fibra.

Utilizando este procedimiento bioquímico se han separado proteolíticamente y se han purificado los dominios del centro CBHI de *Trichoderma longibrachiatum* obteniendo solamente cantidades del orden de miligramos (Offord D., *et al* 1991, Applied Biochem. and Biotech. 28/29:377-386). Se han llevado a cabo estudios similares para el análisis de los dominios de centro y de unión de CBHI, CBHII, EGI y EGII aislados a partir de *T. longibrachiatum* después de proteólisis bioquímica, pero sólo se recuperó proteína suficiente para un análisis estructural y funcional (Tomme, P *et al.*, 1988, Eur.J. Biochem 170:575-581 y Ajo, S, 1991 FEBS 291:45-49). Por lo tanto, en el estado de la técnica no se han reconocido las posibles mejoras en el procesamiento textil que proporciona el uso de regiones de dominios de centros celulasa o de unión de celulasa.

**Resumen de la invención**

Uno de los objetos de la presente invención es proporcionar un procedimiento para el tratamiento de telas que contienen celulosa que tiene como resultado una redeposición reducida y un nivel equivalente de abrasión de la tela tratada en comparación con los procedimientos conocidos en la técnica anterior.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento como el definido en la reivindicación 1 para el tratamiento de telas que contienen celulosa con una composición de celulosa. La composición de celulosa comprende un enzima truncado que comprende un centro catalítico de tipo CBH que carece de un dominio de unión celulosa. Preferiblemente, el centro truncado de celulosa comprende un centro CBHI o CBHII. Más preferiblemente, la concentración de celulosa es de aproximadamente 0,1 a 1000 ppm, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 250 ppm.

A causa de la actividad de redeposición sorprendentemente reducida de las composiciones de enzima celulosa truncada de acuerdo con la presente invención, las telas que contienen celulosa podrían mejorarse de una manera sorprendente en cuanto al lavado a la piedra con una composición apropiada que contenga el enzima truncado.

Una ventaja de la presente invención es que se emplea una composición de celulosa que comprende un enzima con centro truncado de celulosa en combinación con una celulosa no truncada del tipo EG que comprende un dominio de unión a celulosa y un centro catalítico, que le otorgan características deseables a las telas que contienen celulosa.

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1(a)-1(b) muestra el ADN genómico y la secuencia de aminoácidos del CBHI derivado a partir de *Trichoderma longibrachiatum*. La secuencia de señalización comienza en el par de bases 210 y acaba en el par de bases 260 (Seq ID No. 25). El dominio del centro catalítico comienza en el par de bases 261 hasta el par de bases 671 del primer exón, el par de bases 739 hasta el par de bases 1434 del segundo exón, y el par de bases 1498 hasta el par de bases 713 del tercer exón (Seq ID No. 9). La secuencia del conector comienza en el par de bases 714 y acaba en el par de bases 1785 (Seq ID No. 17). El dominio de unión comienza en el par de bases 1786 y acaba en el par de bases 1888 (Seq ID No. 1). Las secuencias Seq ID Nos. 26, 10, 18 y 2 representan la secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización CBHI, el dominio del centro catalítico, la región del conector y el dominio de unión, respectivamente.

La figura 2(a)-2(b) muestra el ADN genómico y la secuencia de aminoácidos del CBHII derivado a partir de *Trichoderma longibrachiatum*. La secuencia de señalización comienza en el par de bases 614 y acaba en el par de bases 685 (Seq ID No. 27). El dominio de unión de celulosa comienza en el par de bases 686 hasta el par de bases 707 del exón número uno, el par de bases 755 hasta el par de bases 851 del exón número dos (Seq ID No. 3). La secuencia del conector comienza en el par de bases 852 y acaba en el par de bases 980 (Seq ID No. 19). El dominio del centro catalítico comienza en el par de bases 981 hasta el par 1141 del exón número dos, el par de bases 1199 hasta el par de bases 1445 del exón número tres, y el par de bases 1536 hasta el par de bases 2221 del exón número cuatro (Seq ID No. 11). Las secuencias Seq ID Nos. 28, 4, 20 y 12 representan la secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización CBHII, el dominio de unión, la región del conector y el dominio del centro catalítico, respectivamente.

La figura 3 muestra el ADN genómico y la secuencia de aminoácidos del EGI. La secuencia de señalización comienza en el par de bases 113 y acaba en el par de bases 178 (Seq ID No. 29). El dominio del centro catalítico comienza en el par de bases 179 hasta el par de bases 882 del primer exón, y el par de bases 963 hasta el par de bases 1379 del segundo exón (Seq ID No. 13). La secuencia del conector comienza en el par de bases 1380 y acaba en el par de bases 1460 (Seq ID No. 21). El dominio de unión de la celulosa comienza en el par de bases 1461 y acaba en el par de bases 1616 (Seq ID No. 5). Las secuencias Seq ID Nos. 30, 14, 22 y 6 representan la secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización EGI, el dominio del centro catalítico, la región del conector y el dominio de unión, respectivamente.

La figura 4 muestra el ADN genómico y la secuencia de aminoácidos del EGII. La secuencia de señalización comienza en el par de bases 262 y acaba en el par de bases 324 (Seq ID No. 31). El dominio de unión de celulosa comienza en el par de bases 325 y acaba en el par de bases 432 (Seq ID No. 7). La secuencia del conector comienza en el par de bases 433 y acaba en el par de bases 534 (Seq No. 23). El dominio del centro catalítico comienza en el par de bases 535 hasta el par 590 del exón número uno, el par de bases 765 hasta el par de bases 1689 del exón número dos (Seq ID No. 15). Las secuencias Seq ID Nos. 32, 8, 24 y 16 representan la secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización EGI, el dominio de unión, la región del conector y el dominio del centro catalítico, respectivamente.

La figura 5 muestra el ADN genómico y la secuencia de aminoácidos del EGIII. La secuencia de señalización comienza en el par de bases 151 y acaba en el par de bases 198 (Seq No. 35). El dominio del centro catalítico comienza en el par de bases 199 hasta el par 557 del exón número uno, el par de bases 613 hasta el par de bases 833 del exón número dos y el par de bases 900 hasta el par de bases 973 del exón número tres (Seq ID No. 33). Las secuencias Seq ID Nos. 36 y 34 representan la secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización EGIII y el dominio del centro catalítico, respectivamente.

La Figura 6 ilustra la construcción del vector de expresión del dominio del centro EGI (Seq ID No. 37).

## ES 2 281 078 T3

La Figura 7 ilustra la construcción del plásmido de expresión pTEX (Seq ID No. 39-41).

La Figura 8 ilustra la construcción del vector de expresión del dominio del centro CBHI (Seq ID No. 38).

5 La Figura 9 ilustra la construcción del vector de expresión del dominio del centro CBHII (Seq ID No. 39).

La Figura 10 ilustra los resultados de abrasión/redeposición que se obtienen y compara el centro EGI con EGI y el centro EGII con EGII.

10 La Figura 11 ilustra la mejora en los resultados de abrasión/redeposición de ropa tejana tratada con EGIII añadiendo CBHI.

### Descripción detallada de la invención

#### 15 I. Definiciones

“Tela que contiene algodón” significa telas cosidas o sin coser hechas con algodón puro o mezclas de algodón que incluyen telas de algodón tejidas, telas de algodón de punto, telas de algodón tejanas, hilos de algodón y similares. Cuando se emplean mezclas de algodón, la cantidad de algodón en la tela debería ser de aproximadamente al menos el 40 por ciento en peso de algodón; preferiblemente, más de aproximadamente el 60 por ciento en peso de algodón; y más preferiblemente, más de aproximadamente el 75 por ciento en peso de algodón. Cuando se emplea en forma de mezclas, el otro material que se emplea en la tela puede incluir una o más fibras distintas al algodón incluyendo fibras sintéticas como las fibras de poliamida (por ejemplo nylon 6 y nylon 66), fibras acrílicas (por ejemplo, fibras de poliacrilonitrilo), y fibras de poliéster (por ejemplo, tereftalato de polietileno), fibras de alcohol polivinílico (por ejemplo, Vinyon), fibras de cloruro de polivinilo, fibras de cloruro de polivinilideno, fibras de poliuretano, fibras de poliurea y fibras de aramida.

“Tela que contiene celulosa” significa cualquier tela celulósica que contiene o no contiene algodón o mezcla que contiene o no contiene algodón incluyendo celulósicos naturales y celulósicos fabricados por el hombre (como yute, lino, ramié, rayón, TENCEL™). Entre las telas del título fabricadas por el hombre que contienen celulosa se incluyen telas regeneradas que son conocidas en la técnica anterior como el rayón. Otras telas fabricadas por el hombre que contienen celulosa incluyen fibras de celulosa modificadas químicamente (por ejemplo, celulosa derivada con acetato) y fibras de celulosa hilada en solvente (por ejemplo, lyocell). Por supuesto, la definición de tela que contiene celulosa incluye cualquier prenda o hilo hecho con tales materiales. De manera similar, “tela que contiene celulosa” incluye fibras textiles fabricadas de tales materiales.

“Composición de lavado a la piedra” significa una formulación para uso en telas lavadas a la piedra que contienen celulosa. Las composiciones de lavado a la piedra se utilizan para modificar las telas que contienen celulosa antes de ponerlas para la venta al público, es decir, durante el proceso de fabricación, a diferencia de las composiciones detergentes que se suponen para el lavado de prendas sucias.

“Lavado a la piedra” se refiere al tratamiento de una tela de color que contiene celulosa con una solución de celulosa en condiciones de agitación y en cascada, es decir, en una máquina de lavado de tambor rotatorio, que aporta una apariencia de “lavado a la piedra” a la ropa tejana. En la patente US 4832864 se describen procedimientos para proporcionar una apariencia de tela lavada a la piedra. Generalmente, las técnicas de lavado a la piedra se aplican a la ropa tejana teñida.

“Celulosa de redeposición” se refiere a las celulosas que, al utilizarlas en el lavado a la piedra enzimático o en otros tratamientos de telas que contienen celulosa que utilizan soluciones de celulosa, provocan la redeposición del tinte sobre el sustrato. Este efecto a menudo se denomina “backstaining”. Dicho “backstaining” de la tela conlleva un lavado a la piedra incompleto debido a que en vez del contraste de azul sobre blanco deseado, la redeposición provoca una coloración azul sobre azul. Las celulosas de redeposición incluyen aquellas derivadas de microorganismos tales como el microorganismo fúngico *Trichoderma sp.* y similares. En particular, EGI, EGII, CGHI y CBHII son conocidos por mostrar un comportamiento de redeposición significativo en su estado no truncado.

“Agente activo de superficie o surfactante” se refiere a surfactantes aniónicos, no iónicos y amfóliticos conocidos por su uso en composiciones detergentes.

“Medio de lavado” se refiere a una solución acuosa de lavado preparada mediante la adición al agua de la cantidad necesaria de una composición detergente. El medio de lavado generalmente contiene una cantidad de detergente efectiva para la limpieza.

“Enzimas celulolíticas” o “Enzimas celulasa” se refieren a exoglucanasas fúngicas o exo-celobiohidrolasas, endoglucanasas, y  $\beta$ -glucosidasas. Estos tres tipos diferentes de enzimas celulasa actúan sinérgicamente para convertir celulosa y sus derivados en glucosa. El análisis de los genes que codifican CBHI, CBHII, EGI, EGII y EGV en *Trichoderma longibrachiatum* muestran una estructura del dominio que comprende una región o dominio de centro catalítico (CCD), una región bisagra o conector (utilizado de manera equivalente en el presente documento) y una región o dominio de unión de celulosa (CBD).

## ES 2 281 078 T3

En el presente documento, a una composición de celulasa producida por una fuente natural y que comprende uno o más tipos de celobiohidrolasa y endoglucanasas donde cada uno de estos componentes se encuentra en la proporción producida por la fuente, se le denomina ocasionalmente como “Sistema completo de celulasa” o como “composición completa de celulasa” para distinguirla de las clasificaciones y los componentes de la celulasa aislados a partir de ella, de las composiciones incompletas de celulasa producidas por bacterias y algunos hongos, de una composición de celulasa que se obtiene a partir de un microorganismo genéticamente modificado de tal manera que se potencie la producción, que se disminuya la producción, o que no produzca uno o más de los tipos de celobiohidrolasa y/o tipos de endoglucanasa que son componentes de la celulasa, o de una composición enzimática de celulasa truncada, como se define en el presente documento.

La presente invención contempla específicamente la aplicabilidad de las celulasas que contienen regiones de dominios de centro y de unión como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, las celulasas bacterianas de *Thermomonospora sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Streptomyces sp.* son conocidas por tener región de dominio de unión y región del centro.

Para el uso en la presente invención se prefieren las celulasas fúngicas. Más preferiblemente, las celulasas fúngicas derivan de *Trichoderma sp.*, incluyendo *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Penicillium sp.*, *Humicola sp.*, incluyendo *Humicola insolens*, *Aspergillus sp.*, y *Fumarium sp.* Tal como se utiliza en el presente documento, el término “*Trichoderma*” o “*Trichoderma sp.*” se refiere a cualquier cepa que haya sido clasificada previamente como *Trichoderma* o que esté clasificada como *Trichoderma*. Más preferiblemente, la celulasa deriva de *Trichoderma longibrachiatum* o *Trichoderma viride*.

“Celulasa fúngica” se refiere a una composición enzimática que proviene de fuentes fúngicas o de microorganismos genéticamente modificados para incorporar o expresar todo o parte de los genes celulasa obtenidos de una fuente fúngica. Los hongos capaces de producir celulasas útiles en la preparación de las composiciones de celulasa descritas en el presente documento se describen en la patente GB 2094826A.

Generalmente, la mayoría de las celulasas fúngicas presentan su actividad óptima a pH ácido o neutro, aunque se conocen algunas celulasas fúngicas que poseen una actividad significativa en condiciones neutras o ligeramente alcalinas, es decir, por ejemplo, la celulasa derivada a partir de *Humicola Insolens* es conocida por ser activa en condiciones de neutras a ligeramente alcalinas.

Se conoce que las celulasas fúngicas están comprendidas en varias clasificaciones enzimáticas con diferente especificidad respecto al sustrato, diferentes patrones de acción enzimática, y similares. Adicionalmente, los componentes enzimáticos de cada clasificación pueden mostrar diferentes pesos moleculares, diferentes grados de glicosilación, diferentes puntos isoeléctricos, diferente especificidad respecto al sustrato, etc. Por ejemplo, las celulasas fúngicas pueden contener clasificaciones de celulasa que incluyan componentes tipo endoglucanasa (en adelante “Tipo EG”), componentes tipo exo-celobiohidrolasa (en adelante “Tipo CBH”), componentes tipo  $\beta$ -glucosidasa (en adelante “Tipo BG”), etc. Por otro lado, mientras que en la literatura se afirma que las celulasas bacterianas contienen poco o ningún componente del tipo CBH, hay unos pocos casos en los que se ha descrito que los componentes del tipo CBH derivados de las celulasas bacterianas poseen actividad exo-celobiohidrolasa.

En la técnica se conocen los procedimientos de fermentación para el cultivo de hongos y para la producción de celulasa. Por ejemplo, los sistemas de celulasa se pueden producir tanto mediante cultivo sólido como por cultivo sumergido, incluyendo procedimientos discontinuos, alimentados (“*fed-batch*”), y continuos. La recolección y la purificación de los sistemas de celulasa a partir del caldo de cultivo también pueden llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos en la técnica.

“Componentes del tipo endoglucanasa” o “tipo EG” se refiere a componentes de la celulasa fúngica o una combinación de componentes que muestran propiedades activas en el textil parecidas a los componentes endoglucanasa de *Trichoderma longibrachiatum* (anteriormente clasificada como *Trichoderma reesei*). A este respecto, los componentes endoglucanasa de *Trichoderma longibrachiatum* (por ejemplo, EGI, EGII, EGIII, y EGV, tanto solos como en combinación) son conocidos por proporcionar un tacto y apariencia mejorados, más suavidad, mejora en el color, y/o una apariencia de lavado a la piedra a las telas tejanas (en comparación con las características de la tela previas al tratamiento) cuando se añaden estos componentes al medio de tratamiento textil y la tela se trata con dicho medio.

De acuerdo con lo anterior, los componentes del tipo endoglucanasa son aquellos componentes celulasa que proporcionan mejoras específicas a las telas que contienen celulosa, tales como un tacto y apariencia mejoradas, más suavidad, mejora en el color, y/o una apariencia de lavado a la piedra (en comparación con la tela antes del tratamiento) cuando estos componentes se añaden a un medio utilizado para tratar las telas. Ciertos componentes del tipo EG, incluyendo EGI, EGII y EGIII, pueden proporcionar una menor pérdida de resistencia a las telas tejanas en comparación con la pérdida de resistencia propia del tratamiento con composiciones similares de celulasa que adicionalmente contienen componentes del tipo CBH I.

Tal como se definen en el presente documento, los componentes del tipo endoglucanasa pueden no incluir a los componentes clasificados tradicionalmente como endoglucanasas utilizando pruebas de actividad tales como la capacidad del componente (a) para hidrolizar derivados solubles de celulosa tales como la carboximetilcelulosa (CMC), por tanto reduciendo la viscosidad de las soluciones que contienen CMC, (b) para hidrolizar fácilmente formas hidra-

tadas de celulosa tales como celulosa hinchada con ácido fosfórico (por ejemplo, celulosa Walseth) e hidrolizar menos fácilmente las formas de celulosa más cristalinas (por ejemplo, Avicel, Solkafloc, etc.). Por otro lado, se cree que no todos los componentes endoglucanasa, tal como se definen mediante dichas pruebas de actividad, proporcionarán una o más de las mejoras a las telas que contienen celulosa, incluyendo la reducción de la pérdida de resistencia. Consecuentemente, para los objetivos del presente documento, es apropiado definir los componentes del tipo endoglucanasa como aquellos componentes de celulosa fúngica que poseen propiedades de modificación de textiles similares a los componentes endoglucanasa de *Trichoderma longibrachiatum*.

Generalmente, los diferentes componentes tienen diferentes propiedades, tales como el punto isoeléctrico, el peso molecular, el grado de glicosilación, la especificidad de sustrato y los patrones de acción enzimática. Los diferentes puntos isoeléctricos de los componentes permiten su separación mediante técnicas tales como la cromatografía de intercambio iónico. De hecho, en la técnica se conoce el aislamiento de componentes de diferentes fuentes. Ver, por ejemplo, Bjork *et al.*, patente US 5120463; Schulein *et al.*, solicitud internacional WO 89/09259; Wood *et al.*, *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, pp. 31-52 (1988); Wood *et al.*, *Carbohydrate Research*, Vol. 190, pp. 279-297 (1989); Schulein, *Methods in Enzymology*, Vol. 160, pp. 234-242 (1988); y similares.

El término “EGI” se refiere a un componente del tipo endoglucanasa normalmente derivado de, o que incorpora las características identificativas de aquellos que derivan de EGI de *Trichoderma sp.* Así, EGI se refiere a una endoglucanasa derivada de *Trichoderma sp.* caracterizada por un pH óptimo de aproximadamente 4,0 a 6,0, un punto isoeléctrico (pI) a partir de aproximadamente 4,5 a 4,7, y un peso molecular de aproximadamente 47 a 49 Kdaltons. Preferiblemente, EGI deriva de *Trichoderma longibrachiatum* o de *Trichoderma viride*. El EGI que deriva de *Trichoderma longibrachiatum* tiene un pH óptimo de aproximadamente 5,0, un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 4,7 y un peso molecular de aproximadamente 47 a 49 Kdaltons. La celulosa EGI derivada de *Trichoderma viride* tiene un pH óptimo de aproximadamente 5,0, un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 5,3 y un peso molecular de aproximadamente 50 Kdaltons.

El término “EGII”, tal como se define en el presente documento, se refiere a un componente del tipo endoglucanasa normalmente derivado de, o que incorpora las características identificativas de aquellos que derivan de EGII de *Trichoderma sp.* A modo de aclaración, se indica que algunos autores habían utilizado la nomenclatura “EGIII” para referirse a EGII, aunque la nomenclatura actual utiliza el término EGII. En cualquier caso, la proteína EGII definida en el presente documento es sustancialmente diferente a la proteína EGIII en su peso molecular y en sus pI y pH óptimos. El término “celulosa EGII” se refiere a un componente endoglucanasa derivado de *Trichoderma spp.* caracterizado por un pH óptimo de aproximadamente 4,0 a 6,0, un punto isoeléctrico (pI) a partir de aproximadamente 5,5, y un peso molecular de aproximadamente 48 Kdaltons. Preferiblemente, la celulosa EGII deriva de *Trichoderma longibrachiatum* o de *Trichoderma viride*.

El término “celulosa EGIII”, tal como se define en el presente documento, se refiere a un componente del tipo endoglucanasa normalmente derivado de, o que incorpora las características identificativas de aquellos que derivan de EGIII de *Trichoderma sp.* Así, EGIII se refiere a una endoglucanasa derivada de *Trichoderma spp.* caracterizada por un pH óptimo de aproximadamente 5,0 a 7,0, un punto isoeléctrico (pI) a partir de aproximadamente 7,2 a 8,0, y un peso molecular de aproximadamente 23 a 28 Kdaltons. Preferiblemente, la celulosa EGIII deriva de *Trichoderma longibrachiatum* o de *Trichoderma viride*. Así, la celulosa EGIII derivada de *Trichoderma sp.* tiene un pH óptimo de aproximadamente 5,5 a 6,0, un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 7,4, y un peso molecular de aproximadamente 25 a 28 Kdaltons. La celulosa EGIII derivada de *Trichoderma viride* tiene un pH óptimo de aproximadamente 5,5, un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 7,7, y un peso molecular de aproximadamente 23,5 Kdaltons.

El término “celulosa EGV”, tal como se define en el presente documento, se refiere a un componente del tipo endoglucanasa, normalmente derivado de, o que incorpora las características identificativas de aquellos que derivan de la EGV de *Trichoderma sp.* Así, EGV se refiere al componente endoglucanasa derivado de *Trichoderma spp.* caracterizado por Saloheimo *et al.*, *Molecular Microbiology* 13(2):219-228 (1994); y *Proceedings of the Second TRICEL Symposium on Trichoderma reesei Cellulases and other Hydrolases*, Espoo Finland 1993, ed. P. Suominen & J.T. Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8, pp. 139-146 (1993).

“Componentes del tipo exocelobiohidrolasa” o “tipo CBH” son componentes de celulosa fúngica que muestran propiedades textiles activas parecidas a las de los componentes celulosa CBH I y/o CBH II de *Trichoderma longibrachiatum*. A este respecto, cuando los componentes CBH I y CBH II de *Trichoderma longibrachiatum* se utilizan en ausencia de componentes celulosa de tipo EG (como se define arriba), no proporcionan ninguna mejora en el tacto, apariencia, suavidad, mejora del color y/o apariencia de lavado a la piedra de las telas tejadas. Adicionalmente, cuando se usan en combinación con algunos componentes del tipo EG, en una proporción de aproximadamente 2,5:1 de CBH I respecto a los componentes EG, el componente CBH I de *Trichoderma longibrachiatum* proporciona una pérdida de resistencia mejorada a las telas tejadas.

En consecuencia, los componentes de tipo CBH I y los componentes de tipo CBH II se refieren a componentes de celulosa fúngica que muestran propiedades de actividad textil similares a las de los componentes CBH I y CBH II de *Trichoderma longibrachiatum*, respectivamente. Como se muestra arriba, para los componentes del tipo CBH I, esto incluye la propiedad de incrementar la pérdida de resistencia en telas tejadas tratadas con CBH I en presencia de componentes del tipo EG.

## ES 2 281 078 T3

Los componentes del tipo Exo-celobiohidrolasa que se definen en el presente documento pueden no incluir componentes tradicionalmente clasificados como exo-celobiohidrolasas utilizando pruebas de actividad como las utilizadas para caracterizar CBH I y CBH II de *Trichoderma longibrachiatum*. Por ejemplo, los componentes del tipo exo-celobiohidrolasa (a) se inhiben competitivamente por la celobiosa (Ki aproximadamente 1 mM); (b) son incapaces de hidrolizar celulosas sustituidas a cualquier nivel significativo, tal como carboximetilcelulosa, y (c) hidroliza celulosa hinchada con ácido fosfórico y en menor medida celulosa altamente cristalina. Por otro lado, se cree que algunos componentes de la celulasa que se han caracterizado como componentes del tipo CBH mediante estos ensayos de actividad, cuando se utilizan solos en la composición de celulasa proporcionarán un tacto, apariencia, suavidad, color, y/o una apariencia de lavado a la piedra mejorados a las telas que contienen celulosa. En consecuencia, para finalidad de la presente invención, se cree más apropiado definir tales celobiohidrolasas como componentes del tipo EG ya que estos componentes poseen propiedades funcionales en usos textiles similares a aquellas que poseen los componentes endoglucanasa de *Trichoderma longibrachiatum*.

En general, las composiciones de celulasa que comprenden la variedad de componentes de una composición completa de celulasa (“celulasa completa”) pueden obtenerse mediante técnicas de purificación basadas en sus características y propiedades conocidas. Específicamente, los componentes sustancialmente puros pueden purificarse a partir de la celulasa completa mediante técnicas de separación reconocidas presentes en el estado de la técnica, incluyendo cromatografía de intercambio iónico a un pH apropiado, cromatografía de afinidad, de exclusión por tamaños y similares. Por ejemplo, en la cromatografía de intercambio iónico (normalmente cromatografía de intercambio aniónico), es posible separar los componentes de la celulasa mediante la elución con gradiente de pH, o con un gradiente de sal, o con ambos gradientes de pH y sal. Después de la purificación, la cantidad que se precisa de los componentes deseados puede recombinarse.

El término “celulasa truncada”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína que comprende un centro catalítico truncado de celulasa o un dominio de unión truncado para celulosa de exo-celobiohidrolasa o de endoglucanasa, por ejemplo, del tipo EGI, EGII, EGV, CBHI, CBHII, o sus derivados. Tal como se indica arriba, se cree que muchos enzimas celulasa son bifuncionales ya que contienen dominios que están dirigidos a la actividad catalítica o a la hidrolítica respecto al sustrato de celulosa, y también a la actividad no catalítica de unión a celulosa. Así, una celulasa truncada es una celulasa que, en su forma intacta, contiene un centro y un dominio de unión pero que se trata de manera que carezca de uno u otro de los dominios.

Se cree que el centro catalítico y el dominio de unión para celulosa de un enzima celulasa actúan juntos de forma sinérgica para provocar la hidrólisis efectiva y a menudo perjudicial de las fibras de celulosa en una tela que contiene celulosa. Además, se cree que la actividad catalítica de la celulasa y la actividad de unión con celulosa son específicas de dominios estructurales distintos. Por ejemplo, tal como se indica arriba, es sabido que muchos de los enzimas celulasa, incluyendo celulasas de, por ejemplo, *T. longibrachiatum* y *Humicola insolens*, incorporan una subunidad de dominio del centro catalítico que está unida a través de una región de un conector a una subunidad de dominio de unión de celulosa.

Un “derivado truncado de celulasa” incluye un centro de celulasa truncada o un dominio de unión truncado de celulosa, tal como se define en el presente documento, donde puede haber una adición o delección de uno o más aminoácidos en uno o en ambos de los extremos C y N-terminales de la celulasa truncada, o una sustitución, inserto o delección de uno o más aminoácidos en uno o más sitios a lo largo de la celulasa truncada. Los derivados incluyen mutantes que preservan su carácter de centro truncado de celulasa o de dominio de unión truncado de celulosa, tal como se define a continuación. El término “derivado de una celulasa truncada” incluye dominios de centros o de unión de los enzimas exoglucanasa o endoglucanasa que tienen unidos uno o más aminoácidos de la región del conector.

Un derivado truncado de celulasa también se refiere a una proteína sustancialmente similar en su estructura y en su actividad biológica a un centro de celulasa truncada o una proteína de dominio truncado de unión de celulosa, pero que ha sido genéticamente modificado para contener una secuencia de aminoácidos modificada. Así, dado que las dos proteínas tienen una actividad sustancialmente similar, se consideran “derivados” incluso si la estructura primaria de una de las proteínas no tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la que se encuentra en la otra.

Se contempla que un derivado truncado de celulasa puede derivar de un fragmento de ADN que codifica un centro catalítico truncado o un dominio truncado de unión de celulosa que además contiene una adición de uno o más nucleótidos, internamente o en el extremo 5' o 3' del fragmento de ADN, la delección de uno o más nucleótidos, internamente o en el extremo 5' o 3' del fragmento de ADN o la sustitución de uno o más nucleótidos, internamente o en el extremo 5' o 3' del fragmento de ADN donde que mantiene la actividad funcional del dominio truncado de unión de celulosa o del dominio del centro catalítico (derivado de celulasa truncada). Un fragmento de ADN que codifica un centro catalítico de celulasa o un dominio de unión de celulosa además puede incluir una secuencia de ADN conector o bisagra o uno de sus fragmentos unido al extremo 5' o 3' de la secuencia de ADN del centro catalítico o del dominio de unión, manteniendo la actividad funcional del dominio truncado de unión de celulosa o del dominio del centro celulasa (derivado de celulasa truncada) codificados.

El término “centro celulasa truncado” o “región celulasa truncado” en el presente documento se refiere a un péptido que comprende el dominio de centro catalítico de exo-celobiohidrolasa o endoglucanasa, por ejemplo, del tipo EGI, del tipo EGII, del tipo EGV, del tipo CBHI, del tipo CBHII, o uno de sus derivados que es capaz de escindir enzimáticamente polímeros de celulosa, incluyendo, pero estar limitado a, la pulpa o a la celulosa hinchada con ácido

fosfórico. Sin embargo, un centro truncado de celulasa no presentará una actividad de unión de celulosa atribuible a un dominio de unión de celulosa. Un centro truncado de celulasa se distingue de una celulasa no truncada que presenta, en su forma intacta, una baja actividad de unión con celulosa. Un centro truncado de celulasa puede incluir otros elementos que no presenten actividad de unión con celulosa atribuible a un dominio de unión de celulosa. Por ejemplo, específicamente se contempla la presencia de un conector o bisagra. De manera similar, también se contempla específicamente la unión covalente de otra entidad enzimática al centro truncado de celulasa.

La capacidad (o actividad) de una proteína que contiene un centro catalítico truncado o sus derivados puede determinarse mediante los procedimientos conocidos en la técnica. (Ver, Wood, T.M. *et al* en *Methods in Enzymology*, Vol. 160, Editores: Wood, W.A. and Kellogg, S.T., Academic Press, pp. 87-116, 1988). Por ejemplo, tales actividades pueden determinarse mediante la hidrólisis de celulosa hinchada con ácido fosfórico y/o oligosacáridos solubles seguidos de la cuantificación de los azúcares reductores liberados. En este caso, los productos de tipo azúcar soluble, liberados por la acción de los dominios de los centros celulasa CBH o EG o sus derivados, pueden detectarse mediante el análisis HPLC o mediante la utilización de ensayos colorimétricos para la medición de azúcares reductores. Se espera que estos dominios catalíticos o sus derivados mantengan al menos un 10% de la actividad mostrada por el enzima intacto cuando se ensaya cada uno de ellos bajo condiciones similares y se dosifican en base a cantidades similares de proteína de dominio catalítico.

El término “dominio truncado de unión de celulosa” en el presente documento se refiere a un péptido o un grupo de péptidos relacionados que presentan actividad de unión con celulosa de una exo-celobiohidrolasa o una endoglucanasa, por ejemplo, del tipo EGI, del tipo EGII, del tipo EGV, del tipo CBHI, o del tipo CBHII, o sus derivados que se enlazan no covalentemente a un polisacárido, por ejemplo la celulosa. Se cree que los dominios de unión celulosa unen el enzima a la celulosa y funcionan independientemente del centro catalítico del enzima celulasa. Un dominio truncado de unión a celulosa no presentará la actividad hidrolítica significativa atribuible a un centro catalítico. Un dominio de unión truncado de celulosa se distingue de una celulasa no truncada en que, en su forma intacta, no tiene un centro catalítico celulasa. Un dominio truncado de unión de celulosa puede incluir otros elementos que no incluyan actividad de escisión de celulosa atribuible a un centro catalítico celulasa. Por ejemplo, se contempla específicamente la presencia de un conector o una bisagra. De manera similar, también se contempla específicamente la unión covalente de otro elemento enzimático al dominio de unión truncado de celulosa.

La capacidad (o actividad) de un dominio truncado de unión de celulosa o sus derivados como se describen en la presente invención pueden determinarse mediante ensayos de unión de celulosa utilizando sustratos de celulosa como por ejemplo avicel, pulpa o algodón. Se espera que estos nuevos dominios truncados de unión de celulosa o sus derivados mantengan al menos un 10% de la afinidad de enlace en comparación con la mostrada por el enzima no truncado cuando se ensaya cada uno de ellos en condiciones similares y se dosifican en base a cantidades similares de proteína de dominio de unión. La cantidad de dominio de unión no enlazado puede cuantificarse mediante análisis directo de proteínas, mediante procedimientos cromatográficos, o posiblemente mediante procedimientos inmunológicos.

También pueden ser apropiados para la presente invención otros procedimientos conocidos en la técnica que miden la actividad catalítica y/o de unión de la celulasa mediante las propiedades físicas o químicas de sustancias concretas tratadas. Por ejemplo, en los procedimientos que miden las propiedades físicas de un sustrato tratado, se analiza el sustrato por la modificación de la forma, textura, superficie, o propiedades estructurales, por la modificación de la capacidad de mojado, por ejemplo por la capacidad del sustrato de absorber agua, o por la modificación de la hinchado. Otros parámetros que pueden determinar la actividad incluyen la medida del cambio de las propiedades químicas de sustratos sólidos tratados. Por ejemplo, las propiedades de difusión de tintes o productos químicos pueden examinarse después del tratamiento de un sustrato sólido con la proteína truncada de unión de celulasa o con sus derivados descritos en la presente invención. Los sustratos apropiados para la evaluación de la actividad incluyen Avicel, rayón, fibras de pulpa, algodón o fibras de ramie, papel, kraft o pulpa de madera molida. (ver también, Wood, T.M. *et al* en “*Methods in Enzymology*”, Vol. 160, Editores: Wood, W.A. and Kellogg, S.T., Academic Press, pp. 87-116, (1988)).

Además del centro truncado de celulasa, las celulasas naturales que carecen del dominio de unión poseen las ventajas de los centros catalíticos truncados descritos en el presente documento. Por ejemplo, se cree que la celulasa bacteriana que deriva de *Erwinia carotovora* no tiene dominio de unión, (Ver, por ejemplo, Saarihahti, *et al.* *Gene*, Vol. 90, pp. 9-14 (1990)). De manera similar, se cree que la celulasa bacteriana que deriva de *Clostridium thermocellum* tampoco tiene dominio de unión, (Ver, por ejemplo, Gilkes, *et al.*, *Microbiological Reviews*, pp. 303-315 (1991)). Así, la utilización de las celulasas de origen natural sin dominios de unión a niveles equivalentes de abrasión respecto a las celulasas conocidas proporcionará un reteñido reducido.

“Componentes B-Glucosidasa (BG)” se refiere a componentes de una composición completa de celulasa que muestran actividad BG; tanto es así que tales componentes actuarán en el extremo no reductor de la celobiosa y otros celooligosacáridos solubles (“celobiosa”) y dan glucosa como único producto. Los componentes BG no se absorben ni reaccionan con polímeros de celulosa. Además, tales componentes BG se inhiben competitivamente por la glucosa (Ki aproximadamente 1 mM). Mientras que en un sentido estricto, los componentes BG exactamente no son celulasas debido a que no degradan celulosa, tales componentes BG se incluyen en la definición del sistema celulasa ya que estos enzimas facilitan la degradación general de la celulosa mediante la degradación adicional de los productos inhibidores de la degradación de la celulosa (particularmente celobiosa) producidos por la acción combinada de los componentes de tipo CBH y de tipo EG.

## ES 2 281 078 T3

Los procedimientos para incrementar o reducir la cantidad de los componentes BG en las composiciones de celulasa se describen en WO92/10581, la cual se incorpora en su totalidad por referencia al presente documento.

5 “Región de conector o bisagra” se refiere a una región peptídica corta que une distintos centros catalíticos y dominios de unión de celulosa estructuralmente diferentes de una celulasa. Por ejemplo, en las celulasas de *T. longibrachiatum* estos dominios se enlazan mediante un péptido rico en Ser, Thr y Pro.

10 “Secuencia de señalización” se refiere a una secuencia de aminoácidos unida al fragmento N-terminal de una proteína que facilita la secreción de la forma madura de la proteína fuera de la célula. Esta definición de una secuencia de señalización es una definición funcional. La forma madura de la proteína extracelular carece de la secuencia de señalización que se escinde durante el proceso de secreción.

15 “Célula hospedadora” se refiere a una célula que actúa como hospedador para un vector recombinante de ADN según la presente invención.

“Constructo de ADN o vector” (utilizado indistintamente en el presente documento) se refiere a una secuencia de nucleótido que comprende uno o más fragmentos de ADN o fragmentos variantes de ADN que codifican cualquiera de las nuevas celulasas truncadas o sus derivados descritos arriba.

20 “Funcionalmente unido a” significa que una región reguladora, como es un promotor, un terminador, una señal de secreción o una región de potenciador está unida a un gen estructural y controla la expresión de dicho gen.

25 “Tampón” se refiere a los reactivos ácido/base conocidos en la técnica por estabilizar las soluciones de celulasa contra cambios de pH no deseados durante el tratamiento con celulasa de la tela que contiene celulosa. En relación a esto, en la técnica se conoce que la actividad de la celulasa es dependiente del pH. Por ejemplo, una composición de celulasa específica que muestra actividad celulolítica en un intervalo definido de pH, con una actividad celulolítica óptima que se encuentra generalmente en una pequeña porción de este intervalo definido. El intervalo de pH específico para la actividad celulolítica variará para cada composición de celulasa. Como se indica arriba, mientras la mayoría de las celulasas mostrarán actividad celulolítica en un pH entre ácido y neutro, hay algunas composiciones de celulasa que muestran actividad celulolítica en un medio de pH alcalino.

30 Durante el tratamiento con celulasa de la tela que contiene celulosa, es posible que el pH de la solución inicial de celulasa pueda estar fuera del intervalo necesario para la actividad celulasa. Además es posible que el pH cambie durante el tratamiento de la tela que contiene celulosa, por ejemplo, mediante la generación de un producto de reacción que altera el pH de la solución. En ambas situaciones, el pH una solución de celulasa sin tamponar puede estar fuera del intervalo necesario para la actividad celulolítica. Cuando esto ocurre, también se da una reducción o un cese de la actividad celulolítica en la solución de celulasa.

35 En vista de lo anterior, el pH de la solución de celulasa debería mantenerse dentro del intervalo necesario para la actividad celulolítica. Uno de los medios de cumplir esto es simplemente mediante la monitorización del pH del sistema y el ajuste del pH cuando sea necesario añadiendo un ácido o una base. Sin embargo, en una realización preferida, el pH del sistema preferiblemente se mantiene en el intervalo de pH deseado mediante la utilización de un tampón en la solución celulasa. En general, se emplea una cantidad suficiente de tampón para mantener el pH de la solución en el intervalo donde la celulasa utilizada muestra actividad. En la medida en que las diferentes composiciones de celulasa tienen diferentes intervalos de pH en los que muestran actividad celulasa, el tampón específico que se utiliza se selecciona en relación con la composición de celulasa específica que se utiliza. El tampón o los tampones seleccionados para su utilización con la composición celulasa empleada pueden determinarse fácilmente por el experto en la materia teniendo en cuenta el intervalo de pH y el pH óptimo para la composición de celulasa empleada así como el pH de la solución de celulasa. Preferiblemente, el tampón utilizado es uno que sea compatible con la composición de celulasa y que mantendrá el pH de la solución de celulasa entre el intervalo de pH necesario para una actividad óptima. Los tampones apropiados incluyen citrato sódico, acetato de amonio, acetato de sodio, fosfato de disodio, y cualquier otro tampón conocido en la técnica.

### 55 II. Preparación de enzimas celulasa truncados

La presente invención se refiere a la utilización de celulasas truncadas y derivados de celulasas truncadas. Estos enzimas están preparados preferiblemente mediante procedimientos recombinantes. Adicionalmente, las proteínas celulasa truncadas para la utilización en la presente invención pueden obtenerse por otros medios conocidos en la técnica como por ejemplo la escisión química o la proteólisis de la proteína celulasa completa.

60 Un procedimiento preferido para la preparación de celulasa truncada de acuerdo con la presente invención comprende obtener una célula hospedadora *Trichoderma sp.* modificada en la que se han perdido una o varias de las actividades celulasa. La célula modificada *Trichoderma sp.* se transforma con un constructo de ADN que comprende al menos un fragmento de ADN que codifica una porción o toda la región del centro o de unión de una exo-celobiohidrolasa o una endoglucanasa, por ejemplo, EGI, EGII, EGV, CBHI o CBHII unidas funcionalmente a un promotor. A continuación, la célula hospedadora transformada se cultiva en condiciones apropiadas para la expresión de la proteína deseada. A continuación, el producto proteico deseado se purifica hasta una homogeneidad sustancial.

Preferiblemente, el microorganismo que se transforma comprende una cepa derivada de *Trichoderma sp.* Más preferiblemente, la cepa comprende una cepa de *T. longibrachiatum* que sobreproduce celulasa. Por ejemplo, se conoce que RL-P37, descrita por Sheir-Neiss *et al.* en Appl. Microbiol. Biotechnology, 20 (1984) pp. 46-53, secreta cantidades elevadas de enzimas celulasa. Los equivalentes funcionales de RL-P37 incluyen la cepa RUT-C30 de *Trichoderma longibrachiatum* (depositada bajo el número de depósito ATCC No. 56765) y los números de depósito ATCC 58351, 58352, y 58353.

Aún más preferiblemente, a las cepas de *Trichoderma* de células hospedadoras se les ha delecionado uno o más genes celulasa antes de la introducción de un constructo de ADN o un plásmido que contiene el fragmento de ADN que codifica la proteína truncada de celulasa. Tales cepas pueden prepararse mediante el procedimiento descrito en la patente US 5246853 y WO 92/06209. Los procedimientos de identificación y de la subsiguiente purificación se simplifican mediante la expresión de una celulasa truncada en un microorganismo hospedador que ha perdido uno o más de los genes celulasa. Cualquiera de los genes de *Trichoderma sp.* clonados pueden ser delecionados, por ejemplo, los genes cbh1, cbh2, egl1 y egl3.

La deleción de los genes puede realizarse mediante la inserción de una forma del gen que se desea deleccionar o destruir en un plásmido, mediante procedimientos conocidos en la técnica. Un plásmido de deleción apropiado en general tendrá un único sitio de restricción enzimático para permitir que pueda eliminarse el fragmento de ADN homólogo de *Trichoderma sp.* en forma de un único fragmento lineal. A continuación se corta el plásmido de deleción en un(os) sitio(s) de restricción enzimática apropiados, internamente a la región de codificación, y se reemplaza la secuencia de codificación del gen o una de sus partes con un marcador selectivo. Las secuencias de ADN adyacentes al locus del gen a deleccionar o destruir, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0 kb, permanecen a cada lado del gen marcador selectivo.

Un marcador selectivo puede escogerse de manera que se permita la detección del hongo transformado. Será apropiado cualquier gen marcador que se exprese en el microorganismo seleccionado. Por ejemplo, con *Trichoderma sp.*, el marcador selectivo se escoge de manera que la presencia del marcador selectivo en los transformantes no afecte significativamente a sus propiedades. Tal marcador selectivo puede ser un gen que codifica un producto que pueda ensayarse. Por ejemplo, puede utilizarse una copia funcional de un gen de *Trichoderma sp.* si el hecho de carecer de él lleva a la cepa hospedadora a mostrar un fenotipo auxotrófico.

En una realización preferida, se transforma una cepa pyr4<sup>+</sup> derivada de *Trichoderma sp.* de manera que uno o más genes celulasa se reemplazan por genes pyr4, proporcionando así un marcador selectivo. Puede obtenerse una cepa derivada de pyr4<sup>+</sup> sometiéndolo a cepas de *Trichoderma sp.* a ácido fluoroorótico (FOA). El gen pyr4 codifica la oritidina-5'-monofosfato decarboxilasa, un enzima necesario para la biosíntesis de la uridina. Las cepas con el gen pyr4 intacto crecen en un medio sin uridina pero son sensibles al ácido fluoroorótico. Es posible seleccionar cepas derivadas de pyr4<sup>+</sup> que carezcan del enzima funcional de la oritidina-5'-monofosfato decarboxilasa y que requieran uridina para el crecimiento mediante la selección de la resistencia al FOA. Utilizando la técnica de selección FOA también es posible obtener cepas que precisen uridina y que carezcan de la orotato pirofosforibosil transferasa funcional. Es posible transformar estas células con una copia funcional del gen que codifica este enzima (Berges y Barreau, 1991, Curr. Genet. 19 pp.359-365). La selección de las cepas derivadas se lleva a cabo con facilidad mediante la utilización de la técnica de la resistencia a FOA comentada arriba, y así, se prefiere la utilización del gen pyr4 como marcador selectivo.

Para transformar el pyr4 de *Trichoderma sp.* de manera que carezca de la capacidad de expresar uno o más genes celulasa, a continuación se aísla del plásmido de deleción un solo fragmento de ADN que comprende un gen celulasa delecionado o destruido y se usa para transformar un hospedador pyr<sup>-</sup> *Trichoderma* apropiado. A continuación, se identifican y se seleccionan los transformantes en base a su capacidad de expresar el producto del gen pyr4 y así cumplir con la auxotrofia de uridina de la cepa hospedadora. A continuación se llevan a cabo análisis de transferencia Southern sobre los transformantes resultantes para identificar y confirmar una situación de doble cruce sobre el acontecimiento de integración que sustituye con los marcadores selectivos pyr4 a una parte o a toda la región de codificación del gen a deleccionar.

Aunque los vectores plásmidos específicos descritos arriba están relacionados con la preparación de transformantes pyr<sup>-</sup>, la presente invención no está limitada a estos vectores. Varios genes se pueden deleccionar y sustituirse en la cepa *Trichoderma sp.* utilizando las técnicas de arriba. Adicionalmente, puede utilizarse cualquier marcador selectivo disponible, tal como se describe arriba. De hecho, cualquiera de los genes de *Trichoderma sp.* que ha sido clonado e identificado puede deleccionarse del genoma utilizando la estrategia descrita arriba.

Como se indica arriba, las cepas hospedadoras utilizadas son derivados de *Trichoderma sp.* que carecen del gen o genes o tienen un gen o genes no funcionales correspondientes al marcador selectivo escogido. Por ejemplo, si se elige el marcador selectivo de pyr4, en el procedimiento de transformación se utiliza un derivado de la cepa específica de pyr como recipiente. De manera similar, pueden utilizarse los marcadores selectivos que comprenden los genes *Trichoderma sp.* equivalentes a los genes argB<sup>+</sup>, trpC<sup>+</sup>, niaD<sup>+</sup> de *Aspergillus nidulans*. En tal caso la correspondiente cepa recipiente debe ser un derivado de la cepa como por ejemplo argB<sup>+</sup>, trpC<sup>+</sup>, niaD<sup>+</sup>, respectivamente.

A continuación se prepara el ADN que codifica la proteína celulasa truncada para la inserción en el organismo apropiado. Según la presente invención, el ADN que codifica un enzima celulasa truncado comprende ADN que codifica una proteína que corresponde a la región del centro catalítico del enzima celulasa. Por lo tanto, el ADN puede

5 derivar de cualquier fuente microbiana que sea conocida por producir celulasa, en la que el gen sea identificado y aislado. En una realización preferida, el ADN codifica una proteína celulasa truncada derivada de *Trichoderma sp.*, y más preferiblemente de *Trichoderma longibrachiatum*. Así, el ADN puede codificar una proteína del centro EGI, EGII, CBHI o CBHII. Preferiblemente, el fragmento de ADN del gen o la variante del fragmento de ADN codifica los dominios del centro o de unión de una celulasa *Trichoderma sp.* o sus derivados que adicionalmente mantiene la actividad funcional del dominio truncado del centro o de unión, respectivamente. Además, el fragmento de ADN o su variante que comprende la secuencia de las regiones de los dominios del centro o de unión puede tener unido un conector, o una secuencia de ADN de una región bisagra o uno de sus fragmentos donde la celulasa truncada codificada aún conserva el centro celulasa y la actividad del dominio de unión, respectivamente.

10 El fragmento de ADN o la variante del fragmento de ADN que codifica la celulasa truncada o su derivado puede estar unida funcionalmente a una secuencia promotor fúngica, por ejemplo, el promotor del gen *cbhI* o *egl1*. También se contempla que en la cepa pueda recombinarse más de una copia de ADN que codifica una celulasa truncada.

15 El ADN que codifica la proteína celulasa truncada puede prepararse mediante la construcción de un vector de expresión que porta el ADN que codifica la celulasa truncada. El vector de expresión que porta insertado el fragmento de ADN que codifica la celulasa truncada puede ser cualquier vector con la capacidad de replicarse de manera autónoma en un organismo hospedador dado, generalmente un plásmido. En realizaciones preferidas de la invención, se contemplan dos tipos de vectores de expresión para obtener la expresión de los genes o sus truncamientos. Los primeros contienen secuencias de ADN en las que el promotor, la región de codificación del gen, y la secuencia de terminación provienen del gen a expresar. El truncamiento del gen se obtiene mediante la delección de las secuencias de ADN no deseadas (que codifican dominios no deseados) para dejar el dominio a expresar bajo el control de su propias secuencias reguladoras de transcripción y traducción. El vector también contiene un marcador selectivo que permite la selección de la integración en el hospedador de múltiples copias de las nuevas secuencias génicas.

20 Por ejemplo, el pEGIΔ3'pyr contiene el dominio del centro celulasa EGI bajo el control del promotor, terminador y secuencias de señalización de EGI. Se ha delecionado el extremo 3' de la región de codificación de EGI que contiene el dominio de unión de celulosa. El plásmido también contiene el gen *pyr4* para la selección.

30 El segundo tipo de vectores de expresión está preensamblado y contiene secuencias necesarias para la transcripción de alto nivel y un marcador selectivo. La invención contempla que la región de codificación para un gen o una de sus partes puede insertarse en este vector de expresión de uso general de manera que esté bajo el control transcripcional de las secuencias del promotor y del terminador de los casetes de expresión.

35 Por ejemplo, el PTEX es un vector de expresión de uso general. Los genes o una de sus partes pueden insertarse en el sentido 3' ("Downstream") del promotor fuerte CBHI. Los ejemplos que se describen en el presente documento se incluyen entre los que muestran que el dominio del centro catalítico celulasa y el dominio de unión se expresan mediante este sistema.

40 En el vector, la secuencia de ADN que codifica la celulasa truncada o otra de las nuevas proteínas de la presente invención puede estar unida operativamente a secuencias de transcripción o traducción, es decir, a una secuencia de promotor y señalización apropiada en marco de lectura con el gen estructural. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra actividad transcripcional en la célula hospedadora y que puede derivar de genes que codifican proteínas homologas o heterólogas en la célula hospedadora. El péptido de señalización permite la expresión extracelular de la celulasa truncada o sus derivados. Preferiblemente, la secuencia de señalización de ADN es la secuencia de señalización asociada naturalmente con el gen truncado a expresar, sin embargo la señal de señalización de cualquier exocelobiohidrolasa o endoglucanasa está incluida en la presente invención.

50 Los procedimientos utilizados para unir las secuencias de ADN que codifican las celulasas truncadas, sus derivados u otras nuevas celulasas de la presente invención con el promotor, y la inserción en los vectores apropiados que contienen la información necesaria para la replicación en la célula hospedadora son conocidos en la técnica.

55 El vector de ADN o constructo descrito arriba puede introducirse en la célula hospedadora de acuerdo con técnicas conocidas tales como la transformación, la transfección, la microinyección, la microporación, el bombardeo con partículas ("biolistic bombardment") y similares.

60 En la técnica de transformación preferida se debe tener en cuenta que la permeabilidad de la pared celular de *Trichoderma sp.* es muy baja. Por lo tanto, la captación de la secuencia de ADN deseada, del gen o del fragmento del gen en el mejor de los casos es mínima. Hay varios procedimientos para incrementar la permeabilidad de la pared celular de las cepas derivadas de *Trichoderma sp.* (es decir, que carecen de un gen que corresponde al marcador selectivo utilizado) previamente al proceso de transformación.

65 El procedimiento preferido en la presente invención para preparar *Trichoderma sp.* para la transformación implica la preparación de protoplastos a partir de micelio fúngico. El micelio puede obtenerse a partir de esporas vegetales germinadas. El micelio se trata con un enzima que digiere la pared celular obteniendo protoplastos. A continuación, los protoplastos se protegen mediante la presencia de un estabilizante osmótico en el medio de suspensión. Estos estabilizantes incluyen sorbitol, manitol, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y similares. Normalmente la concentración

de estos estabilizantes varia entre 0,8 M y 1,2 M. Preferiblemente se utiliza una solución 1,2 M de sorbitol en el medio de suspensión.

La captación del ADN en la cepa hospedadora de *Trichoderma sp.* es dependiente de la concentración del ión calcio. Generalmente, en la solución de captación se utilizan entre aproximadamente 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 50 mM de  $\text{CaCl}_2$ . A parte de la necesidad del ion calcio en la solución de captación, en el sistema tampón generalmente se incluyen otros elementos como son tampón TE (Tris 10 Mm, pH 7,4; EDTA 1 Mm) o MOPS 10 Mm, tampón pH 6,0 (ácido morfolinopropanosulfónico) y polietilenglicol (PEG). Se cree que el polietilenglicol actúa fusionando las membranas celulares permitiendo así que el contenido del medio se libere en el citoplasma de la cepa de *Trichoderma sp.* y el plásmido de ADN se transfiera al núcleo. Frecuentemente, esta fusión deja múltiples copias del ADN plásmido integradas conjuntamente en el cromosoma hospedador.

Generalmente, en la transformación se utiliza una suspensión que contiene los protoplastos de *Trichoderma sp.* o las células que se ha sometido a un tratamiento de permeabilidad con una densidad de  $10^8$  a  $10^9$ /ml, preferiblemente  $2 \times 10^8$ /ml. Estos protoplastos o células se añaden a la solución de recogida, junto con el marcador selectivo que contiene regiones adyacentes sustancialmente homologas a cada lado de dicho marcador para formar una mezcla de transformación. Generalmente, a la solución de recogida se le añade una concentración alta de PEG. En la suspensión de protoplastos se puede añadir de 0,1 a 1 volumen de PEG 4000 al 25%. Sin embargo, es preferible añadir aproximadamente 0,25 volúmenes a la suspensión de protoplastos. Los aditivos como, por ejemplo, dimetilsulfóxido, heparina, espermidina, cloruro de potasio y similares también pueden añadirse a la solución de recogida y contribuir a la transformación.

Generalmente, a continuación se incuba la mezcla a aproximadamente  $0^\circ\text{C}$  durante un periodo entre 10 y 30 minutos. A continuación, se añade PEG adicional a la mezcla para mejorar más la recogida del gen o secuencia de ADN deseada. El PEG 4000 al 25% generalmente se añade en volúmenes de 5 a 15 veces el volumen de la mezcla de transformación; sin embargo, también pueden ser apropiados otros volúmenes mayores y menores. Preferiblemente el PEG 4000 al 25% es alrededor de 10 veces el volumen de la mezcla de transformación. Después de que se añada el PEG, la mezcla de transformación se incuba a temperatura ambiente antes de la adición de una solución de sorbitol y  $\text{CaCl}_2$ . A continuación, la solución de protoplasto se añade a alícuotas licuadas de un medio de crecimiento. Este medio de crecimiento sólo permite el crecimiento de transformantes. En la presente invención puede utilizarse cualquier medio de crecimiento que sea apropiado para el crecimiento de los transformantes deseados. Sin embargo, si se seleccionan los transformantes Pyr, es preferible utilizar un medio de crecimiento que no contenga uridina. Las subsecuentes colonias se transfieren y purifican en un medio de crecimiento empobrecido en uridina.

En esta fase, los transformantes estables se distinguieron de los transformantes inestables por su crecimiento más rápido y por la formación de colonias circulares con un contorno suave, en vez de irregular, en medio de cultivo sólido sin uridina. Adicionalmente, en algunos casos además se realizó un ensayo de estabilidad mediante el cultivo de los transformantes en un medio sólido no selectivo (es decir, que contiene uridina), recogiendo las esporas de este medio de cultivo y determinando el porcentaje de estas esporas que germinarán y crecerán en el medio selectivo que carece de uridina.

En una realización particular del procedimiento descrito arriba, las celulasas truncadas o sus derivados se recuperan de la célula hospedadora en su forma activa como resultado del adecuado procesamiento post traduccional de la nueva celulasa truncada o su derivado.

Las celulasas truncadas se recuperan del medio mediante técnicas convencionales que incluyen separaciones de las células del medio mediante centrifugación, filtración, y precipitación de proteínas en el sobrenadante o el filtrado con una sal, por ejemplo, sulfato de amonio. Adicionalmente, pueden utilizarse procedimientos de cromatografía tales como la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad. Como alternativa, se puede aislar el producto proteico secretado y purificarse mediante la unión con un sustrato de polisacárido o una matriz de anticuerpos. Los anticuerpos (monoclonales o policlonales) pueden modificarse contra los péptidos del centro celulasa o del dominio de unión, o se pueden preparar péptidos sintéticos a partir de porciones del dominio de centro o del dominio de unión y utilizarlos para preparar anticuerpos policlonales.

El ADN transformado en la célula hospedadora puede comprender realizaciones adicionales. Por ejemplo, se contemplan enzimas celulasa que combinan una región de un centro derivado de una fuente microbiana homóloga o heteróloga.

### III. Procedimientos De Tratamiento De Telas Que Contienen Celulosa Utilizando Los Enzimas Celulasa Truncados

Tal como se indica arriba, la presente invención está relacionada con procedimientos de tratamiento de telas que contienen celulosa con un enzima celulasa truncado. El uso de la celulasa truncada de la presente invención proporciona el resultado nuevo y sorprendente de producir un nivel relativamente bajo de redeposición del tinte mientras mantiene un nivel equivalente de abrasión comparado con el tratamiento con celulasa conocido en el estado de la técnica. Debido a que el nivel de abrasión actúa como indicador de la calidad y efectividad de las técnicas particulares de tratamiento con celulasas, por ejemplo, el lavado a la piedra o la lavandería, el uso de la presente invención proporciona una composición de tratamiento textil de calidad sorprendentemente alta. En el contexto de la lavandería, por abrasión se toma como el aclarado del color, eliminación de borrrilla o biopulido.

## ES 2 281 078 T3

La presente invención específicamente contempla el uso de centros celulasa truncados, solos o en combinación con componentes celulasa adicionales, para conseguir una abrasión excelente con una redeposición reducida en comparación con la celulasa no truncada. Adicionalmente, los enzimas celulasa naturales que carecen de dominio de unión se incluyen en el alcance de la protección. También se contempla que los procedimientos de la presente invención proporcionarán mejoras adicionales a las telas tratadas que contienen celulosa, incluyendo mejoras en el tacto y/o apariencia de la tela.

### *A. Metodología para el lavado a la piedra con composiciones de celulasa truncada*

Según la presente invención, la composición de celulasa truncada se utiliza como se define en la reivindicación 1 como una composición para lavado a la piedra. Preferiblemente, la composición para el lavado a la piedra comprende una solución acuosa que contiene una cantidad efectiva de una celulosa truncada junto con otros ingredientes opcionales que incluyen, por ejemplo, un tampón, un surfactante, y un agente de erosión.

Una cantidad efectiva de composición de enzima celulasa truncado es una concentración de enzima celulasa truncado suficiente para el objeto al que se la destina. Así, una "cantidad efectiva" de celulasa truncada en la composición de lavado a la piedra según la presente invención es aquella cantidad que proporciona el tratamiento deseado, por ejemplo el lavado a la piedra. La cantidad de celulasa truncada empleada también es dependiente del equipo empleado, los parámetros del proceso utilizados (la temperatura de la solución de tratamiento de celulasa truncada, el tiempo de exposición a la solución de celulasa, y similares), y la actividad celulasa (por ejemplo, una solución particular requerirá una menor concentración de celulasa cuando se utilice una composición más activa de celulasa que cuando se utilice una composición menos activa de celulasa). El experto en la materia puede determinar fácilmente la concentración exacta de celulasa truncada basándose en los factores indicados arriba y en el resultado deseado. Preferiblemente, la composición de celulasa truncada está presente en una concentración de 1-1000 ppm, más preferiblemente 10-400 ppm y más preferiblemente 20-100 ppm de proteína total.

Opcionalmente, en la composición para el lavado a la piedra se utiliza un tampón de manera que la concentración del tampón es tal que es suficiente para mantener el pH de la solución dentro del intervalo donde la celulasa truncada utilizada muestra su actividad que, a su vez, depende de la naturaleza de la celulasa truncada que se utiliza. La concentración de tampón exacta que se utiliza dependerá de varios factores que el experto en la materia tendrá en cuenta fácilmente. Por ejemplo, en una realización preferida, tanto el tampón como la concentración de tampón se seleccionan de manera que se mantenga el pH de la solución final de celulasa truncada dentro del intervalo de pH necesario para la actividad óptima de la celulasa. Preferiblemente, la concentración del tampón es aproximadamente 0,001 N o mayor. Los tampones apropiados incluyen, por ejemplo, citrato y acetato.

Además de la celulasa truncada y el tampón, la composición para el lavado a la piedra opcionalmente puede incluir un surfactante. Preferiblemente, el surfactante está presente en los medios de lavado diluidos en una concentración mayor que 100 ppm, preferiblemente entre aproximadamente 200-15.000 ppm. Los surfactantes apropiados incluyen cualquier surfactante compatible con la celulasa y la tela, por ejemplo surfactantes aniónicos, no iónicos y amfolíticos. Los emulsionantes aniónicos apropiados para su utilización en la presente invención incluyen sulfonatos de alquilbenceno; sulfatos de alquilo o éter de alqueno con grupos alquilo o alqueno lineales o ramificados; sulfatos de alquilo o alqueno; sulfonatos de oleofina; alcanosulfonatos y similares. Los contraiones apropiados para los surfactantes aniónicos incluyen iones metálicos alcalinos como el sodio y el potasio; iones metálicos alcalinotérreos como el calcio y el magnesio; el ion amonio; y alcanolaminas con 1 a 3 grupos alcohol de 2 ó 3 carbonos. Los surfactantes amfolíticos incluyen sulfonatos de sales de amonio cuaternarias, y surfactantes amfolíticos de tipo betaína. Tales surfactantes amfolíticos tienen grupos cargados positiva y negativamente en la misma molécula. Los surfactantes no iónicos generalmente comprenden tanto éteres de polioxialqueno como alcanolamidas de ácidos grasos superiores o sus aductos de óxido de alqueno, y monoésteres de glicerina y ácidos grasos. Como es conocido en la técnica, también pueden utilizarse mezclas de surfactantes.

En una realización preferida, una composición para el lavado a la piedra concentrada puede prepararse para su utilización en los procedimientos descritos en la presente invención. Tales concentrados contendrían cantidades concentradas de la composición de celulasa truncada descrita arriba, tampón y surfactante, preferiblemente en solución acuosa. Cuando se formula de esta manera, el concentrado para el lavado a la piedra puede diluirse fácilmente con agua de manera que se preparan composiciones para el lavado a la piedra según la presente invención rápidamente y con precisión y que tienen la concentración necesaria de estos aditivos. Preferiblemente, tales concentrados comprenderán de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 por ciento en peso de una composición fúngica de celulasa descrita arriba (proteína); de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 80% en peso de tampón; de aproximadamente 0 a aproximadamente 50% en peso de surfactante; completado con agua. Cuando se formulan concentrados acuosos, estos concentrados pueden estar diluidos para llegar a la concentración necesaria de los componentes en la solución de celulasa truncada tal como se indica arriba. Como resulta fácilmente evidente, tales concentrados para el lavado a la piedra permitirán tanto la formulación sencilla de las soluciones de celulasa truncada como el transporte de la concentración al lugar donde se utilizará. El concentrado para el lavado a la piedra puede estar en cualquiera de las formas reconocidas en la técnica, por ejemplo, líquido, emulsión, gel, o pasta. Tales formas son conocidas por el experto en la materia.

Cuando se utiliza un concentrado sólido para el lavado a la piedra, la composición de celulasa puede ser gránulos, polvo, aglomerado o un disco sólido. Cuando se utilizan gránulos, los gránulos preferiblemente se formulan de manera

que contengan un agente protector de la celulasa. Ver, por ejemplo WO91/17235 titulada "GRANULES AND AN ENZYME PROTECTING AGENT AND DETERGENT COMPOSITIONS CONTAINING SUCH GRANULES". De la misma manera, los gránulos pueden formularse de manera que contengan materiales para reducir la velocidad de disolución de los gránulos en el medio de lavado. Tales materiales y gránulos se describen en la patente US 5254283.

5

Con la composición para el lavado a la piedra de la presente invención pueden añadirse o utilizarse otros materiales según se desee, incluyendo piedras, piedra pómez, agentes de relleno, disolventes, activadores enzimáticos, y otros agentes anti-redeposición.

10

La tela que contiene celulosa se pone en contacto con la composición para el lavado a la piedra que contiene una cantidad efectiva de la composición del enzima celulasa truncado mediante la mezcla de la composición de tratamiento con la composición de lavado a la piedra, y de esta manera se pone en contacto la tela con enzima celulasa truncado. Por ejemplo, si la composición de tratamiento es una solución acuosa, la tela se puede empapar directamente en la solución. De manera similar, cuando la composición es un concentrado, el concentrado se diluye en un baño de agua con la tela que contiene celulosa. Cuando la composición para el lavado a la piedra está en forma sólida, por ejemplo en un gel de prelavado o en una barra sólida, la composición para el lavado a la piedra puede ponerse en contacto mediante la aplicación directa de la composición a la tela o a la solución de lavado.

15

La tela que contiene celulosa se incuba en la solución para el lavado a la piedra en condiciones efectivas para permitir la acción enzimática y proporcionar una apariencia de lavado a la piedra a la tela que contiene celulosa. Por ejemplo, durante el lavado a la piedra, el pH, la relación de disolución de lavado, la temperatura y el tiempo de reacción pueden ajustarse para optimizar las condiciones en las cuales actúa la composición para el lavado a la piedra. "Condiciones efectivas" se refiere necesariamente al pH, la relación de disolución de lavado, y la temperatura que permiten al enzima celulasa truncado reaccionar eficientemente con la tela que contiene celulosa. Las condiciones de reacción para el centro truncado de celulasa, y por tanto las condiciones efectivas para las composiciones para el lavado a la piedra, son sustancialmente similares a procedimientos conocidos en la técnica que se utilizan con las correspondientes celulasas no truncadas. Por lo tanto, las condiciones efectivas para el tratamiento de telas que contienen celulosa con una composición para el lavado a la piedra que comprende centros del tipo CBHI son sustancialmente similares a aquellas conocidas en el estado de la técnica anterior que utilizan composiciones de celulasa CBHI natural. Por lo tanto, optimizar las condiciones para el uso de composiciones para el lavado a la piedra se encuentra entre los conocimientos del experto en la materia.

20

25

30

Las proporciones de la solución de lavado durante el lavado a la piedra, es decir, la proporción en peso de la solución de la composición para el lavado a la piedra (es decir, la solución de lavado) respecto al peso de la tela utilizado en la presente invención, generalmente es una cantidad suficiente para conseguir el efecto de lavado a la piedra deseado en la tela tejana y es depende del procedimiento utilizado. Preferiblemente, las proporciones del licor son aproximadamente 4:1 a aproximadamente 50:1, más preferiblemente de 5:1 a aproximadamente 20:1, y más preferiblemente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 15:1.

35

Las temperaturas de reacción durante el lavado a la piedra con las presentes composiciones para el lavado a la piedra se rigen mediante dos factores en competición. Primero, las temperaturas altas generalmente corresponden a cinéticas de reacción mejoradas, es decir, a reacciones más rápidas, que permiten unos tiempos de reacción reducidos en comparación con los tiempos de reacción necesarios a temperaturas inferiores. Por lo tanto, las temperaturas de reacción generalmente son al menos de aproximadamente 10°C o superiores. Segundo, la celulasa es una proteína que pierde su actividad por encima de una temperatura dada la cual depende de la naturaleza de la celulosa utilizada. Así, si se permite que la temperatura de reacción aumente demasiado, entonces se pierde la actividad celulolítica como resultado de la desnaturalización de la celulasa. Como resultado, generalmente las temperaturas máximas de reacción utilizadas en la presente invención son aproximadamente 65°C. En vista de lo anterior, las temperaturas de reacción generalmente son de aproximadamente 30°C a aproximadamente 65°C; preferiblemente, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 60°C; y más preferiblemente, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 55°C.

40

45

50

Los tiempos de reacción son dependientes de las condiciones específicas en las que se lleva a cabo el lavado a la piedra. Por ejemplo, el pH, la temperatura y la concentración de la celulasa truncada afectarán al tiempo óptimo de reacción. Generalmente, los tiempos de reacción son de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 5 horas, y preferiblemente de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 3 horas y, más preferiblemente, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 1 hora.

55

Las telas que contienen celulosa tratadas con el procedimiento del lavado a la piedra definido en la reivindicación 1 que utiliza composiciones de celulasa muestra una redeposición del tinte reducida en comparación con las mismas telas que contienen celulosa tratadas de la misma manera con una composición de celulasa no truncada.

60

Los siguientes ejemplos específicos se proporcionan con el objetivo de ilustrar adicionalmente la presente invención y sus ventajas y no con la intención de que supongan ningún tipo de limitación del alcance de la protección.

65

## Ejemplos

## Ejemplo 1

5 *Clonación y Expresión de los dominios del centro EGI utilizando su propio promotor, terminador y secuencia de señalización*

## Parte 1

10 *Clonación*

El gen egl1 completo utilizado en la construcción del plásmido de expresión del dominio del centro EGI, PEG1Δ3'pyr, se preparó a partir del plásmido PUC218::EG1. (ver Fig. 6) La región de terminación 3' de egl1 se unió en PUC218 (Korman, D. *et al* Curr Genet 17:203-212, 1990) en forma de un fragmento BsmI-EcoRI de 300 pb con un conector sintético diseñado para reemplazar el intrón 3' y el dominio de unión celulosa por un codón de parada y continúa con las secuencias del terminador egl1. El plásmido resultante, PEG1T, se digirió con HindIII y BsmI y se aisló el fragmento del vector del producto digerido mediante electroforesis en gel de agarosa seguido de electroelución. De PUC218::EG1 se aislaron la secuencia del promotor del gen egl1 y el dominio del centro de egl1 en forma de un fragmento HindIII-SstI de 2,3 kb y se unió al mismo fragmento conector sintético y el PEG1T digerido en HindIII-BsmI para formar el PEG1Δ3'.

El resultado neto de estas operaciones es el reemplazo del intrón 3' y del dominio de unión de celulosa de egl1 por los nucleótidos sintéticos de 53 y 55 pb. Éstos colocan un codón TAG de stop después de la serina 415 y después continúa con el terminador egl1 hasta el sitio BsmI.

A continuación, el marcador selectivo de *T. longibrachiatum*, pyr4, se preparó a partir de un clon previo de p219M (Smith *et al* 1991), en forma de un fragmento EcoRI-HindIII de 1,6 kb. Éste se incorporó en el plásmido de expresión final, PEG1Δ3'pyr, en una ligación de tipo "three way" con el plásmido PUC18 digerido con EcoRI y desfosforilado utilizando fosfatasa alcalina de ternero y un fragmento HindIII-EcoRI que contiene el dominio del centro egl1 de PEG1Δ3'.

## Parte 2

35 *Transformación y Expresión*

Se realizó una preparación a gran escala de ADN de PEG1Δ3'pyr y de ésta se aisló el fragmento de EcoRI que contiene el dominio del centro egl1 y el gen pyr4 mediante electroforesis preparativa en gel. El fragmento aislado se transformó en la versión auxotrofa respecto uridina de la cadena tetradelecionada, 1A52 pyr13 (descrita en EP-A-0 580 719), y se identificaron los transformantes estables.

Para seleccionar cuales de los transformantes expresaban el dominio del centro egl1, se cultivaron en frascos de agitación en las condiciones que favorecen la inducción de los genes celulasa (Vogels + 1% lactosa). Después de 4-5 días de cultivo, se concentró la proteína de los sobrenadantes y 1) se hicieron correr en geles SDS poliacrilamida previamente a la detección del dominio del centro egl1 mediante análisis Western utilizando anticuerpos policlonales EGI o 2) los sobrenadantes concentrados se ensayaron directamente utilizando carboximetilcelulosa RBB como sustrato específico para endoglucanasa y se compararon los resultados con la cepa parental 1A52 como control. Los transformantes candidatos se identificaron por la posibilidad de producir una proteína con el dominio del centro EGI truncado. Se aisló el ADN genómico y el ARNm total de estas cepas continuando el cultivo en Vogels + lactosa 1% y se llevaron a cabo experimentos de transferencia Northern y Southern utilizando un fragmento aislado de ADN que solo contenía el dominio del centro egl1. Estos experimentos demostraron que los transformantes pueden aislarse con una copia del casete de expresión del dominio del centro egl1 integrado en el genoma de 1A52 y que estos mismos transformantes produjeron ARNm del dominio del centro egl1.

A continuación se cultivó un transformante utilizando un medio apropiado, conocido en el estado de la técnica, para la producción de celulasa en *Trichoderma* que se suplementó con lactosa (Warzymoda, M. *et al* 1984 Patente FR 2555603) en un fermentador de 14L. Se concentró el caldo resultante y las proteínas que contenía se separaron mediante electroforesis en gel de SDS poliacrilamida y la proteína del dominio del centro Egl1 se identificó mediante análisis Western. (ver Ejemplo 3). A continuación se estimó que la concentración de proteína del sobrenadante de la fermentación era de aproximadamente 5-6 g/L de los cuales aproximadamente el 1,7-4,4 g/L eran dominios del centro EGI basándose en la actividad CMCasa. Este valor está basado en la media de las varias fermentaciones del centro EGI que se llevaron a cabo.

Cualquier otro dominio de celulasa o sus derivados puede prepararse de manera similar mediante procedimientos similares a los descritos arriba.

## Ejemplo 2

*Purificación de los centros catalíticos EGI y EGII*

## 5 Parte 1

*Centro catalítico EGI*

El centro EGI se purificó de la siguiente manera. El caldo concentrado (UF) se diluyó a 14 mg/ml en acetato de Na  
 10 23 mM pH 5,0. Se añadieron doscientos gramos de gel de celulosa avicel (FMC Bioproducts, Tipo PH-101) al caldo de  
 centro EGI diluido y se mezclaron a temperatura ambiente durante cuarenta y cinco minutos. El avicel se eliminó del  
 caldo mediante centrifugación, resultando en una solución enriquecida de centros EGI. A esta solución se le cambió  
 el tampón por TES 10 mM pH 7,5 mediante un concentrador celular con agitación Amicon con una membrana PM  
 15 10 (membranas de ultrafiltración diaflo, Amicon Cat # 13132MEM 5468A). A continuación, se cargó la muestra de  
 centro EGI en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharosa fast flow, Pharmacia Cat # 17-0510-01) y se eluyó  
 en un gradiente de sal de 0 a 0,5 M en NaCl en TES 10 mM a pH 7,5. Las fracciones que contienen el centro EGI se  
 combinaron y se concentraron utilizando el concentrador celular con agitación Amicon mencionado arriba.

## 20 Parte 2

*Centro catalítico EGII*

El centro EGII se purificó de la siguiente manera. El caldo concentrado (UF) se filtró utilizando tierra de diatomeas.  
 Se añadió sulfato de amonio al caldo hasta una concentración final de 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y a continuación esta mezcla  
 25 se cargó en una columna hidrofóbica (fenil-sefariosa fast flow, Pharmacia, Cat # 17-0965-01). La columna se lavó  
 con sulfato de amonio 0,75 M antes de la elución del centro EGII con sulfato de amonio 0,5 M. Las fracciones  
 que contienen el centro se juntaron y se concentraron utilizando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial  
 (Filtron Minisette Ultrafiltration System, cat #FS018K01) con una membrana Omega 10K Membrane (Filtron, cat#  
 FS010K75). Se añadieron 100 gramos de gel de celulosa avicel (FMC Bioproducts, Tipo PH-101) por cada gramo de  
 30 centro concentrado EGII y se mezcló durante 40 minutos. El avicel se eliminó mediante centrifugación resultando en  
 una solución enriquecida de centro EGII.

## Ejemplo 3

35 *Clonación y Expresión de los dominios del centro CBHII utilizando el promotor, terminador y secuencia de señaliza-  
 ción de CBHI a partir de CBHII*

## Parte 1

40 *Construcción del plásmido de expresión PTEX de T. longibrachiatum de función general*

El plásmido PTEX se construyó según los procedimientos de Sambrook *et al.* (1989), supra, y se ilustra en la Fig.  
 7. Este plásmido se ha designado como un vector de expresión multiuso para su utilización en el hongo filamentoso  
*Trichoderma longibrachiatum*. El casete de expresión tiene varias características únicas que lo hacen útil para esta  
 45 función. La transcripción está regulada utilizando el promotor fuerte del gen CBH I y las secuencias de terminación  
 para *T. longibrachiatum*. Entre el promotor CBHI y el terminador están las dianas de restricción PmeI y SstI que  
 se utilizan para insertar el gen a expresar. El gen marcador selectivo de *T. longibrachiatum* pyr4 se insertó en el  
 terminador CBHI y se puede escindir todo el casete de expresión (promotor CBHI -sitios de inserción-terminador  
 CBHI-gen pyr4-terminador CBHI) utilizando la diana de restricción única NotI o las dianas de restricción únicas NotI  
 50 y NheI.

Este vector se basa en el vector bacteriano, pSL1180 (Pharmacia Inc., Piscataway, Nueva Jersey), que es un vector  
 del tipo PUC con un sitio amplio de clonación múltiple. El experto en la materia será capaz de construir este vector  
 basándose en el diagrama de flujo ilustrado en la Fig.7 (ver también US-A-5650322 para la construcción del plásmido  
 55 de expresión PTEX).

Podría ser posible construir plásmidos similares a las celulasas truncadas PTEX o a sus derivados descritos en la  
 presente invención que contengan cualquier otro trozo de secuencia de ADN reemplazando el gen de celulosa truncada.

## 60 Parte 2

*Clonación*

El gen completo cbh2 utilizado en la construcción del plásmido de expresión del dominio del centro CBHII, el  
 65 centro PTEX CBHII, se obtuvo a partir del plásmido PUC219::CBHII (Korman, D. *et al.*, 1990, Curr Genet 17:203-  
 212). El dominio de unión a celulosa, localizado en el extremo 5' del gen cbh2, está dispuesto convenientemente  
 entre una diana de restricción XbaI y una SnaBI. Para utilizar la diana XbaI se destruyó una diana XbaI adicional  
 en el policonector. El PUC219::CBHII se digirió parcialmente con XbaI de tal manera que la mayoría del producto

## ES 2 281 078 T3

fue lineal. Las terminaciones XbaI se complementaron utilizando ADN polimerasa T4 y se unieron entre ellas en condiciones que favorecían la unión del plásmido con él mismo. Esto tuvo el efecto de destruir el sitio truncado, que en el 50% de los plásmidos correspondía a la diana XbaI en el policonector. Dicho plásmido se identificó y se digirió con XbaI y SnaBI para liberar el dominio de unión para celulosa. Se aisló el vector-dominio del centro CBHII y se unió con los siguientes oligonucleótidos sintéticos diseñados para unirse al sitio XbaI con el sitio SnaBI en el sitio de señalización de la escisión peptidasa y el punto de escisión de papaína en el dominio del conector.

```
10      XbaI                                SnaBI
      5' CTA GAG CGG TCG GGA ACC GCT AC 3'      (SEQ ID NO: 42)
      3'  TC CTC GCC AGC CCT TGG CGA TG 5'
      Leu Glu Glu Arg Ser Gly Thr Ala Thr      (SEQ ID NO: 43)
```

15 El plásmido resultante, pUCDCBD CBHII, se digirió con NheI y se incubó con ADN polimerasa T4 y dNTPs para conseguir los extremos romos. A continuación el ADN plásmido romo lineal se digirió con BglIII y se aisló el fragmento BglIII Nhe (romo) que contenía la secuencia de señalización CBHII y el dominio del centro.

20 El plásmido final de expresión se modificó mediante la digestión del plásmido de expresión de uso general, pTEX (descrito en US-A-5650322, y en la parte 3 a continuación), con SstII y PmeI y uniendo el fragmento CBHII NheI (romo)-BaIII de pUCDCBD CBHII en el sentido 3' del promotor cbh1 utilizando un oligonucleótido sintético con la secuencia CGTAG para complementar el extremo BglIII con el extremo SstII. La construcción del vector de expresión pTEC del centro CBHII resultante se ilustra en la Fig. 9.

25 El plásmido de expresión del centro pTEX-CBHI se preparó de manera similar al del centro pTEX-CBHII descrito arriba. Su construcción se ejemplifica en la Fig. 8.

### Parte 3

#### 30 *Transformación y Expresión*

Se realizó una preparación a gran escala de ADN de centro Ptex CBHII y de ésta se aisló el fragmento NotI que contiene el dominio del centro CBHII bajo el control de los elementos transcripcionales cbh1 y se aisló el gen pyr4 mediante electroforesis preparativa en gel. El fragmento aislado se transformó en la versión auxotrofa respecto uridina de la cadena tetradelecionada, 1A52 pyr13, y se identificaron los transformantes estables.

40 Para seleccionar cuales de los transformantes expresaban el dominio del centro cbh2, se aisló el ADN genómico de las cepas continuando el crecimiento en Vogels + glucosa 1% y se realizaron experimentos de transferencia Southern utilizando un fragmento aislado de ADN que sólo contenía el dominio del centro cbh2. Se aislaron los transformantes que tenían una copia del casete de expresión del dominio del centro cbh2 integrada en el genoma de 1A52. El ARNm total se aisló a partir de dos cepas continuando su cultivo 1 día en Vogels + lactosa 1%. El ARNm se sometió a análisis Northern utilizando la región de codificación de cbh2 como sonda. Se identificaron los transformantes que expresan el ARNm del dominio del centro cbh2.

45 Se cultivaron dos transformantes en fermentadores 14L en las mismas condiciones descritas arriba, en el Ejemplo 1. El caldo resultante se concentró y las proteínas que contenía se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y se identificó la proteína del dominio del centro CBHII mediante análisis Western. Uno de los transformantes, #15, produjo una proteína con el tamaño y la reactividad correspondiente a los anticuerpos policlonales CBHII.

50 A continuación se estimó que, después de la purificación, la concentración de proteína del sobrenadante de la fermentación era de 10 g/L de los cuales aproximadamente el 30-50% eran dominios del centro CBHII (Ver Ejemplo 4).

55 Cualquier nueva proteína del dominio del centro truncado de celulasa o sus derivados se puede obtener utilizando los procedimientos descritos arriba.

### Ejemplo 4

#### 60 *Purificación de los centros catalíticos CBHI y CBHII*

##### Parte 1

##### 65 *Centro catalítico CBHI*

El centro CBHI se purificó de la siguiente manera a partir del caldo de cultivo. El caldo de cultivo concentrado y ultrafiltrado (UF) de los centros CBHI se filtró utilizando tierra de diatomeas y se diluyó en TES 10 mM pH 6,8

## ES 2 281 078 T3

hasta una conductividad de 1,5 mOhm. A continuación, los centros CBHI diluidos se cargaron en una columna de intercambio aniónico (Q-Sefarosa fast flow, Pharmacia cat # 17-0510-01), equilibrada en TES 10 mM pH 6,8. El centro CBHI se separó de la mayoría de las otras proteínas del caldo de cultivo utilizando un gradiente de elución de 0 a 1M NaCl en TES 10 mM pH 6,8. A continuación, las fracciones que contenían el centro CBHI se concentraron en un concentrador celular con agitación Amicon con una membrana PM 10 (membranas de ultrafiltración diaflo, Amicon Cat # 13132MEM 5468A). En esta etapa se concentró el centro, y adicionalmente se provocó la separación del centro y las proteínas de menor peso molecular. La pureza del centro CBHI fue de más del 85% en las fracciones resultantes. Se comprobó la secuencia de la fracción más pura para comprobar que correspondía al centro CBHI.

### 10 Parte 2

#### *Centro catalítico CBHII*

15 Se espera que el centro catalítico CBHII se purifique de manera similar a la de la celulosa CBHII ya que poseen propiedades bioquímicas similares. El pI teórico del centro CBHII está menos de media unidad de pH por debajo del de CBHII. Adicionalmente, el peso molecular del centro catalítico CBHII es aproximadamente el 80% del peso molecular de CBHII. Por lo tanto, el protocolo de purificación propuesto a continuación se basa en el procedimiento de purificación utilizado para CBHII. El caldo de cultivo del centro CBHII, ultrafiltrado (UF) y tratado con tierra de diatomeas, se diluye en TES 10 mM pH 6,8 hasta una conductividad de <0,7 mOhm. A continuación se carga el centro CBHII diluido en una columna de intercambio aniónico (Q-Sefarosa fast flow, Pharmacia, cat # 17 0510-01), equilibrada con TES 10 mM pH 6,8. Para eluir el centro CBHII a través de la columna se utiliza un gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl en TES 10 mM a pH 6,8.

20 A continuación, se cambia el tampón de las fracciones que contienen el centro CBHII a un tampón de succinato de sodio 2 mM y se cargan en una columna de intercambio catiónico (SP-Sephadex C-50). A continuación, el centro CBHII se eluye con un gradiente salino de 0 a 100 mM de NaCl.

#### Ejemplo 5

#### 30 *Lavado a la piedra con enzima celulasa truncado*

Este ejemplo demuestra que el uso de los centros catalíticos truncados de celulosa, y en particular con centros catalíticos endoglucanasa truncados, resulta sorprendentemente en una redistribución del tinte reducida en la tela que contiene celulosa (tejana) durante el lavado a la piedra con un nivel de abrasión equivalente a la celulosa no truncada. Adicionalmente, la combinación de centros catalíticos truncados del tipo CBH y de celulosa no truncada de tipo EG ha resultado en unas características de reteñido mejoradas en comparación con combinaciones no truncadas con niveles de abrasión equivalentes. La ropa tejana es ropa de algodón teñida. Los procedimientos para proporcionar una apariencia de lavado a la piedra a las telas tejanas se describen en la patente US 4832864 y US-A-5650322.

40 Los centros catalíticos truncados de celulosa y los componentes de celulosa se purificaron para su utilización en este ejemplo como se indica a continuación:

a) El componente EGIII de celulosa se purificó según el procedimiento descrito en la patente US 5328841.

45 b) El centro catalítico truncado EGI de celulosa se purificó mediante el procedimiento del Ejemplo 2.

c) El centro catalítico EGII truncado de celulosa se purificó mediante el procedimiento del Ejemplo 2.

d) El centro catalítico truncado CBHI de celulosa se preparó según el procedimiento del Ejemplo 4.

50 e) El componente EGI de celulosa se purificó para su utilización en aplicaciones relacionadas con el lavado a la piedra de la siguiente manera. El caldo de cultivo concentrado (UF) se diluyó en tampón de acetato de sodio 25 mM pH 5,0 hasta una concentración de proteína de 7 mg/ml. Se añadieron 450 gramos de gel de celulosa avicel (FMC Bioproducts, Tipo PH-101) al caldo diluido y se mezclaron a temperatura ambiente durante treinta minutos. El avicel se eliminó del caldo de cultivo mediante centrifugación resultando en un centro catalítico EGI enriquecido.

55 f) El componente EGII de celulosa se purificó para su utilización en aplicaciones relacionadas con el lavado a la piedra de la siguiente manera. El caldo concentrado (UF) se filtró a través de tierra de diatomeas y se le cambió el tampón a tampón citrato-fosfato pH 7,0, 0,4 mOhm mediante una unidad de ultrafiltración (Filtron Minisette Ultrafiltration System, cat # FS018K01) con una membrana Omega 10K Membrane (Filtron, cat# FS010K75). A continuación, este material se cargó en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharosa fast flow, Pharmacia, cat. #17-0510-01) equilibradas en el tampón de citrato-fosfato de arriba. El EGII se recogió a la salida de la columna y se sometió a intercambio de resinas en citrato de sodio a pH 3,25, 0,5 mOhms utilizando la unidad de ultrafiltración mencionada arriba. A continuación este material se cargó en una columna de intercambio catiónico (SP-Spherodex LS, IBF Biotechnics, cat #262041). A continuación se eluyó el EGII a través de la columna con un gradiente lineal de pH 3,25 a 5,4. Las fracciones que contenían EGII se juntaron y se utilizaron en las aplicaciones para el lavado a la piedra.

## ES 2 281 078 T3

a) el componente CBH I de celulasa se purifico según el procedimiento descrito en el Ejemplo 15 de la solicitud de patente US 07/954113.

5 Se probó la capacidad de estos dominios truncados de centro catalítico celulasa y de los componentes celulasa, solos o en combinación, para proporcionar una apariencia de lavado a la piedra a la ropa tejana tejida. Específicamente, las telas tejanas lavadas a la piedra se prepararon mediante una lavadora y una secadora industriales en las siguientes condiciones:

10 Tampón Citrato/fosfato a pH 5

Volumen total 38 L

120-135° F

15 Seis pares de pantalones tejanos con un peso equivalente de grava, 1 hora de tiempo de programa, 15-30 ppm de EGI, EGII, EGIII; 50 ppm de CBHI y de centro catalítico CBHI; y 30-70 ppm de centro catalítico EGI y de centro catalítico EGII.

20 Un post-lavado con detergente incluyó 90 gramos de detergente AATCC sin abrillantador en el caso de CBHI, centro catalítico CBHI, EGIII más CBHI y EGIII más centro catalítico CBHI.

25 Las telas se evaluaron por su apariencia de lavado a la piedra (abrasión) y también por la redeposición del tinte en la tela mediante cinco piezas de tela de prueba. Las telas se ordenaron utilizando una escala que consiste en cintas de tela tejana que presentan incrementos en los niveles de abrasión o redeposición. Las escalas se numeran de 1-10; 1 representa los tejanos con la menor cantidad de abrasión o redeposición (tejano "desize"), y 10 representa un tejano muy desgastado o reteñido. La apariencia de los tejanos tratados se comparó directamente con las cintas de tela tejana de la escala y se les dio un número en función de la cinta de la escala que mejor les correspondía. Los resultados de la

30 evaluación se muestran en las Figs. 10 y 11.

Como se muestra en la Fig.10, el centro catalítico truncado EGI y el centro catalítico EGII truncado proporcionan ventajas significativas en abrasión y redeposición reducida sobre sus homólogos en estado natural no modificados.

35 Como se muestra en la Fig. 11, la adición del componente CBHI de celulasa a EGIII resultó en una ligera mejora del lavado a la piedra pero en un gran incremento del reteñido (redeposición) del tinte en la tela. Sin embargo, la adición de centros catalíticos truncados CBHI a la solución de EGIII mejoró los resultados, con un incremento en la abrasión y un descenso en la redeposición. Así, la adición de centros catalíticos CBHI truncados a la celulasa EGIII disminuyó la redeposición a un nivel inferior al de EGIII en solitario.

40 Estos resultados son inesperados y sorprendentes.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para proporcionar apariencia de lavado a la piedra a telas teñidas que contienen celulosa utilizando celulosa, que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto dicha tela que contiene celulosa con una composición de tratamiento que comprende celulosa no truncada del tipo EG que comprende un dominio de unión a celulosa y un centro catalítico, y una celulosa truncada que comprende un centro catalítico truncado de tipo CBH que carece de un dominio de unión a celulosa; y
- 10 (b) incubar dicha tela que contiene celulosa en contacto con dicha composición de tratamiento en las condiciones que confieran dicha apariencia de lavada a la piedra a dicha tela.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho centro catalítico truncado del tipo CBH es un centro del tipo CBHI.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la celulosa no truncada de tipo EG es EGIII.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha tela teñida que contiene celulosa comprende una tela que contiene algodón.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, donde dicha tela que contiene algodón comprende tela tejana teñida.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición de tratamiento comprende la celulosa truncada en una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 ppm de proteína total.
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde dicha composición de tratamiento comprende la celulosa truncada en una concentración de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 500 ppm.
- 30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha celulosa truncada deriva de un microorganismo que es un hongo o una bacteria.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, donde dicho hongo es *Trichoderma sp.*
- 35 10. Procedimiento según la reivindicación 9, donde dicho *Trichoderma sp.* es *Trichoderma longibrachiatum*.
11. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende la etapa adicional de tratar dicha tela con piedra pómez previamente, posteriormente o simultáneamente a dicha etapa de tratamiento.
- 40 12. Procedimiento según la reivindicación 11, donde dicho centro catalítico truncado de tipo CBH está presente en una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 400 ppm de proteína total.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, donde dicho centro catalítico de tipo CBH está presente en una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 ppm de proteína total.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 281 078 T3

AAGCTTAGCCAAGAACAATAGCCGATAAAGATAGCCTCATTAAACGGAAT 50  
 GAGCTAGTAGGCAAAGTCAGCGAATGTGTATATATAAAGGTTTCGAGGTCC 100  
 GTGCCTCCCTCATGCTCTCCCCATCTACTCATCAACTCAGATCCTCCAGG 150  
 AGACTTGTACACCATNTTTTGAGGCACAGAAACCCAATAGTCAACCGCGG 200  
 ACTGGCATCATGTATCGGAAGTTGGCCGTCATCTCGGCCTTCTTGGCCAC 250  
 Met Tyr Arg Lys Leu Ala Val Ile Ser Ala Phe Leu Ala Thr  
 AGCTCGTGCTCAGTCGGCCTGCACTCTCCAATCGGAGACTCACCCGCCTC 300  
 Ala Arg Ala Gln Ser Ala Cys Thr Leu Gln Ser Glu Thr His Pro Pro  
 TGACATGGCAGAAATGCTCGT TGGTGGCACTTGCCTCAACAGACAGGC 350  
 Leu Thr Trp Gln Lys Cys Ser Ser Gly Gly Thr Cys Thr Gln Gln Thr Gly  
 TCGTGGTCATCGACGCCAACTGGCGCTGGACTCACGCTACGAACAGCAG 400  
 Ser Val Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Thr His Ala Thr Asn Ser Ser  
 CACGAACTGCTACGATGGCAACACTTGGAGCTCGACCCTATGTCCTGACA 450  
 Thr Asn Cys Tyr Asp Gly Asn Thr Trp Ser Ser Thr Leu Cys Pro Asp  
 ACGAGACCTGCGCGAAGAACTGCTGTCTGGACGGTGCCGCCTACGCGTCC 500  
 Asn Glu Thr Cys Ala Lys Asn Cys Cys Leu Asp Gly Ala Ala Tyr Ala Ser  
 ACGTACGGAGTTACCACGAGCGGTAACAGCCTCTCCATTGGCTTTGTCAC 550  
 Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ser Leu Ser Ile Gly Phe Val Thr  
 CCAGTCTGCGCAGAAGAACGTTGGCGCTCGCCTTTACCTTATGGCGAGCG 600  
 Gln Ser Ala Gln Lys Asn Val Gly Ala Arg Leu Tyr Leu Met Ala Ser  
 ACACGACCTACCAGGAATTCACTCTGCTTGGCAACGAGTTCTCTTTTCGAT 650  
 Asp Thr Thr Tyr Gln Glu Phe Thr Leu Leu Gly Asn Glu Phe Ser Phe Asp  
 GTTGATGTTTCGCAGCTGCCGTAAGTGACTTACCATGAACCCCTGACGTA 700  
 Val Asp Val Ser Gln Leu Pro  
 TCTTCTTGTGGGCTCCCAGCTGACTGGCCAATTTAAGGTGCGGCTTGAAC 750  
 Cys Gly Leu Asn  
 GGAGCTCTCTACTTCGTGTCCATGGACGCGGATGGTGGCGTGAGCAAGTA 800  
 Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ser Met Asp Ala Asp Gly Gly Val Ser Lys Tyr

**FIG. 1A**

TCCCACCAACACEGCTGGCGCCAAGTACGGCACGGGGTACTGTGACAGCC 850  
 Pro Thr Asn Thr Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser  
 AGTGTCCCCGCGATCTGAAGTTCATCAATGGCCAGGCCAACGTTGAGGGC 900  
 Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly  
 TGGGAGCCGTCATCCAACAACGCCAACACGGGCATTGGAGGACACGGAAG 950  
 Trp Glu Pro Ser Ser Asn Asn Ala Asn Thr Gly Ile Gly Gly His Gly Ser  
 CTGCTGCTCTGAGATGGATATCTGGGAGGCCAACTCCATCTCCGAGGCTC 1000  
 Cys Cys Ser Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Glu Ala  
 TTACCCCCCACCTTGCACGACTGTCTGGCCAGGAGATCTGCGAGGGTGAT 1050  
 Leu Thr Pro His Pro Cys Thr Thr Val Gly Gln Glu Ile Cys Glu Gly Asp  
 GGGTGCGGCGGAACCTTACTCCGATAACAGATATGGCGGCACTTGCATCC 1100  
 Gly Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Asp Asn Arg Tyr Gly Gly Thr Cys Asp Pro  
 CGATGGCTGCGACTGGAACCCATACCGCTGGGCAACACCAGCTTCTACG 1150  
 Asp Gly Cys Asp Trp Asn Pro Tyr Arg Leu Gly Asn Thr Ser Phe Tyr  
 GCCCTGGCTCAAGCTTTACCCTCGATACCACCAAGAAATTGACCGTTGTC 1200  
 Gly Pro Gly Ser Ser Phe Thr Leu Asp Thr Thr Lys Lys Leu Thr Val Val  
 ACCCAGTTCGAGACGTCGGGTGCCATCAACCGATACTATGTCCAGAATGG 1250  
 Thr Gln Phe Glu Thr Ser Gly Ala Ile Asn Arg Tyr Tyr Val Gln Asn Gly  
 CGTCACTTTCAGCAGCCCAACGCCGAGCTTGGTAGTTACTCTGGCAACG 1300  
 Val Thr Phe Gln Gln Pro Asn Ala Glu Leu Gly Ser Tyr Ser Gly Asn  
 AGCTCAACGATGATTACTGCACAGCTGAGGAGGCAGAATTCGGCGGATCC 1350  
 Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Cys Thr Ala Glu Glu Ala Glu Phe Gly Gly Ser  
 TCTTTCTCAGACAAGGGCGGCCTGACTCAGTTCAAGAAGGCTACCTCTGG 1400  
 Ser Phe Ser Asp Lys Gly Gly Leu Thr Gln Phe Lys Lys Ala Thr Ser Gly  
 CGGCATGGTTCTGGTCATGAGTCTGTGGGATGATGTGAGTTTGATGGACA 1450  
 Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp  
 AACATGCGGTTGACAAAGAGTCAAGCAGCTGACTGAGATGTTACAGTAC 1500  
 Tyr  
 TACGCCAACATGCTGTGGCTGGACTCCACCTACCCGACAAACGAGACCTC 1550  
 Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Glu Thr Ser

**FIG. 1B**

CTCCACACCCGGTGCCGTGCGCGGAAGETGCTCCACCAGCTCCGGTGTC 1600  
 Ser Thr Pro Gly Ala Val Arg Gly Ser Cys Ser Thr Ser Ser Gly Val  
CTCCTCAGGTEGAATCTCAGTCTCCCAACGCCAAGGTEACCTTCTCCAAC 1650  
 Pro Ala Gln Val Glu Ser Gln Ser Pro Asn Ala Lys Val Thr Phe Ser Asn  
ATCAAGTTCCGACCCATTGGCAGCACCCGGCAACCCTAGCGGCGGCAACCC 1700  
 Ile Lys Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro  
TCCCGGGGAAACEGTGGCACCACCACCACCCGCCGCCAGCCACTACCA 1750  
 Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr  
CTGGAAGCTCTCCCGGACCTACECAGTCTCACTACGGCCAGTGCGGGCGGT 1800  
 Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly  
ATTGGCTACAGCGGCECCCAEGGTCTGEGCCAGCGGCACAACCTGCCAGGT 1850  
 Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val  
CCTGAACCCCTACTACTCTCAGTGCCTGTAAAGCTCCGTGCGAAAGCCTG 1900  
 Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
ACGCACCCGGTAGATTCTTGGTGAGCCCGTATCATGACGGCGGGCGGGAGCT 1950  
ACATGCCCCGGGTGATTTATTTTTTTTGTATCTACTTCTGACCCCTTTC 2000  
AAATATACGGTCAACTCATCTTTCACTGGAGATGCGGCCTGCTTGGTATT 2050  
CGGATCTTGTCACTTGGCAAATTGTGGCTTTEGAAAACACAAAACGATT 2100  
CCTTAGTAGCCATGCATTTTAAGATAAEGGAATAGAAGAAAGAGGAAATT 2150  
AAAAAAAAAAAAAAAAACAACATCCCGTTCATAAECCTAGAAATCGCCGC 2200  
TCTTCGTGATCCAGTACCA 2221

**FIG. 1C**

FIG. 1A

FIG. 1B

**FIG. 1**

FIG. 1C

GAATTCAGGCTAGGTATGCGAGGCCACGCGGATCTAGGGCAGACTGGGCA 50  
 TTGCATAGCTATGGTGTAGTAGAACTCCCGTCAACGGGTATTCTCACCTA 100  
 GACTTCCCTTCGAACTGACAAGTTGTATATTGCCTGTGTACCAAGCG 150  
 CTAATGTGGACAGGATTAATGCCAGAGTTCATTAGCCTCAAGTAGAGCCT 200  
 ATTCCTCGCCGAAAGTCATCTCTCTTATTGCATTTCTGCCTTCCACTA 250  
 ACTCAGGGTGCAGCGCAACACTACACGCAACATATCACATTTATTAGCCG 300  
 TGCAACAAGGCTATTCTACGAAAAATGCTACACTCCACATGTTAAAGGCG 350  
 CATTCAACCAGCTTCTTTATTGGGTAATATACAGCCAGCGGGGGATGAAG 400  
 CTCATTAGCCGCCACTCAAGGCTATACAATGTTGCCAACTCTCCGGGCTT 450  
 TATCCTGTGCTCCCGAATACCACATCGTGATGATGCTTCAGCGCACGGAA 500  
 GTCACAGACACCGCCTGTATAAAAGGGGGACTGTGACCCTGYATGAGGCG 550  
 CAACATGGTETECACAGCAGCTCACCTGAAGAGGCTTGTAAAGATCACCCTC 600  
 TGTGTATTBEACCATGATTGTCCGCATTCTCACCACGCTGGGTACGCTGG 650  
 Met Ile Val Gly Ile Leu Thr Thr Leu Ala Thr Leu  
 ECACACTCCGAGCTAGTGTGCTCTTAGAGGAGCGGCAAGCTTGTCTAAGE 700  
 Ala Thr Leu Ala Ala Ser Val Pro Leu Glu Glu Arg Gln Ala Cys Ser Ser  
 GTCTGGTAATTATGTGAACCTCTCAAGAGACCCAAATACTGAGATATGT 750  
 Val Trp  
 CAAGGGGCCAAATGTGGTGGCCAGAAATGGTCCGGTCCGACTTGCTGTGCT 800  
 Gly Gln Cys Gly Gly Gln Asn Trp Ser Gly Pro Thr Cys Cys Ala  
 TCEGGAAGCACATGCGTCTACTCCAACGACTATTACTCCAGTGTCTTCC 850  
 Ser Gly Ser Thr Cys Val Tyr Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro  
 CCGCGCTGCAAGCTCAAGCTCCCTCCACGCGEGEGEGTCCAGGACTTCTC 900  
 Gly Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Thr Arg Ala Ala Ser Thr Thr Ser  
 GAGTATECCCEACAACATECCGGTCCGAGCTEEGCGACGCCCTCCACCTGGT 950  
 Arg Val Ser Pro Thr Thr Ser Arg Ser Ser Ser Ala Thr Pro Pro Pro Gly

FIG. 2A

TCTACTACTACCAGAGTACCTCCAGTCGGATCGGGAACEGETACGTATTC 1000  
 Ser Thr Thr Thr Arg Val Pro ~~Pro~~ Val Gly Ser Gly Thr Ala Thr Tyr Ser  
AGCCAACCETTTTGTYGGGTCACCTCCTTGGGCCAATGCATATTACGCCCT 1050  
 Gly Asn Pro Phe Val Gly Val Thr Pro Trp Ala Asn Ala Tyr Tyr Ala  
CTGAAGITAGCAGCCTEGETATTECTAGCTTGACTGGAGCEATGGCCACT 1100  
 Ser Gly Val Ser Ser Leu Ala Ile Pro Ser Leu Thr Gly Ala Met Ala Thr  
GCIGCAGCAGCTGTGCGCAAAGGTTCCCTCTTTTATGTGCCTGTAGGTCT 1150  
 Ala Ala Ala Ala Val Ala Lys Val Pro Ser Phe Met Trp Leu  
CCCGCAACCAAGGCAATCTGTTACTGAAGGTCATCATTCACTCCAGAGA 1200  
 Asp  
TACTCTTGACAAGACCCCTCTCATGGAGCAAACCTTGGCCGACATCCGCA 1250  
 Thr Leu Asp Lys Thr Pro Leu Met Glu Gln Thr Leu Ala Asp Ile Arg  
CCGCCAACCAAGAATGGEGGTAACATGCCCGACAGTTTGTGGTGATAGAC 1300  
 Thr Ala Asn Lys Asn Gly Gly Asn Tyr Ala Gly Gln Phe Val Val Ile Asp  
TTGCCGGATCGEGATTGCGCTGCCCTTGECTCGAATGGCGAATACTCTAT 1350  
 Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ala Ala Leu Ala Ser Asn Gly Glu Tyr Ser Ile  
TGCGGATGGTGGCGTCGCCAAATATAAGAACTATATCGACACCATTGGTC 1400  
 Ala Asp Gly Gly Val Ala Lys Tyr Lys Asn Tyr Ile Asp Thr Ile Arg  
AAATTGTCGTGGAATATTCGATATCCGGACCCTCTGGTTATTGGTATG 1450  
 Gln Ile Val Val Glu Tyr Ser Asp Ile Arg Thr Leu Leu Val Ile  
AGTTTAAACACCTGGCTCCCGCCGCCCTTCCCTTCTTTCCCGCCGGCAT 1500  
 CTTGTGCTTGTGCTAACTATTGTTCCCTCTTECAGAGECTGACTETCTTG  
 Glu Pro Asp Ser Leu  
CCAACCTGGTGACCAACCTCGSTACTECAAAGTGTGCCAATGCTCAGTCA 1600  
 Ala Asn Leu Val Thr Asn Leu Gly Thr Pro Lys Lys Ala Asn Ala Gln Ser  
GCCTACCTTGACTGCATEAACTACGCCGTCACACAGETGAACCTTCEAAA 1650  
 Ala Tyr Leu Glu Cys Ile Asn Tyr Ala Val Thr Gln Leu Asn Leu Pro Asn  
TGTTGCGATGTATTTGGACGCTGGCCATGCAGBATGGCTTGGCTGGCCGG 1700  
 Val Ala Met Tyr Leu Asp Ala Gly His Ala Gly Trp Leu Gly Trp Pro

FIG. 2B

CAAACCAAGACECCGGCCGCTCAGCTATTTGCAAATGTTTACAAGAATGCA 1750  
 Ala Asn Gln Asp Pro Ala Ala Gln Leu Phe Ala Asn Val Tyr Lys Asn Ala  
 TCGTCTCCGAGAGCTCTTCGCGGATTGGCAACCAATGTCGCCAACTACAA 1800  
 Ser Ser Pro Arg Ala Leu Arg Gly Leu Ala Thr Asn Val Ala Asn Tyr Asn  
 CGGGTGGAAACATTACCAGCCCCCATCGTACAGGCAAGGCAACGCTGTCT 1850  
 Gly Trp Asn Ile Thr Ser Pro Pro Ser Tyr Thr Gln Gly Asn Ala Val  
 ACAACGAGAAGCTGTACATCCAAGCTATTGGACCTCTTCTTGCCAATCAC 1900  
 Tyr Asn Glu Lys Leu Tyr Ile His Ala Ile Gly Pro Leu Leu Ala Asn His  
 GGCTGGTCCAACGCTTCTTCATCACTGATCAAGGTCGATCGGCAAAGCA 1950  
 Gly Trp Ser Asn Ala Phe Phe Ile Thr Asp Gln Gly Arg Ser Gly Lys Gln  
 GCCTACCGGACAGCAACAGTGGGGAGACTCGTGCAATGTGATCGGCACCG 2000  
 Pro Thr Gly Gln Gln Gln Trp Gly Asp Trp Cys Asn Val Ile Gly Thr  
 GATTGGTATTEGCCCATCCGCAAACACTGGGGACTCGTTGCTGGATTCC 2050  
 Gly Phe Gly Ile Arg Pro Ser Ala Asn Thr Gly Asp Ser Leu Leu Asp Ser  
 TTTGTCTGGGTC AAGCEAGGCGGCGAGTGTGACGGCACCACCGACAGCAG 2100  
 Phe Val Trp Val Lys Pro Gly Gly Glu Cys Asp Gly Thr Ser Asp Ser Ser  
 TGGCCACGATTGTACTECCACTGTGGCTCCAGATGCCCTTGC AACEGG 2150  
 Ala Pro Arg Phe Asp Ser His Cys Ala Leu Pro Asp Ala Leu Gln Pro  
 CGCTCAAGCTGGTGCCTGGTTC AAGCCTACTTTGTGCAGCTTCTCACA 2200  
 Ala Pro Gln Ala Gly Ala Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Val Gln Leu Leu Thr  
 AACGCAAACCCATCGTTCCTGTAAAGCTTTCGTGACCGGGCTTCAAACAA 2250  
 Asn Ala Asn Pro Ser Phe Leu  
 TGATGTGCGATGGTGTGGTTC CCGGTGGEGGAGTCTTTGTCTACTTTGG 2300  
 TTGTCTGTCCGAGGTCCGTAGACEGCAATGAGCAACTGATGGATTGTTG 2350  
 CCACCGATACTATAATTCACATGGATGGTCTTTGCCATCACTACCTAGTG 2400  
 AGAGAGAGAGAAACATCTATCCA CAATGTCGAGTGTCTATTAGACATACTC 2450  
 CGAGAATAAAGTCAACTGTGTCTGTGATCTA AAGATCGATTCCGGCAGTCC 2500  
 AGTAGCGTATAACAACCTCCGAGTACCAGCAAAAGCACGTCGTCAEAGGAC 2550  
 CAGGCTTTGCCAACTCCGCAACCTTGCTTGAATGAGGATAACAEGGGGTGC 2600

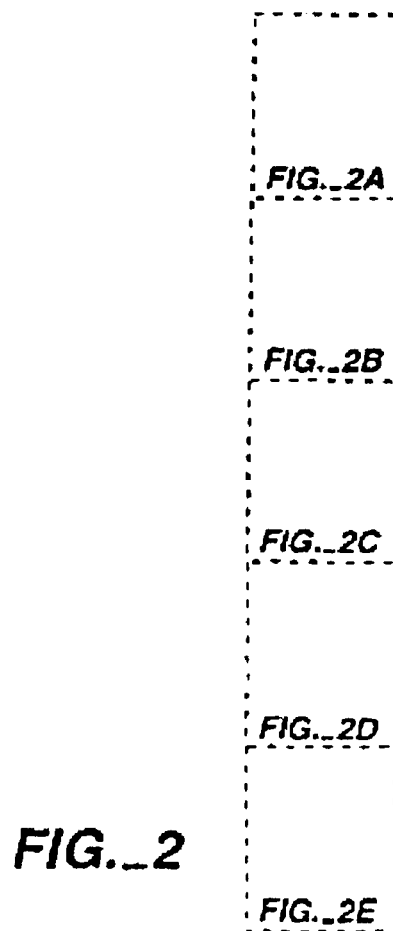
FIG. 2C

AACATGGCTGTAETGATCCATEGCAACCAAAATTTCTGTTTATAGATCAA 2650  
GCTGGTAGATTCCAATTACTCCACCTCTTGGCCTTCTCCATGACATGTAA 2700  
CTGCACGTAGGAAACCATACCCAAATTGCCTACAGCTGCGGAGCATGAGC 2750  
CTATGGCGATCAGTCTGGTEATGTTAACCAGCCTGTGCTCTGACGTTAAT 2800  
CCAGAATAGAAAGCCGGGTGCAATGCAAAATGATGATGCCFTTGCAGAA 2850  
ATGGCTTGGTCCGCTGACTGATACCAGTAACAACCTTGGCTTGGCCGTCTAG 2900  
CGCTGTTGATTGTATTCAACAAECTGCTCCCTCCTTTGGGTTGAGC 2950  
TCTTTCCATGGCTTTCCAAACGTTAATAGCGGTTTTTCTCCACAAAGTA 3000  
TTCGTATGGACCGCTTTTGGCTGTATTGCGTGAGCTACCAGCAGCCCAA 3050  
TTGGGGAAGTCTTGAGCCGCACTCCCATAGAATAATTGATTGCCCATTTG 3100  
ATGCGATTTTTGAGCGGCTGTTTCAGGCGACATTTGCCCGCCTTTATTTG 3150  
CTCCATTATATCATCGATGGCATGTCCAATAGCCCGGTGATAGTCTTGTC 3200  
CAATATGGCTGTCTCGGATAACCCATEGGCAGCAGATGATAATGATTCGG 3250  
CAGCACAAAGCTCGTATGTGGGTAGCAGAAGAACTGAGCGAGATCTTCGAG 3300  
GGCGTAACTCTGCATATCCGATTGGCCCTGCTGCCACATGTCATTTTGCTT 3350  
CGGTTTCTTTTCTGTTGAGTTCCTTGATTTGGGTCAAAGTAACATGGTGT 3400  
ATGACGAGAGACATTGGTGGTAAGAAAAATTTACCTTCCTCTTAGTGCA 3450  
GGACTGACTCTCAAAATCTATATGCAAAATGTGTGCGTAAACACCCCTTGG 3500  
ATGAGCGCTGACCGTACCCTACCATTTGCCCCACTCATGATAGCAGAAG 3550  
ACACATATTAAATTCGGCAATGCTACGAAAGTCTGCAGGCTATGCTTAAAT 3600  
AAACGCTTCCACAGAAAGCCGACAGTTTATTGTTACTACTTACTATACTG 3650  
TATTATTGTTGCTCACTAAGCCGGTGAACCATTTGGTTCACAEAGACGCTT 3700  
GACGAGGTAAATTAECTCTCTGTTAGGGCTGCCAAGGTAGGTCCCAACCC 3750  
GTATCTCGGTCGAGGGTCCGAGCTCTTTGGTCTTCCCTCTTTGGCTAA 3800

FIG. 2D

AGCCCAGTAGCGTGTGTTGAATCAGTTCACAATCTCTCCTAAACACAGTCC 3850  
GACACTAGGTAGGTACGTTGTAATAGCAACTCAAACATGTAATTCGTTTC 3900  
AAGCCAGGAACATTTTATAAACTTCCCTGCGATTTAATCAATAAAGATCC 3950  
TAGTCCAATCGTATACTACCTACCTACCTAAGGTAGGTAGGTAGTTCGTG 4000  
GGAACCTGGTCGCTAATTCACGCAACCCACTTTGGCTTETTCGCCGTGGCC 4050  
GTCGTTGAAGGTAAAGCAGTTGTACCCATCACCTAACTCAACCGACACCG 4100  
TTGATCTGCTCAAGGCAGTTTTC 4123

**FIG.\_2E**



TGTGTTGAAATCCAAC TTATAAAGACAACAACCGCAAAC TTTGTCTTGTG  
 50  
 CCATCAGATTGTTGCCAAGCACCGTCCCCCCCCCTATCTTAGTCCTTCT  
 100  
 TGTGTGCCAAAAATGGCGCCCTCAGTTACACTGCCGTTGACCACGGCCAT  
 150  
 Met Ala Pro Ser Val Thr Leu Pro Leu Thr Thr Ala Ile  
 CCTGGCCATTGCCCGGCTCGTCCGCCGCCAGCAACCGGGTACCAGCACCC  
 200  
 Leu Ala Ile Ala Arg Leu Val Ala Ala Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr  
 CCGAGGTCCATCCCAAGTTGACAACCTACAAGTGTACAAAGTCCGGGGGG  
 250  
 Pro Glu Val His Pro Lys Leu Thr Thr Tyr Lys Cys Thr Lys Ser Gly Gly  
 TCGGTGCCCCAGGACACCTCGGTGGTCTTCACTGGAAC TACCGCTGGAT  
 300  
 Cys Val Ala Gln Asp Thr Ser Val Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Met  
 GCACGACGCCAAACTACAAC TCGTGCACCGTCAACGCCGGCGTCAACACCA  
 350  
 His Asp Ala Asn Tyr Asn Ser Cys Thr Val Asn Gly Gly Val Asn Thr  
 CGCTCTGCCCTGACGAGGGCACTGTGGCAAGAACTGCTTCATCGAGGGC  
 400  
 Thr Leu Cys Pro Asp Glu Ala Thr Cys Gly Lys Asn Cys Phe Ile Glu Gly  
 GTCGACTACGCCGCTCGGGGCTCAGGACCTCGGGCAGCAGCCTEACCAT  
 450  
 Val Asp Tyr Ala Ala Ser Gly Val Thr Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr Met  
 GAACCAGTACATGCCACGAGCTCTGGGGCTACAGCAGCGTCTCTCTCT  
 500  
 Asn Gln Tyr Met Pro Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Val Ser Pro  
 GGCTGTATCTCTCGGACTCTGACGGTGAATACGTGATGCTGAAGCTCAAC  
 550  
 Arg Leu Tyr Leu Leu Asp Ser Asp Gly Glu Tyr Val Met Leu Lys Leu Asn  
 GGCCAGGAGCTGAGCTTCGACGCTCGACCTCTCTCTCTCTGCCGTGTGGAGA  
 600  
 Gly Gln Glu Leu Ser Phe Asp Val Asp Leu Ser Ala Leu Pro Cys Gly Glu  
 GAAEGGCTCGCTCTACCTGTCTCAGATGGACGAGAAEGGGGGCGCCAACC  
 650  
 Asn Gly Ser Leu Tyr Leu Ser Gln Met Asp Glu Asn Gly Gly Ala Asn  
 AGTATAACACGGCCGGTGCCAACTACGGGAGCGGCTACTGCGATGCTCAG  
 700  
 Gln Tyr Asn Thr Ala Gly Ala Asn Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln  
 TGCCCCGTCCAGACATGGAGGAACGGCACCTCAAGACTAGCCACCAGGC  
 750  
 Cys Pro Val Gln Thr Trp Arg Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly  
 CTTCTGCTGCCAACGAGATGGATATCCTGGAGGGCAACTCGAGGGCGAATG  
 800  
 Phe Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Gly Asn Ser Arg Ala Asn

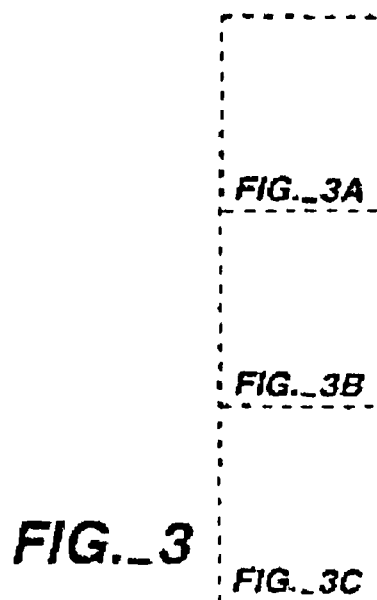
FIG. 3A

CCTTGACCCCTEACTCTTGCACGGCCACGGCCTGGGACTCTGCCGGTTGC 850  
 Ala Leu Thr Pro His Ser Cys Thr Ala Thr Ala Cys Asp Ser Ala Gly Cys  
GGCTTCAACCECTATGGCAGCGGCTACAAAAGGTGAGCCTCATGCCACTA 900  
 Gly Phe Asn Pro Tyr Gly Ser Gly Tyr Lys Ser  
CTACCCCTTTCTCGCGCTCTCGEGGTTTTCCATGCTGACATGGTTTTCC 950  
AGCTACTACGGCCCCGGAGATACCGTTGACACCTCCAAGACETTCCACAT 1000  
 Tyr Tyr Gly Pro Gly Asp Thr Val Asp Thr Ser Lys Thr Phe Thr Ile  
CATCACCCAGTTCAACACGGACAACGGCTCGCCCTCGGGCAACCTTGTGA 1050  
 Ile Thr Gln Phe Asn Thr Asp Asn Gly Ser Pro Ser Gly Asn Leu Val  
GCATCACCCGCAAGTACCAGCAAAACGGCGTCGACATCCCCAGCGCCGAG 1100  
 Ser Ile Thr Arg Lys Tyr Gln Gln Asn Gly Val Asp Ile Pro Ser Ala Gln  
CCCGGGCGGGACACCATCTCGTCTCGCCCGTCCGCTCAGCCTACGGGGG 1150  
 Pro Gly Gly Asp Thr Ile Ser Ser Cys Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Gly Gly  
CCTCGCCACCATCGGCAAGGCCCTGAGCAGGGCATGGTGETCGTGTTC 1200  
 Leu Ala Thr Met Gly Lys Ala Leu Ser Ser Gly Met Val Leu Val Phe  
GCATTTGGAACGACAACAGCCAGTACATGAACTGGCTCGACAGCGGCAAC 1250  
 Ser Ile Trp Asn Asp Asn Ser Gln Tyr Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly Asn  
GCCGGCCCTTGEAGCAGCAECGAGGGCAACCCATCCAACATCCTGGCCAA 1300  
 Ala Gly Pro Cys Ser Ser Thr Glu Gly Asn Pro Ser Asn Ile Leu Ala Asn  
CAACCCCAACACCGCACGTCGTETTTCTCCAACATCCGCTGGGGAGACATTG 1350  
 Asn Pro Asn Thr His Val Val Phe Ser Asn Ile Arg Trp Gly Asp Ile  
GGTCTACTAEGAETCGACTGGCCCGCCCGCCCGCCTGCGTCCAGCACG 1400  
 Gly Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Ser Ser Thr  
ACGTTTTGACTACACECAGGAGCTCGACGACTTCGAGCAGCCCGAGCTG 1450  
 Thr Phe Ser Thr Thr Pro Arg Ser Ser Thr Thr Ser Ser Ser Pro Ser Cys  
CACGCAGACTCACTGGGGGACGTGCGGTGGCATTGGCTACAGCGGGTGA 1500  
 Thr Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Cys  
AGACCTGCACGTEGGGCAGTACGTGCCAGTATAGCAACGACTGTTCGTAT 1550  
 Lys Thr Cys Thr Ser Gly Thr Thr Cys Gln Tyr Ser Asn Asp

FIG. 3B

CCCCATGCCTGACGGCAGTGATTTTGAGATGCTAACCGCTAAAATACAGA 1600  
CTACTCCCAATGCCTTTAGAGCGTTGACTTGCCCTCTGGTCTGTCCAGACG 1650  
Tyr Ser Gln Cys Leu •  
GGGGCACGATAGAATGCGGGCAGGCAGGGA 1680

**FIG.\_3C**



TGCCATTTCTGACCTGGATAGGTTTTCCTATGGTCATTCCTATAAGAGAC  
 \_\_\_\_\_ 50  
 ACCCTCTTTCTGTEGGCCCGTAGATATCAGATTGGTATTCAGTCEACAGA  
 \_\_\_\_\_ 100  
 CGAAGGTGAGTTGATCCTCCAACATGAGTTCTATGAGCCCCCCCCCTTGCC  
 \_\_\_\_\_ 150  
 CCCCCCGTTACCTTGACCTGCAATGAGAATCCCACCTTTTACAAGAGC  
 \_\_\_\_\_ 200  
 ATCAAGAAGTATTAATGGCGGTGAATAGCCTCTGCTCGATAAATATCTCCC  
 \_\_\_\_\_ 250  
 CGTCATCCACAATGAACAAGTCCGTTGGTCCATTGCTGCTTGCAGCGTCC  
 \_\_\_\_\_ 300  
 Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser  
 A T A C T A T A T G G C G G C G C C G T C G C A C A G C A G A C T G T C T G G G G C C A G T G T G G  
 \_\_\_\_\_ 350  
 Ile Leu Tyr Gly Gly Ala Val Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly  
 A G G T A T T G G T T G G A G C G G A C C T A C G A A T T G T G C T C C T G G C T C A G C T T G T T  
 \_\_\_\_\_ 400  
 Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys  
 C G A C C C T C A A T C C T T A T T A T G C G C A A T G T A T T C C G G G A G C C A C T A C T A T C  
 \_\_\_\_\_ 450  
 Ser Thr Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile  
 A C C A C T T C G A C C C G G C C A C C A T C C G G T C C A A C C A C C A C C A C C A G G G C T A C  
 \_\_\_\_\_ 500  
 Thr Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr  
 C T C A A C A A G C T C A T C A A C T C C A C C C A C G A G C T C T G G G G T C C G A T T T G C C G  
 \_\_\_\_\_ 550  
 Ser Thr Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala  
 G C G T T A A C A T C C C G G T T T T G A C T T T G G T G T A C C A C A G A G T G A G T A C C C  
 \_\_\_\_\_ 600  
 Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp  
 T T G T T T C C T G G T G T T G C T G G C T G G T T G G C G G G T A T A C A G C G A A G C G G A C  
 \_\_\_\_\_ 650  
 G C A A G A A C A C C C C G G T C C G C C A C C A T C A A G A T G T G G G T G G T A A G C G G C G  
 \_\_\_\_\_ 700  
 G T G T T T T G T A C A A C T A C C T G A C A G C T C A C T C A G G A A A T G A G A A T T A A T G G  
 \_\_\_\_\_ 750  
 A A G T E T T D T T A C A G T G G C A C T T G C G T T A C C T E G A A G G T T T A T C C T C C G T T  
 \_\_\_\_\_ 800  
 Gly Thr Cys Val Thr Ser Lys Val Tyr Pro Pro Leu  
 G A A G A A C T T C A C C G G C T C A A A C A A C T A C C C C G A T G G C A T C G G C C A G A T G C  
 \_\_\_\_\_ 850  
 Lys Asn Phe Thr Gly Ser Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln Met

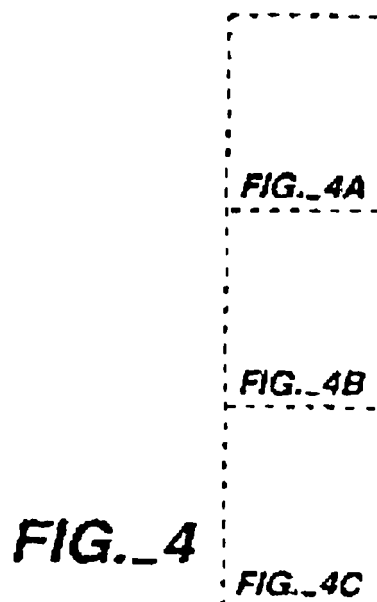
FIG. 4A

AGCACITCGTCAACGAGGACGGGATGAETATTTTCEGCTTACCTGTGGGA 900  
 Gln His Phe Val Asn Glu Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro Val Gly  
TGGCAGTACCTEGTEAACAACAATTGGGGGGCAATCTTGTATCCACGAG 950  
 Trp Gln Tyr Leu Val Asn Asn Asn Leu Gly Gly Asn Leu Asp Ser Thr Ser  
CATTTCCAAGTATGATCAGCTTGTTCAGGGGTGCCTGTCTCTGGGGCGCAT 1000  
 Ile Ser Lys Tyr Asp Gln Leu Val Gln Gly Cys Leu Ser Leu Gly Ala  
ACTGCATCGTCCACATCCACAATTATGCTCGATGGAACGGTGGGATCATT 1050  
 Tyr Cys Ile Val Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile  
GSTCAGGGGGGCCCTACTAATGCTCAATTCACGAGCCTTTGGTGGCAGTT 1100  
 Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu  
GGCATCAAAGTACCGEATCTCAGTCGAGGGTCTGCTTCGGCATCATGAATG 1150  
 Ala Ser Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Arg Val Trp Phe Gly Ile Met Asn  
AGCCCCAGGACGTGAACATCAACACCTGGGCTGCCACGGTCCAAGAGGTT 1200  
 Glu Pro His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val  
GTAACCGCAATCCGCAACGGTGGTGGCTACGTGCGCAATTCATCTETTTGCC 1250  
 Val Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro  
TGGAAATGATTGGCAATCTGCTGGGGCTTTCATATECCGATGGCAGTGCAG 1300  
 Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala  
CCGCCCTGTCTCAAGTCACGAACECCGGATGGGTCAACAACGAATCTGATT 1350  
 Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu Ile  
TTTGACGTGCACAAATACTTGGACTCAGACAACTCCGGTACTCACGCCGA 1400  
 Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His Ala Glu  
ATGTACTACAAATAACATTGACGGCGCCCTTTTCTCCGCTTCCCACTTGGC 1450  
 Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ser Pro Leu Ala Thr Trp  
TECGACAGAACAAATCGCCAGGCTATCCTGACAGAAACCGGTGGTGGCAAC 1500  
 Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Asn  
GFTCAGTCCCTGCATACAACACATGTGCCAGCAAATCCAATATCTCAACCA 1550  
 Val Gln Ser Cys Ile Gln Asp Met Cys Gln Gln Ile Gln Tyr Leu Asn Gln  
GAACTCAGATGTCTATCTTGGCTATGTTGGTTGGGGTCCCGGATCATTTG 1600  
 Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Gly Ala Gly Ser Phe

FIG. 4B

ATAGCACGTATGTCCTGACGGAAACACCGACTAGCAGTGGTAACTCATGG 1650  
Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Ser Ser Gly Asn Ser Trp  
ACGGACACATECTTGGTCAGCTCGTGTCTCGCAAGAAAGTAGCACTCTGA 1700  
Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala Arg Lys  
GCTGAATGCAGAAGCCTCGCCAACGTTTGTATCTCGCTATCAAACATAGT 1750  
AGCTACTCTATGAGGCTGCTGTCTCTCGATTTCAGCTTTATATAGTTTCA 1800  
TCAAACAGTACATATTCCTCTGTGGCCACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1849

**FIG.\_4C**

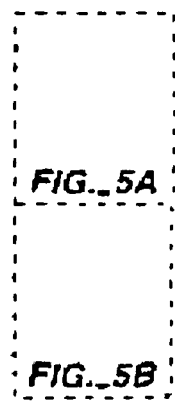


GGGTGGTCTGGATGAAACGTCTTGGCCAAATCGTGATCGATTGATACTCG 50  
CATCTATAAGATGGCACAGATCGACTCTTGATTACAGACATCCGTCAGE 100  
CCTCAAGCCGTTTCCAAGTCCACAAACACAAGCACAAAGCATAGCGTGGCA 150  
ATGAAGTTCCTTCAASTCCTCCCTGCCCTCATACCGGCCGCCCTGGCCCA 200  
Met Lys Phe Leu Gln Val Leu Pro Ala Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ala Gln  
AACCAGCTGTGACCAGTGGGCAACCTTCACTGGCAACGGGTACACAGTCA 250  
Thr Ser Cys Asp Gln Trp Ala Thr Phe Thr Gly Asn Gly Tyr Thr Val  
GCAACAACCTTTGGGGAGCATCAGCCGGCTCTGGATTGGCTGCGTGACG 300  
Ser Asn Asn Leu Trp Gly Ala Ser Ala Gly Ser Gly Phe Gly Lys Val Thr  
GCGGTATCGCTCAGCGGGGGGGGECTCCTGGCAAGCAGACTGGCAGTGGTC 350  
Ala Val Ser Leu Ser Gly Gly Ala Ser Trp His Ala Asp Trp Gln Trp Ser  
CGGCGGCCAGAACAAAGTCAAGTGTACCAGAACTCTCAGATTGCCATTC 400  
Gly Gly Gln Asn Asn Val Lys Ser Tyr Gln Asn Ser Gln Ile Ala Ile  
CCGAGAAGAGGACCGTCAACAGCATCAGCAGCATGCCCACTGCCCAGC 450  
Pro Gln Lys Arg Thr Val Asn Ser Ile Ser Ser Met Pro Thr Thr Ala Ser  
TGGAGCTACAGCGGGAGCAACATCCGCGCTAATGTTGCGTATGACTTGT 500  
Trp Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Ile Arg Ala Asn Val Ala Tyr Asp Leu Phe  
CACCGCAGCCAAACCEGAATCATGTCACGTAETCGGGAGACTACGAACTCA 550  
Thr Ala Ala Asn Pro Asn His Val Thr Tyr Ser Gly Asp Tyr Glu Leu  
TGATCTGGTAAGCCATAAGAAGTGACCCCTTGTAGTTTCGACTAACA 600  
Met Ile Trp

**FIG. 5A**

ACATGTCCTTGAGCCTTGGCAAATACGGCGATATTGGGCCGATTGGGTCCT 650  
 Leu Gly Lys Tyr Gly Asp Ile Gly Pro Ile Gly Ser  
CACAGGGAACAGTCAACGTCGGTGGCCAGAGETGGACGCTCTACTATGGC 700  
 Ser Gln Gly Thr Val Asn Val Gly Gly Gln Ser Trp Thr Leu Tyr Tyr Gly  
TACAACGGAGCCATGCAAGTCTATTCCCTTCTGCCCELAGACCAACACTAC 750  
 Tyr Asn Gly Ala Met Gln Val Tyr Ser Phe Val Ala Gln Thr Asn Thr Thr  
CAACTACAGEGGAGATGTCAAGAACTTCTTCAATTATCTCCGAGACAATA 800  
 Asn Tyr Ser Gly Asp Val Lys Asn Phe Phe Asn Tyr Leu Arg Asp Asn  
AAGGATACAACGCTGCAGGCCAATATGTTCTTAGTAAGTEACCCTCACTG 850  
 Lys Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gln Tyr Val Leu Ser  
TGACTGGCCTGACTTTCTTGCAACGTTTGETAACAAAACCTTCGTATAGG 900  
CTACCAATTTGGTACCGAGCCCTTCAAGGGCAGTGGAACTETGAACGTCC 950  
 Tyr Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gly Thr Leu Asn Val  
CATCCTGGACCGEATCTATCAACTAAAACCTGGAAACGTGAGATGTGGTG 1000  
 Ala Ser Trp Thr Ala Ser Ile Asn \* \* \*  
CGCATAAGTTATTGAGCGAGGGAAAAAAGCATTGGATCCATTGAAGATG 1050

**FIG.\_5B**



**FIG.\_5**

FIG.\_6

FIG.\_6A

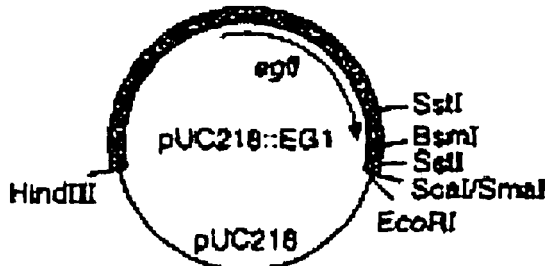


FIG.\_6A

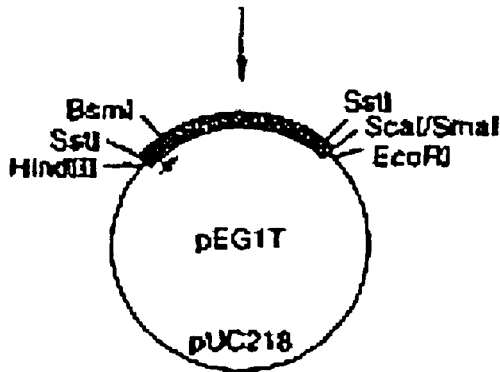
FIG.\_6B

- Digerir con BsmI y EcoRI.
- Aislar el fragmento de 300 pb BsmI/EcoRI.
- Digerir pUC218 con SstI y EcoRI.
- Unir el fragmento pUC218 SstI/EcoRI y BamI/EcoRI con los siguientes oligonucleótidos sintéticos.

(SEQ. ID NO:37)

```

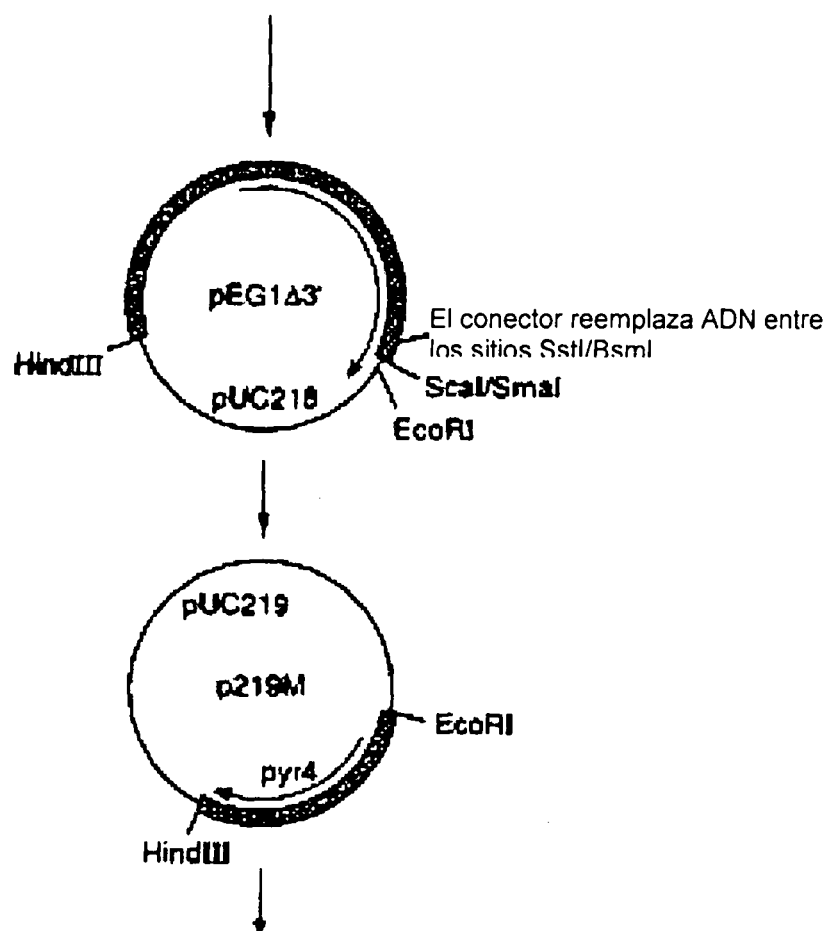
CGTAGAGCGTTGACTTGCCTGTGGTCTGTCCAGACCGGGGACGATAGAATCCG
TCGAGCATCTCCCAACTGAACCGACACCAAGGCTCTGCCCCCTGCTATCTTAC
SstI                                                                 BsmI
    
```



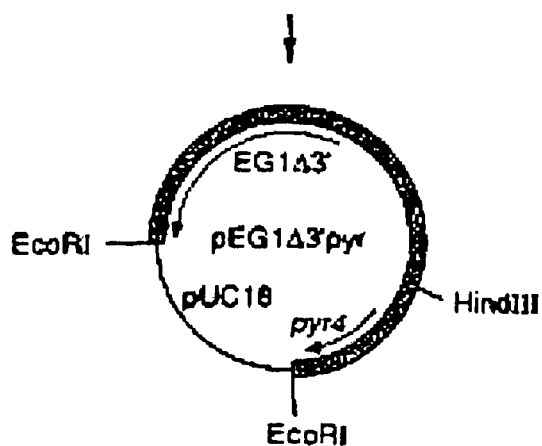
- Digerir pEg1T con HindIII y BsmI y aislar el fragmento del vector.
- Digerir pUC218::EG1 con HindIII y SstI y Aislar el fragmento EG1 de 2.3 kb.
- Unir pEg1T HindIII/BsmI y 2,3 Kb HindIII/SstI con los siguientes oligonucleótidos sintéticos.

```

CGTAGAGCGTTGACTTGCCTGTGGTCTGTCCAGACCGGGGACGATAGAATCCG
TCGAGCATCTCCCAACTGAACCGACACCAAGGCTCTGCCCCCTGCTATCTTAC
SstI                                                                 BsmI
    
```

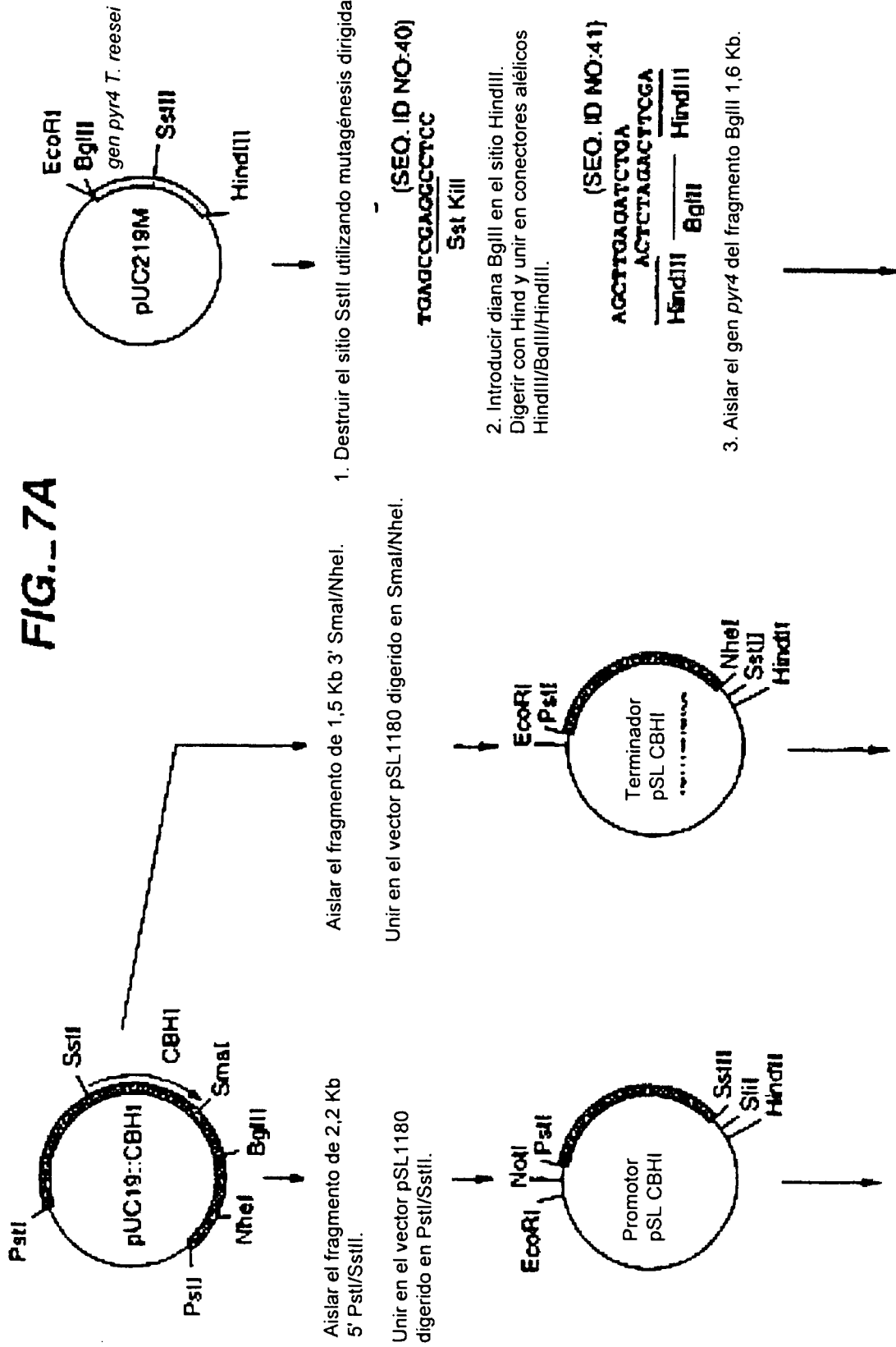


- Digerir p219M con EcoRI y HINDIII.
- Aislar el fragmento génico de 1,6 kb EcoRI/HINDIII *pyr4*.
- Digerir pUC218 con EcoRI SstI y desfosforilar los extremos con fosfatasa alcalina de ternero.
- Aislar el fragmento HindIII/EcoRI EG1 de pEG1Δ3'.
- Unir pUC218/EcoRI, el fragmento génico EcoRI/HINDIII *pyr4* y el fragmento HindIII/EcoRI EG1.



**FIG.\_6B**

**FIG. 7A**



1. Destruir el sitio SstII utilizando mutagénesis dirigida.

Aislar el fragmento de 1,5 Kb 3' SmaI/NheI.

Aislar el fragmento de 2,2 Kb 5' PstI/SstII.

Unir en el vector pSL1180 digerido en SmaI/NheI.

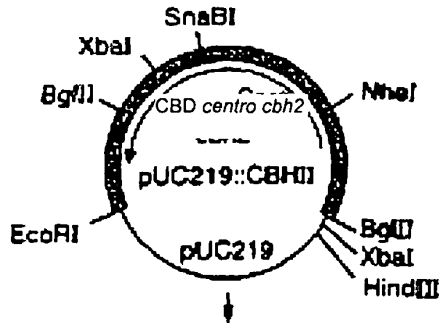
Unir en el vector pSL1180 digerido en PstI/SstII.

2. Introducir diana BglII en el sitio HindIII. Digerir con Hind y unir en conectores alélicos HindIII/BallI/HindIII.

3. Aislar el gen pyr4 del fragmento BglII 1,6 Kb.



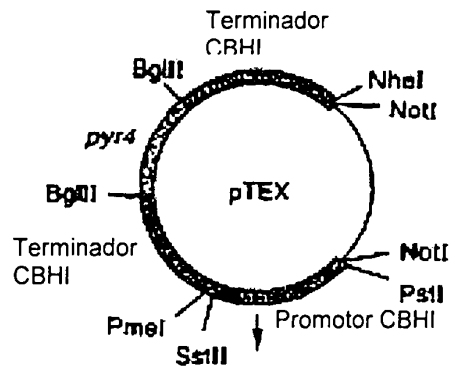
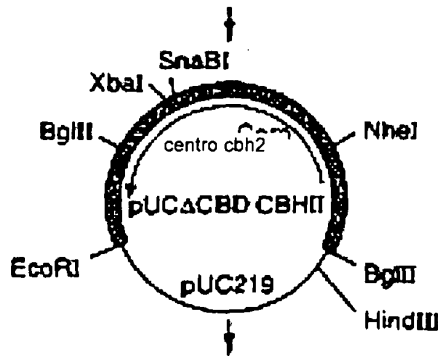




- Digestión parcial con XbaI. Aislar el fragmento del vector lineal. Complementar los extremos con ADN Polimerasa T4 y dNTPs y unir los extremos romos. Esto resultó en la destrucción del sitio complementado.
- Seleccionar un plásmido en el cual se ha destruido el sitio XbaI del policonector.
- Digerir el plásmido con el sitio XbaI destruido con XbaI y SnaBI.
- Aislar el fragmento del vector y unirlo con los siguientes oligonucleótidos sintéticos.  

$$\begin{array}{l} 5' \text{CTA GAG GAG CGG TCG OGA ACC GCT AC } 3' \\ 3' \text{TC CTC GCC AGC CCT TCG CGA TG } 5' \end{array}$$

XbaI SnaBI
- Esto reemplaza efectivamente el CBD con un conector que se une a la señal peptidasa con el punto de escisión de papaína en el dominio del conector de la proteína CBHII.

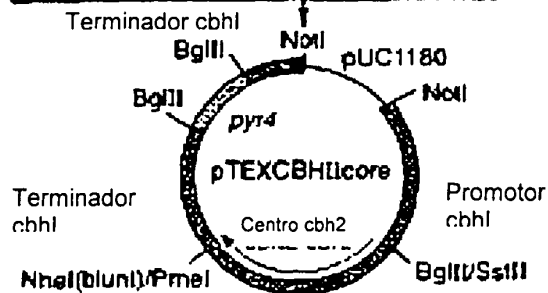


- Digerir pUCΔCBD CBHII con NheI
- Conseguir extremos NheI romos utilizando ADN polimerasa T4 y dNTPs
- Digerir con BglII y aislar el NheI (romo)-fragmento del dominio del centro BglII cbh2

Digerir con SstII y PmeI y aislar el fragmento del vector.

Unir entre ellos con el oligonucleótido CGTAG para unir el extremo BglII con el extremo SstII.

FIG. 9



ABRASIÓN Y REDEPOSICIÓN PROVOCADO POR EGI, EGII Y SUS CENTROS CATALÍTICOS EN APLICACIONES DEL LAVADO A LA PIEDRA

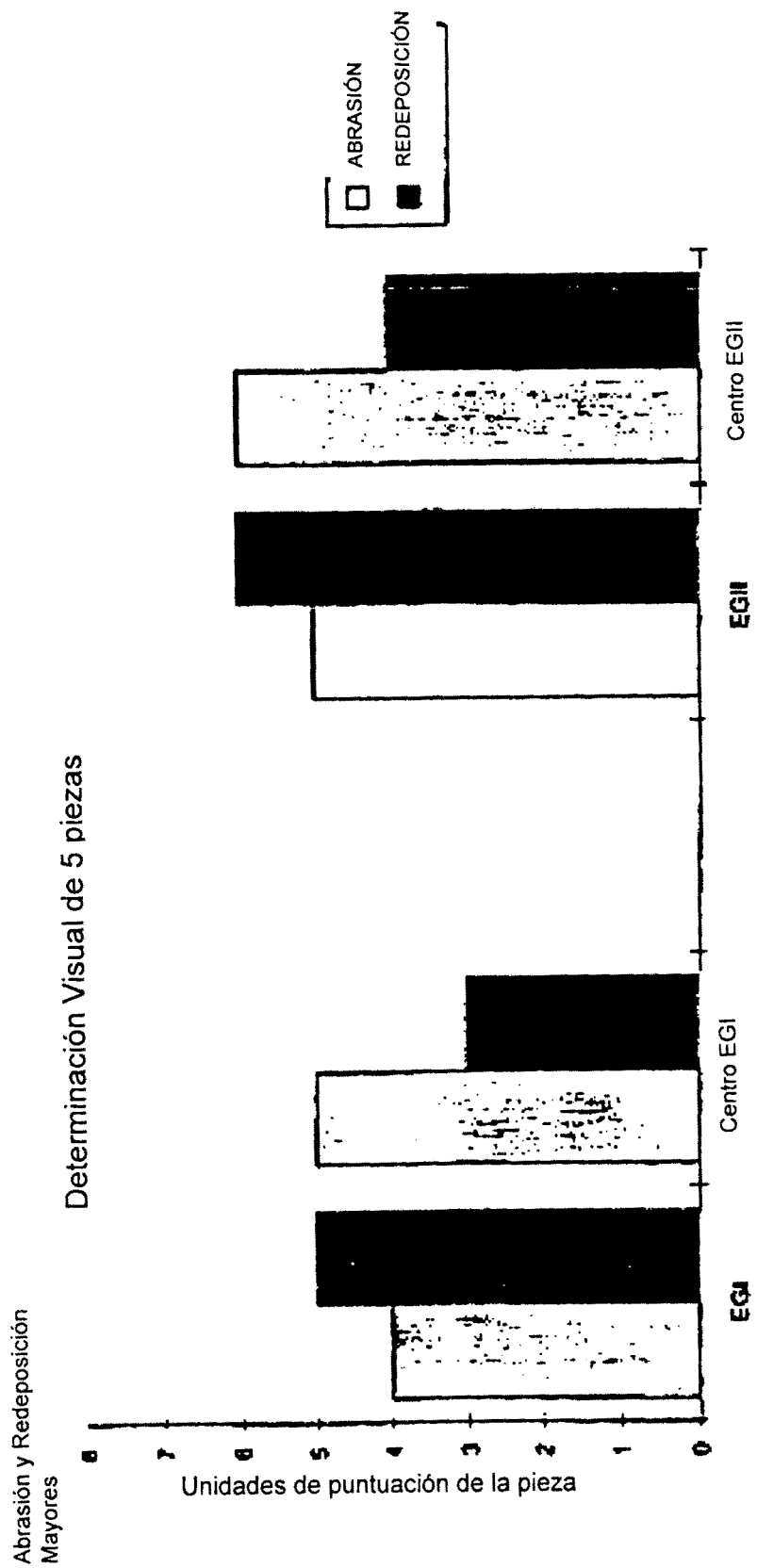


Figura 10

VALORACIÓN VISUAL DE LA ABRASIÓN Y LA REDEPOSICIÓN EN LA ROPA  
TEJANA TRATADA CON CELULASA

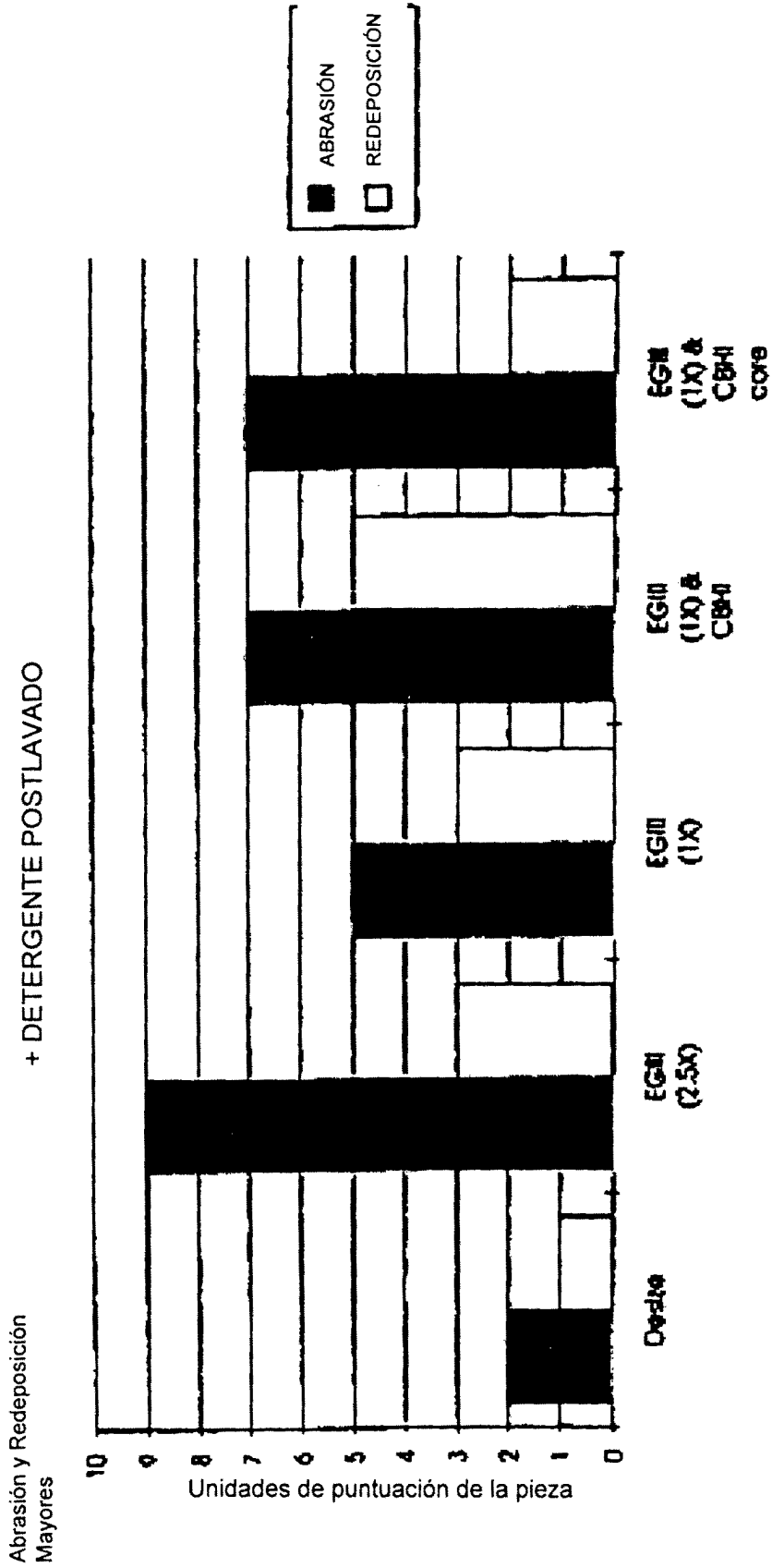


Figura 11

# ES 2 281 078 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: GENENCOR INTERNATIONAL. INC.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Nuevos enzimas celulasa y sistemas para su expresión
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 43
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DIRECCIÓN: Genencor International
  - (B) CALLE: 180 Kimball Way
  - 15 (C) CIUDAD: South San Francisco
  - (D) ESTADO: CA
  - (E) PAÍS: EE.UU.
  - (F) CÓDIGO POSTAL: 94080
- 20 (v) FORMATO LEGIBLE PARA ORDENADOR:
- (A) MEDIO: Disco magnético
  - (B) ORDENADOR: Compatible IBM PC
  - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) PROGRAMA: Patentin Release #1.0, Version #1.25
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
  - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
  - (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (vii) INFORMACIÓN AGENTE/ABOGADO
- (A) NOMBRE: Christopher L. Stone
  - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 36,696
  - 40 (C) NÚMERO DE CASO/EXPEDIENTE: GC226-2.PCT
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- 45 (A) TELÉFONO: (415) 742.7555
  - (B) TELEFAX: (415) 742-7217

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 1

- 50 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 96 pares de bases
  - (B) TIPO: Ácido nucléico
  - (C) CADENA: Única
  - 55 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 60 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
  - (B) LOCALIZACIÓN: 1..96
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 1
- 65

ES 2 281 078 T3

GGC CAG TGC GGC GGT ATT GGC TAC AGC GGC CCC ACG GTC TGC GCC AGC 48  
 Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser  
 1 5 10 15

5

GGC ACA ACT TGC CAG GTC CTG AAC CCT TAC TAC TCT CAG TGC CTG TA 96  
 Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 20 25 30

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 2

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

15

(A) LONGITUD: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 2

25

Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 20 25 30

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 3

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

35

(A) LONGITUD: 166 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucléico

(C) CADENA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: unir (1..20. 70..166)

45

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 3

50

CAA GCT TGC TCA AGC GTC TG GTAATTATGT GAACCCTCTC AAGAGACCCA 50  
 Gln Ala Cys Ser Ser Val Trp  
 1 5

55

AATACTGAGA TATGTCAAG G GGC CAA TGT GGT GGC CAG AAT TGG TCG GGT 100  
 Gly Gln Cys Gly Gly Gln Asn Trp Ser Gly  
 10 15

60

CCG ACT TGC TGT GCT TCC GGA AGC ACA TGC GTC TAC TCC AAC GAC TAT 148  
 Pro Thr Cys Cys Ala Ser Gly Ser Thr Cys Val Tyr Ser Asn Asp Tyr  
 20 25 30

65

TAC TCC CAG TGT CTT CCC 166  
 Tyr Ser Gln Cys Leu Pro  
 35



## ES 2 281 078 T3

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 6

5  
 His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Cys Lys Thr Cys  
 1 5 10 15  
 10 Thr Ser Gly Thr Thr Cys Gln Tyr Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys  
 20 25 30  
 Leu

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 7

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 108 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucléico

(C) CADENA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: (1..108)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 7

**CAG CAG ACT GTC TGG GGC CAG TGT GGA GGT ATT GGT TGG AGC GGA CCT 48**  
**Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro**  
 1 5 10 15

**ACG AAT TGT GCT CCT GGC TCA GCT TGT TCG ACC CTC AAT CCT TAT TAT 96**  
**Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr Leu Asn Pro Tyr Tyr**  
 20 25 30

**GCG CAA TGT ATT 108**  
**Ala Gln Cys Ile**  
 35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 8

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 8

50  
 Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro  
 1 5 10 15  
 60 Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr Leu Asn Pro Tyr Tyr  
 20 25 30  
 65 Ala Gln Cys Ile  
 35

## ES 2 281 078 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 9

#### (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1453 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

#### (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: (1..410, 478..1174, 1238..1453)

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 9

**CAG TCG GCC TGC ACT CTC CAA TCG GAG ACT CAC CCG CCT CTG ACA TGG      48**  
Gln Ser Ala Cys Thr Leu Gln Ser Glu Thr His Pro Pro Leu Thr Trp  
1            5            10            15

**CAG AAA TGC TCG TCT GGT GGC ACT TGC ACT CAA CAG ACA GGC TCC GTG      96**  
Gln Lys Cys Ser Ser Gly Gly Thr Cys Thr Gln Gln Thr Gly Ser Val  
20            25            30

**GTC ATC GAC GCC AAC TGG CGC TGG ACT CAC GCT ACG AAC AGC AGC ACG      144**

ES 2 281 078 T3

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Thr His Ala Thr Asn Ser Ser Thr  
 35 40 45

5 AAC TGC TAC GAT GGC AAC ACT TGG AGC TCG ACC CTA TGT CCT GAC AAC 192  
 Asn Cys Tyr Asp Gly Asn Thr Trp Ser Ser Thr Leu Cys Pro Asp Asn  
 50 55 60

10 GAG ACC TGC GCG AAG AAC TGC TGT CTG GAC GGT GCC GCC TAC GCG TCC 241  
 Glu Thr Cys Ala Lys Asn Cys Cys Leu Asp Gly Ala Ala Tyr Ala Ser  
 65 70 75 80

15 ACG TAC GGA GTT ACC ACG AGC GGT AAC AGC CTC TCC ATT GGC TTT GTC 288  
 Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ser Leu Ser Ile Gly Phe Val  
 85 90 95

20 ACC CAG TCT GCG CAG AAG AAC GTT GGC GCT CGC CTT TAC CTT ATG GCG 336  
 Thr Gln Ser Ala Gln Lys Asn Val Gly Ala Arg Leu Tyr Leu Met Ala  
 100 105 110

25 AGC GAC ACG ACC TAC CAG GAA TTC ACC CTG CTT GGC AAC GAG TTC TCT 384  
 Ser Asp Thr Thr Tyr Gln Glu Phe Thr Leu Leu Gly Asn Glu Phe Ser  
 115 120 125

30 TTC GAT GTT GAT GTT TCG CAG CTG CC GTAAGTGACT TACCATGAAC 430  
 Phe Asp Val Asp Val Ser Gln Leu Pro  
 130 135

35 CCCTGACGTA TCTTCTTG TG GGC TCC CAG C TGACTGGCCA ATTTAAG G TGC GGC  
 484  
 Cys Gly

40 TTG AAC GGA GCT CTC TAC TTC GTG TCC ATG GAC GCG GAT GGT GGC GTG 532  
 Leu Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ser Met Asp Ala Asp Gly Gly Val  
 140 145 150 155

45 AGC AAG TAT CCC ACC AAC ACC GCT GGC GCC AAG TAC GGC ACG GGG TAC 580  
 Ser Lys Tyr Pro Thr Asn Thr Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr  
 160 165 170

50 TGT GAC AGC CAG TGT CCC CGC GAT CTG AAG TTC ATC AAT GGC CAG GCC 628  
 Cys Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala  
 175 180 185

55 AAC GTT GAG GGC TGG GAG CCG TCA TCC AAC AAC GCA AAC ACG GGC ATT 676  
 Asn Val Glu Gly Trp Glu Pro Ser Ser Asn Asn Ala Asn Thr Gly Ile  
 190 195 200

60 GGA GGA CAC GGA AGC TGC TGC TCT GAG ATG GAT ATC TGG GAG GCC AAC 724  
 Gly Gly His Gly Ser Cys Cys Ser Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn  
 205 210 215

65 TCC ATC TCC GAG GCT CTT ACC CCC CAC CCT TGC ACG ACT GTC GGC CAG 772  
 Ser Ile Ser Glu Ala Leu Thr Pro His Pro Cys Thr Thr Val Gly Gln  
 220 225 230 235

ES 2 281 078 T3

5 GAG ATC TGC GAG GGT GAT GGG TGC GGC GGA ACT TAC TCC GAT AAC AGA 820  
 Glu Ile Cys Glu Gly Asp Gly Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Asp Asn Arg  
 240 245 250

10 TAT GGC GGC ACT TGC GAT CCC GAT GGC TGC GAC TGG AAC CCA TAC CGC 868  
 Tyr Gly Gly Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Trp Asn Pro Tyr Arg  
 255 260 265

15 CTG GGC AAC ACC AGC TTC TAC GGC CCT GGC TCA AGC TTT ACC CTC GAT 916  
 Leu Gly Asn Thr Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Phe Thr Leu Asp  
 270 275 280

20 ACC ACC AAG AAA TTG ACC GTT GTC ACC CAG TTC GAG ACG TCG GGT GCC 964  
 Thr Thr Lys Lys Leu Thr Val Val Thr Gln Phe Glu Thr Ser Gly Ala  
 285 290 295

25 ATC AAC CGA TAC TAT GTC CAG AAT GGC GTC ACT TTC CAG CAG CCC AAC 1012  
 Ile Asn Arg Tyr Tyr Val Gln Asn Gly Val Thr Phe Gln Gln Pro Asn  
 300 305 310 315

30 GCC GAG CTT GGT AGT TAC TCT GGC AAC GAG CTC AAC GAT GAT TAC TGC 1060  
 Ala Glu Leu Gly Ser Tyr Ser Gly Asn Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Cys  
 320 325 330

35 ACA GCT GAG GAG GCA GAA TTC GGC GGA TCC TCT TTC TCA GAC AAG GGC 1108  
 Thr Ala Glu Glu Ala Glu Phe Gly Gly Ser Ser Phe Ser Asp Lys Gly  
 335 340 345

40 GGC CTG ACT CAG TTC AAG AAG GCT ACC TCT GGC GGC ATG GTT CTG GTC 1156  
 Gly Leu Thr Gln Phe Lys Lys Ala Thr Ser Gly Gly Met Val Leu Val  
 350 355 360

45 ATG AGT CTG TGG GAT GAT GTGAGTTTGA TGGACAAACA TGCGCGTTGA 1204  
 Met Ser Leu Trp Asp Asp  
 365

50 CAAAGAGTCA AGCAGCTGAC TGAGATGTTA CAG TAC TAC GCC AAC ATG CTG TGG 1258  
 Tyr Tyr Ala Asn Met Leu Trp  
 370 375

55 CTG GAC TCC ACC TAC CCG ACA AAC GAG ACC TCC TCC ACA CCC GGT GCC 1305  
 Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Glu Thr Ser Ser Thr Pro Gly Ala  
 380 385 390

60 GTG CGC GGA AGC TGC TCC ACC AGC TCC GGT GTC CCT GCT CAG GTC GAA 1354  
 Val Arg Gly Ser Cys Ser Thr Ser Ser Gly Val Pro Ala Gln Val Glu  
 395 400 405

65 TCT CAG TCT CCC AAC GCC AAG GTC ACC TTC TCC AAC ATC AAG TTC GGA 1402  
 Ser Gln Ser Pro Asn Ala Lys Val Thr Phe Ser Asn Ile Lys Phe Gly  
 410 415 420

70 CCC ATT GGC AGC ACC GGC AAC CCT AGC GGC GGC AAC CCT CCC GGC GGA 1450



ES 2 281 078 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55

Glu Pro Ser Ser Asn Asn Ala Asn Thr Gly Ile Gly Gly His Gly Ser  
 195 200 205

Cys Cys Ser Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Glu Ala  
 210 215 220

Leu Thr Pro His Pro Cys Thr Thr Val Gly Gln Glu Ile Cys Glu Gly  
 225 230 235 240

Asp Gly Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Asp Asn Arg Tyr Gly Gly Thr Cys  
 245 250 255

Asp Pro Asp Gly Cys Asp Trp Asn Pro Tyr Arg Leu Gly Asn Thr Ser  
 260 265 270

Phe Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Phe Thr Leu Asp Thr Thr Lys Lys Leu  
 275 280 285

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

Val Gln Asn Gly Val Thr Phe Gln Gln Pro Asn Ala Glu Leu Gly Ser  
 305 310 315 320

Tyr Ser Gly Asn Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Cys Thr Ala Glu Glu Ala  
 325 330 335

Glu Phe Gly Gly Ser Ser Phe Ser Asp Lys Gly Gly Leu Thr Gln Phe  
 340 345 350

Lys Lys Ala Thr Ser Gly Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp  
 355 360 365

Asp Thr Thr Pro Thr Cys Cys Gly Trp Thr Pro Pro Thr Arg Gln Thr  
 370 375 380

Arg Pro Pro Pro His Pro Val Pro Cys Ala Glu Ala Ala Pro Pro Ala  
 385 390 395 400

Pro Val Ser Leu Leu Arg Ser Asn Leu Ser Leu Pro Thr Pro Arg Ser  
 405 410 415

Pro Ser Pro Thr Ser Ser Ser Asp Pro Leu Ala Ala Pro Ala Thr Leu  
 420 425 430

Ala Ala Ala Thr Leu Pro Ala Glu  
 435 440

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 11

- 60 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1244 pares de bases
  - (B) TIPO: Ácido nucléico
  - 65 (C) CADENA: Única
  - (D) TOPOLOGÍA: Lineal

## ES 2 281 078 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: unir (1..161, 218..465, 556..1244)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11

10	<p><b>TCG GGA ACC GCT ACG TAT TCA GGC AAC CCT TTT GTT GGG GTC ACT CCT</b>      <b>48</b></p> <p>Ser Gly Thr Ala Thr Tyr Ser Gly Asn Pro Phe Val Gly Val Thr Pro</p> <p style="margin-left: 10px;">1                    5                    10                    15</p>
15	<p><b>TGG GCC AAT GCA TAT TAC GCC TCT GAA GTT AGC AGC CTC GCT ATT CCT</b>      <b>96</b></p> <p>Trp Ala Asn Ala Tyr Tyr Ala Ser Glu Val Ser Ser Leu Ala Ile Pro</p> <p style="margin-left: 10px;">20                    25                    30</p>
20	<p><b>AGC TTG ACT GGA GCC ATG GCC ACT GCT GCA GCA GCT GTC GCA AAG GTT</b>      <b>144</b></p> <p>Ser Leu Thr Gly Ala Met Ala Thr Ala Ala Ala Val Ala Lys Val</p> <p style="margin-left: 10px;">35                    40                    45</p>
25	<p><b>CCC TCT TTT ATG TGG CT GTAGGTCCTC CCGGAACCAA GGCAATCTGT</b>      <b>191</b></p> <p>Pro Ser Phe Met Trp Leu</p> <p style="margin-left: 10px;">50</p>
30	<p><b>TACTGAAGGC TCATCATTCA CTGCAG A GAT ACT CTT GAC AAG ACC CCT CTC</b>      <b>242</b></p> <p style="margin-left: 10px;">Asp Thr Leu Asp Lys Thr Pro Leu</p> <p style="margin-left: 10px;">55                    60</p>
35	<p><b>ATG GAG CAA ACC TTG GCC GAC ATC CGC ACC GCC AAC AAG AAT GGC GGT</b>      <b>290</b></p> <p>Met Glu Gln Thr Leu Ala Asp Ile Arg Thr Ala Asn Lys Asn Gly Gly</p> <p style="margin-left: 10px;">65                    70                    75</p>
40	<p><b>AAC TAT GCC GGA CAG TTT GTG GTG ATA GAC TTG CCG GAT CGC GAT TGC</b>      <b>338</b></p> <p>Asn Tyr Ala Gly Gln Phe Val Val Ile Asp Leu Pro Asp Arg Asp Cys</p> <p style="margin-left: 10px;">80                    85                    90</p>
45	<p><b>GCT GCC CTT GCC TCG AAT GGC GAA TAC TCT ATT GCC GAT GGT GGC GTC</b>      <b>386</b></p> <p>Ala Ala Leu Ala Ser Asn Gly Glu Tyr Ser Ile Ala Asp Gly Gly Val</p> <p style="margin-left: 10px;">95                    100                    105                    110</p>
50	<p><b>GCC AAA TAT AAG AAC TAT ATC GAC ACC ATT CGT CAA ATT GTC GTG GAA</b>      <b>434</b></p> <p>Ala Lys Tyr Lys Asn Tyr Ile Asp Thr Ile Arg Gln Ile Val Val Glu</p> <p style="margin-left: 10px;">115                    120                    125</p>
55	<p><b>TAT TCC GAT ATC CGG ACC CTC CTG GTT ATT G GTATGAGTTT AAACACCTGC</b>      <b>485</b></p> <p>Tyr Ser Asp Ile Arg Thr Leu Leu Val Ile</p> <p style="margin-left: 10px;">130                    135</p>
60	<p><b>CTCCCCCCCC CCTTCCCTTC CTTTCCCGCC GGCATCTTGT CGTTGTGCTA ACTATTGTTT</b>      <b>545</b></p>
65	<p><b>CCTCTTCCAG AG CCT GAC TCT CTT GCC AAC CTG GTG ACC AAC CTC GGT</b>      <b>593</b></p> <p>Glu Pro Asp Ser Leu Ala Asn Leu Val Thr Asn Leu Gly</p> <p style="margin-left: 10px;">140                    145</p>

ES 2 281 078 T3

ACT CCA AAG TGT GCC AAT GCT CAG TCA GCC TAC CTT GAG TGC ATC AAC 641  
 Thr Pro Lys Cys Ala Asn Ala Gln Ser Ala Tyr Leu Glu Cys Ile Asn  
 150 155 160 165

TAC GCC GTC ACA CAG CTG AAC CTT CCA AAT GTT GCG ATG TAT TTG GAC 689  
 Tyr Ala Val Thr Gln Leu Asn Leu Pro Asn Val Ala Met Tyr Leu Asp  
 170 175 180

GCT GGC CAT GCA GGA TGG CTT GGC TGG CCG GCA AAC CAA GAC CCG GCC 737  
 Ala Gly His Ala Gly Trp Leu Gly Trp Pro Ala Asn Gln Asp Pro Ala  
 185 190 195

GCT CAG CTA TTT GCA AAT GTT TAC AAG AAT GCA TCG TCT CCG AGA GCT 785  
 Ala Gln Leu Phe Ala Asn Val Tyr Lys Asn Ala Ser Ser Pro Arg Ala  
 200 205 210

CTT CGC GGA TTG GCA ACC AAT GTC GCC AAC TAC AAC GGG TGG AAC ATT 833  
 Leu Arg Gly Leu Ala Thr Asn Val Ala Asn Tyr Asn Gly Trp Asn Ile  
 215 220 225

ACC AGC CCC CCA TCG TAC ACG CAA GGC AAC GCT GTC TAC AAC GAG AAG 881  
 Thr Ser Pro Pro Ser Tyr Thr Gln Gly Asn Ala Val Tyr Asn Glu Lys  
 230 235 240 245

CTG TAC ATC CAC GCT ATT GGA CCT CTT CTT GCC AAT CAC GGC TGG TCC 929  
 Leu Tyr Ile His Ala Ile Gly Pro Leu Leu Ala Asn His Gly Trp Ser  
 250 255 260

AAC GCC TTC TTC ATC ACT GAT CAA GGT CGA TCG GGA AAG CAG CCT ACC 977  
 Asn Ala Phe Phe Ile Thr Asp Gln Gly Arg Ser Gly Lys Gln Pro Thr  
 265 270 275

GGA CAG CAA CAG TGG GGA GAC TGG TGC AAT GTG ATC GGC ACC GGA TTT 1025  
 Gly Gln Gln Gln Trp Gly Asp Trp Cys Asn Val Ile Gly Thr Gly Phe  
 280 285 290

GGT ATT CGC CCA TCC GCA AAC ACT GGG GAC TCG TTG CTG GAT TCG TTT 1073  
 Gly Ile Arg Pro Ser Ala Asn Thr Gly Asp Ser Leu Leu Asp Ser Phe  
 295 300 305

GTC TGG GTC AAG CCA GGC GGC GAG TGT GAC GGC ACC AGC GAC AGC AGT 1121  
 Val Trp Val Lys Pro Gly Gly Glu Cys Asp Gly Thr Ser Asp Ser Ser  
 310 315 320 325

GCG CCA CGA TTT GAC TCC CAC TGT GCG CTC CCA GAT GCC TTG CAA CCG 1169  
 Ala Pro Arg Phe Asp Ser His Cys Ala Leu Pro Asp Ala Leu Gln Pro  
 330 335 340

GCG CCT CAA GCT GGT GCT TGG TTC CAA GCC TAC TTT GTG CAG CTT CTC 1217  
 Ala Pro Gln Ala Gly Ala Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Val Gln Leu Leu  
 345 350 355

ACA AAC GCA AAC CCA TCG TTC CTG TA 1244  
 Thr Asn Ala Asn Pro Ser Phe Leu

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 12

- 65 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 365 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido

ES 2 281 078 T3

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 12

5

**Ser Gly Thr Ala Thr Tyr Ser Gly Asn Pro Phe Val Gly Val Thr Pro**  
**1 5 10 15**

10

**Trp Ala Asn Ala Tyr Tyr Ala Ser Glu Val Ser Ser Leu Ala Ile Pro**  
**20 25 30**

15

**Ser Leu Thr Gly Ala Met Ala Thr Ala Ala Ala Val Ala Lys Val**  
**35 40 45**

20

**Pro Ser Phe Met Trp Leu Asp Thr Leu Asp Lys Thr Pro Leu Met Glu**  
**50 55 60**

25

**Gln Thr Leu Ala Asp Ile Arg Thr Ala Asn Lys Asn Gly Gly Asn Tyr**  
**65 70 75 80**

30

**Ala Gly Gln Phe Val Val Ile Asp Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ala Ala**  
**85 90 95**

35

**Leu Ala Ser Asn Gly Glu Tyr Ser Ile Ala Asp Gly Gly Val Ala Lys**  
**100 105 110**

40

**Tyr Lys Asn Tyr Ile Asp Thr Ile Arg Gln Ile Val Val Glu Tyr Ser**  
**115 120 125**

45

**Asp Ile Arg Thr Leu Leu Val Ile Glu Pro Asp Ser Leu Ala Asn Leu**  
**130 135 140**

50

**Val Thr Asn Leu Gly Thr Pro Lys Cys Ala Asn Ala Gln Ser Ala Tyr**  
**145 150 155 160**

55

**Leu Glu Cys Ile Asn Tyr Ala Val Thr Gln Leu Asn Leu Pro Asn Val**  
**165 170 175**

60

**Ala Met Tyr Leu Asp Ala Gly His Ala Gly Trp Leu Gly Trp Pro Ala**  
**180 185 190**

65

**Asn Gln Asp Pro Ala Ala Gln Leu Phe Ala Asn Val Tyr Lys Asn Ala**  
**195 200 205**

**Ser Ser Pro Arg Ala Leu Arg Gly Leu Ala Thr Asn Val Ala Asn Tyr**  
**210 215 220**

ES 2 281 078 T3

Asn Gly Trp Asn Ile Thr Ser Pro Pro Ser Tyr Thr Gln Gly Asn Ala  
225 230 235 240

Val Tyr Asn Glu Lys Leu Tyr Ile His Ala Ile Gly Pro Leu Leu Ala  
245 250 255

Asn His Gly Trp Ser Asn Ala Phe Phe Ile Thr Asp Gln Gly Arg Ser  
260 265 270

Gly Lys Gln Pro Thr Gly Gln Gln Gln Trp Gly Asp Trp Cys Asn Val  
275 280 285

Ile Gly Thr Gly Phe Gly Ile Arg Pro Ser Ala Asn Thr Gly Asp Ser  
290 295 300

Leu Leu Asp Ser Phe Val Trp Val Lys Pro Gly Gly Glu Cys Asp Gly  
305 310 315 320

Thr Ser Asp Ser Ser Ala Pro Arg Phe Asp Ser His Cys Ala Leu Pro  
325 330 335

Asp Ala Leu Gln Pro Ala Pro Gln Ala Gly Ala Trp Phe Gln Ala Tyr  
340 345 350

Phe Val Gln Leu Leu Thr Asn Ala Asn Pro Ser Phe Leu  
355 360 365

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 13

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1201 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucléico
- (C) CADENA: Única
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: unir (1..704, 775..1201)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 13

CAG CAA CCG GGT ACC AGC ACC CCC GAG GTC CAT CCC AAG TTG ACA ACC 48  
Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Thr Thr  
1 5 10 15

TAC AAG TGT ACA AAG TCC GGG GGG TGC GTG GCC CAG GAC ACC TCG GTG 96  
Tyr Lys Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val Ala Gln Asp Thr Ser Val  
20 25 30

GTC CTT GAC TGG AAC TAC CGC TGG ATG CAC GAC GCA AAC TAC AAC TCG 144  
Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Met His Asp Ala Asn Tyr Asn Ser

ES 2 281 078 T3

35            40            45  
 5    TGC ACC GTC AAC GGC GGC GTC AAC ACC ACG CTC TGC CCT GAC GAG GCG    192  
      Cys Thr Val Asn Gly Gly Val Asn Thr Thr Leu Cys Pro Asp Glu Ala  
      50            55            60  
 10    ACC TGT GGC AAG AAC TGC TTC ATC GAG GGC GTC GAC TAC GCC GCC TCG    240  
      Thr Cys Gly Lys Asn Cys Phe Ile Glu Gly Val Asp Tyr Ala Ala Ser  
      65            70            75            80  
 15    GGC GTC ACG ACC TCG GGC AGC AGC CTC ACC ATG AAC CAG TAC ATG CCC    288  
      Gly Val Thr Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr Met Asn Gln Tyr Met Pro  
      85            90            95  
 20    AGC AGC TCT GGC GGC TAC AGC AGC GTC TCT CCT CGG CTG TAT CTC CTG    336  
      Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Val Ser Pro Arg Leu Tyr Leu Leu  
      100            105            110  
 25    GAC TCT GAC GGT GAG TAC GTG ATG CTG AAG CTC AAC GGC CAG GAG CTG    384  
      Asp Ser Asp Gly Glu Tyr Val Met Leu Lys Leu Asn Gly Gln Glu Leu  
      115            120            125  
 30    AGC TTC GAC GTC GAC CTC TCT GCT CTG CCG TGT GGA GAG AAC GGC TCG    432  
      Ser Phe Asp Val Asp Leu Ser Ala Leu Pro Cys Gly Glu Asn Gly Ser  
      130            135            140  
 35    CTC TAC CTG TCT CAG ATG GAC GAG AAC GGG GGC GCC AAC CAG TAT AAC    480  
      Leu Tyr Leu Ser Gln Met Asp Glu Asn Gly Gly Ala Asn Gln Tyr Asn  
      145            150            155            160  
 40    ACG GCC GGT GCC AAC TAC GGG AGC GGC TAC TGC GAT GCT CAG TGC CCC    528  
      Thr Ala Gly Ala Asn Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Pro  
      165            170            175  
 45    GTC CAG ACA TGG AGG AAC GGC ACC CTC AAC ACT AGC CAC CAG GGC TTC    576  
      Val Gln Thr Trp Arg Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly Phe  
      180            185            190  
 50    TGC TGC AAC GAG ATG GAT ATC CTG GAG GGC AAC TCG AGG GCG AAT GCC    624  
      Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Gly Asn Ser Arg Ala Asn Ala  
      195            200            205  
 55    TTG ACC CCT CAC TCT TGC ACG GCC ACG GCC TGC GAC TCT GCC GGT TGC    672  
      Leu Thr Pro His Ser Cys Thr Ala Thr Ala Cys Asp Ser Ala Gly Cys  
      210            215            220  
 60    GGC TTC AAC CCC TAT GGC AGC GGC TAC AAA AG GTGAGCCTGA            714  
      Gly Phe Asn Pro Tyr Gly Ser Gly Tyr Lys Ser  
      225            230            235  
 65    TGCCACTACT ACCCCTTCC TGGCGCTCTC GCGGTTTTCC ATGCTGACAT  
      GGTTCCTCAG    774  
 70    C TAC TAC GGC CCC GGA GAT ACC GTT GAC ACC TCC AAG ACC TTC ACC    820  
      Tyr Tyr Gly Pro Gly Asp Thr Val Asp Thr Ser Lys Thr Phe Thr

ES 2 281 078 T3

	240	245	250	
5	ATC ATC ACC CAG TTC AAC ACG GAC AAC GGC TCG CCC TCG GGC AAC CTT			868
	Ile Ile Thr Gln Phe Asn Thr Asp Asn Gly Ser Pro Ser Gly Asn Leu			
	255	260	265	
10	GTG AGC ATC ACC CGC AAG TAC CAG CAA AAC GGC GTC GAC ATC CCC AGC			916
	Val Ser Ile Thr Arg Lys Tyr Gln Gln Asn Gly Val Asp Ile Pro Ser			
	270	275	280	
15	GCC CAG CCC GGC GGC GAC ACC ATC TCG TCC TGC CCG TCC GCC TCA GCC			964
	Ala Gln Pro Gly Gly Asp Thr Ile Ser Ser Cys Pro Ser Ala Ser Ala			
	285	290	295	
20	TAC GGC GGC CTC GCC ACC ATG GGC AAG GCC CTG AGC AGC GGC ATG GTG			1012
	Tyr Gly Gly Leu Ala Thr Met Gly Lys Ala Leu Ser Ser Gly Met Val			
	300	305	310	
25	CTC GTG TTC AGC ATT TGG AAC GAC AAC AGC CAG TAC ATG AAC TGG CTC			1060
	Leu Val Phe Ser Ile Trp Asn Asp Asn Ser Gln Tyr Met Asn Trp Leu			
	315	320	325	330
30	GAC AGC GGC AAC GCC GGC CCC TGC AGC AGC ACC GAG GGC AAC CCA TCC			1108
	Asp Ser Gly Asn Ala Gly Pro Cys Ser Ser Thr Glu Gly Asn Pro Ser			
	335	340	345	
35	AAC ATC CTG GCC AAC AAC CCC AAC ACG CAC GTC GTC TTC TCC AAC ATC			1156
	Asn Ile Leu Ala Asn Asn Pro Asn Thr His Val Val Phe Ser Asn Ile			
	350	355	360	
40	CGC TGG GGA GAC ATT GGG TCT ACT ACG AAC TCG ACT GCG CCC CCG			1201
	Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro Pro			
	365	370	375	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 14

- 40 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 377 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (C) TOPOLOGÍA: lineal
- 45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 14

50	Gln	Gln	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	His	Pro	Lys	Leu	Thr	Thr
	1		5		10		15									
55	Tyr	Lys	Cys	Thr	Lys	Ser	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	Gln	Asp	Thr	Ser	Val
		20		25		30										
60	Val	Leu	Asp	Trp	Asn	Tyr	Arg	Trp	Met	His	Asp	Ala	Asn	Tyr	Asn	Ser
		35		40		45										
65	Cys	Thr	Val	Asn	Gly	Gly	Val	Asn	Thr	Thr	Leu	Cys	Pro	Asp	Glu	Ala

ES 2 281 078 T3

	50	55	60
5	Thr Cys Gly Lys Asn Cys Phe Ile Glu Gly Val Asp Tyr Ala Ala Ser		
	65	70	75 80
	Gly Val Thr Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr Met Asn Gln Tyr Met Pro		
10		85	90 95
	Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Val Ser Pro Arg Leu Tyr Leu Leu		
	100	105	110
15	Asp Ser Asp Gly Glu Tyr Val Met Leu Lys Leu Asn Gly Gln Glu Leu		
	115	120	125
	Ser Phe Asp Val Asp Leu Ser Ala Leu Pro Cys Gly Glu Asn Gly Ser		
20	130	135	140
	Leu Tyr Leu Ser Gln Met Asp Glu Asn Gly Gly Ala Asn Gln Tyr Asn		
	145	150	155 160
25	Thr Ala Gly Ala Asn Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Pro		
	165	170	175
	Val Gln Thr Trp Arg Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly Phe		
30	180	185	190
	Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Gly Asn Ser Arg Ala Asn Ala		
	195	200	205
35	Leu Thr Pro His Ser Cys Thr Ala Thr Ala Cys Asp Ser Ala Gly Cys		
	210	215	220
	Gly Phe Asn Pro Tyr Gly Ser Gly Tyr Lys Ser Tyr Tyr Gly Pro Gly		
40	225	230	235 240
	Asp Thr Val Asp Thr Ser Lys Thr Phe Thr Ile Ile Thr Gln Phe Asn		
	245	250	255
45	Thr Asp Asn Gly Ser Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Ile Thr Arg Lys		
	260	265	270
	Tyr Gln Gln Asn Gly Val Asp Ile Pro Ser Ala Gln Pro Gly Gly Asp		
50	275	280	285
	Thr Ile Ser Ser Cys Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Gly Gly Leu Ala Thr		
55	290	295	300
	Met Gly Lys Ala Leu Ser Ser Gly Met Val Leu Val Phe Ser Ile Trp		
	305	310	315 320
60	Asn Asp Asn Ser Gln Tyr Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly Asn Ala Gly		
	325	330	335
	Pro Cys Ser Ser Thr Glu Gly Asn Pro Ser Asn Ile Leu Ala Asn Asn		
65	340	345	350

ES 2 281 078 T3

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

5 Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro Pro  
 370 375

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 15

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1158 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucléico
- (C) CADENA: Única
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: unir (1..56, 231..1158)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 15

GGG GTC CGA TTT GCC CGC GTT AAC ATC GCG GGT TTT GAC TTT GGC TGT 48  
 Gly Val Arg Phe Ala Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Cys  
 1 5 10 15

ACC ACA GA GTGAGTACCC TTGTTTCCTG GTGTTGCTGG CTGGTTGGGC 96  
 Thr Thr Asp

GGGTATACAG CGAAGCGGAC GCAAGAACAC CGCCGGTCCG CCACCATCAA  
 GATGTGGGTG 156

GTAAGCGGCG GTGTTTTGTA CAACTACCTG ACAGCTCACT CAGGAAATGA  
 GAATTAATGG 216

AAGTCTTGTT ACAG T GGC ACT TGC GTT ACC TCG AAG GTT TAT CCT CCG 264  
 Gly Thr Cys Val Thr Ser Lys Val Tyr Pro Pro  
 20 25 30

TTG AAG AAC TTC ACC GGC TCA AAC AAC TAC CCC GAT GGC ATC GGC CAG 312  
 Leu Lys Asn Phe Thr Gly Ser Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln  
 35 40 45

ATG CAG CAC TTC GTC AAC GAG GAC GGG ATG ACT ATT TTC CGC TTA CCT 360  
 Met Gln His Phe Val Asn Glu Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro  
 50 55 60

GTC GGA TGG CAG TAC CTC GTC AAC AAC AAT TTG GGC GGC AAT CTT GAT 408  
 Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val Asn Asn Asn Leu Gly Gly Asn Leu Asp  
 65 70 75

ES 2 281 078 T3

5  
TCC ACG AGC ATT TCC AAG TAT GAT CAG CTT GTT CAG GGG TGC CTG TCT 456  
Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr Asp Gln Leu Val Gln Gly Cys Leu Ser  
80 85 90

10  
CTG GGC GCA TAC TGC ATC GTC GAC ATC CAC AAT TAT GCT CGA TGG AAC 504  
Leu Gly Ala Tyr Cys Ile Val Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn  
95 100 105 110

15  
GGT GGG ATC ATT GGT CAG GGC GGC CCT ACT AAT GCT CAA TTC ACG AGC 552  
Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser  
115 120 125

20  
CTT TGG TCG CAG TTG GCA TCA AAG TAC GCA TCT CAG TCG AGG GTG TGG 600  
Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Arg Val Trp  
130 135 140

25  
TTC GGC ATC ATG AAT GAG CCC CAC GAC GTG AAC ATC AAC ACC TGG GCT 648  
Phe Gly Ile Met Asn Glu Pro His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala  
145 150 155

30  
GCC ACG GTC CAA GAG GTT GTA ACC GCA ATC CGC AAC GCT GGT GCT ACG 696  
Ala Thr Val Gln Glu Val Val Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr  
160 165 170

35  
TCG CAA TTC ATC TCT TTG CCT GGA AAT GAT TGG CAA TCT GCT GGG GCT 744  
Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala  
175 180 185 190

40  
TTC ATA TCC GAT GGC AGT GCA GCC GCC CTG TCT CAA GTC ACG AAC CCG 792  
Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro  
195 200 205

45  
GAT GGG TCA ACA ACG AAT CTG ATT TTT GAC GTG CAC AAA TAC TTG GAC 840  
Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp  
210 215 220

50  
TCA GAC AAC TCC GGT ACT CAC GCC GAA TGT ACT ACA AAT AAC ATT GAC 888  
Ser Asp Asn Ser Gly Thr His Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp  
225 230 235

55  
GGC GCC TTT TCT CCG CTT GCC ACT TGG CTC CGA CAG AAC AAT CGC CAG 936  
Gly Ala Phe Ser Pro Leu Ala Thr Trp Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln  
240 245 250

60  
GCT ATC CTG ACA GAA ACC GGT GGT GGC AAC GTT CAG TCC TGC ATA CAA 984  
Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Ile Gln  
255 260 265 270

65  
GAC ATG TGC CAG CAA ATC CAA TAT CTC AAC CAG AAC TCA GAT GTC TAT 1032  
Asp Met Cys Gln Gln Ile Gln Tyr Leu Asn Gln Asn Ser Asp Val Tyr  
275 280 285

60  
CTT GGC TAT GTT GGT TGG GGT GCC GGA TCA TTT GAT AGC ACG TAT GTC 1080  
Leu Gly Tyr Val Gly Trp Gly Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val

ES 2 281 078 T3

290            295            300

5    **CTG ACG GAA ACA CCG ACT AGC AGT GGT AAC TCA TGG ACG GAC ACA TCC**    1128  
**Leu Thr Glu Thr Pro Thr Ser Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser**  
          305            310            315

10    **TTG GTC AGC TCG TGT CTC GCA AGA AAG TA**                            1158  
**Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala Arg Lys**  
          320            325

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 14

15

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 327 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

20

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 16

25

**Gly Val Arg Phe Ala Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Cys**  
          1            5            10            15

30

**Thr Thr Asp Gly Thr Cys Val Thr Ser Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys**  
          20            25            30

35

**Asn Phe Thr Gly Ser Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln Met Gln**  
          35            40            45

40

**His Phe Val Asn Glu Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro Val Gly**  
          50            55            60

45

**Trp Gln Tyr Leu Val Asn Asn Asn Leu Gly Gly Asn Leu Asp Ser Thr**  
          65            70            75            80

**Ser Ile Ser Lys Tyr Asp Gln Leu Val Gln Gly Cys Leu Ser Leu Gly**  
          85            90            95

50

**Ala Tyr Cys Ile Val Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly**  
          100            105            110

**Ile Ile Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp**  
          115            120            125

55

**Ser Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Arg Val Trp Phe Gly**  
          130            135            140

**Ile Met Asn Glu Pro His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr**  
          145            150            155            160

60

**Val Gln Glu Val Val Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln**  
          165            170            175

65

**Phe Ile Ser Leu Pro Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile**

ES 2 281 078 T3

5                                    **180                                    185                                    190**

**Ser Asp Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly**  
                                 **195                                    200                                    205**

10                                   **Ser Thr Thr Asn Leu Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp**  
                                 **210                                    215                                    220**

**Asn Ser Gly Thr His Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Gly Ala**  
                                 **225                                    230                                    235                                    240**

15                                   **Phe Ser Pro Leu Ala Thr Trp Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln Ala Ile**  
                                 **245                                    250                                    255**

20                                   **Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Ile Gln Asp Met**  
                                 **260                                    265                                    270**

**Cys Gln Gln Ile Gln Tyr Leu Asn Gln Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly**  
                                 **275                                    280                                    285**

25                                   **Tyr Val Gly Trp Gly Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr**  
                                 **290                                    295                                    300**

30                                   **Glu Thr Pro Thr Ser Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val**  
                                 **305                                    310                                    315                                    320**

**Ser Ser Cys Leu Ala Arg Lys**  
                                 **325**

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 17

40                                    (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 72 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) CADENA: Única
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

50

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: (1..72)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 17

55

**CGT GGC ACC ACC ACC ACC CGC CGC CCA GCC ACT ACC ACT GGA AGC TCT    48**  
**Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser**  
                                 **1                                    5                                    10                                    15**

60

**CCC GGA CCT ACC CAG TCT CAC TAC                                    72**  
**Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr**  
                                 **20**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 18

65

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 aminoácidos

## ES 2 281 078 T3

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 18

Arg	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Arg	Arg	Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser
1				5					10					15	
Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Ser	His	Tyr								
			20												

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 19

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 129 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: (1..129)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 19

<b>GGC GCT GCA AGC TCA AGC TCG TCC ACG CGC GCC GCG TCG ACG ACT TCT</b>	<b>48</b>
<b>Gly Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Thr Arg Ala Ala Ser Thr Thr Ser</b>	
<b>1 5 10 15</b>	

<b>CGA GTA TCC CCC ACA ACA TCC CGG TCG AGC TCC GCG ACG CCT CCA CCT</b>	<b>96</b>
<b>Arg Val Ser Pro Thr Thr Ser Arg Ser Ser Ser Ala Thr Pro Pro Pro</b>	
<b>20 25 30</b>	

<b>GGT TCT ACT ACT ACC AGA GTA CCT CCA GTC GGA</b>	<b>129</b>
<b>Gly Ser Thr Thr Thr Arg Val Pro Pro Val Gly</b>	
<b>35 40</b>	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 20

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 43 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 20

Gly	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Ala	Ala	Ser	Thr	Thr	Ser
1				5					10					15	
Arg	Val	Ser	Pro	Thr	Thr	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Ala	Thr	Pro	Pro	Pro
			20						25				30		
Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Pro	Pro	Val	Gly					
			35						40						

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 21

## ES 2 281 078 T3

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 81 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) CADENA: Única
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..81

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 21

**CCC CCG CCT GCG TCC AGC ACG ACG TTT TCG ACT ACA CCG AGG AGC TCG      48**  
Pro Pro Pro Ala Ser Ser Thr Thr Phe Ser Thr Thr Pro Arg Ser Ser  
1            5            10            15

**ACG ACT TCG AGC AGC CCG AGC TGC ACG CAG ACT                      81**  
Thr Thr Ser Ser Ser Pro Ser Cys Thr Gln Thr  
20            25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 22

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 22

Pro Pro Pro Ala Ser Ser Thr Thr Phe Ser Thr Thr Pro Arg Ser Ser  
1            5            10            15  
Thr Thr Ser Ser Pro Ser Cys Thr Gln Thr  
20            25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 23

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 102 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) CADENA: Única
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..102

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 23

ES 2 281 078 T3

**CCG GGA GCC ACT ACT ATC ACC ACT TCG ACC CGG CCA CCA TCC GGT CCA 48**  
**Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro**  
**1 5 10 15**

5 **ACC ACC ACC ACC AGG GCT ACC TCA ACA AGC TCA TCA ACT CCA CCC ACG 96**  
**Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ser Thr Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr**  
**20 25 30**

10 **AGC TCT 102**  
**Ser Ser**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 24

15 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 24

25 Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro  
**1 5 10 15**  
 Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ser Thr Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr  
**20 25 30**  
 Ser Ser

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 25

35 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 51 pares de bases

40 (B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..51

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 25

**ATG TAT CGG AAG TTG GCC GTC ATC TCG GCC TTC TTG GCC ACA GCT CGT 48**  
**Met Tyr Arg Lys Leu Ala Val Ile Ser Ala Phe Leu Ala Thr Ala Arg**  
**1 5 10 15**

**GCT 51**  
**Ala**

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 26

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 aminoácidos

65 (B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

## ES 2 281 078 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 26

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

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 27

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 72 pares de bases  
 (B) TIPO: Ácido nucleico  
 (C) CADENA: Única  
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- 25 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS  
 (B) POSICIÓN: 1..72

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 27

30 **ATG ATT GTC GGC ATT CTC ACC ACG CTG GCT ACG CTG GCC ACA CTC GCA 48**  
**Met Ile Val Gly Ile Leu Thr Thr Leu Ala Thr Leu Ala Thr Leu Ala**  
**1 5 10 15**

35 **GCT AGT GTG CCT CTA GAG GAG CGG 72**  
**Ala Ser Val Pro Leu Glu Glu Arg**  
**20**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 28

40 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 24 aminoácidos  
 (B) TIPO: aminoácido  
 (C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 28

50 Met Ile Val Gly Ile Leu Thr Thr Leu Ala Thr Leu Ala Thr Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Val Pro Leu Glu Glu Arg  
 20

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 29

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 66 pares de bases  
 (B) TIPO: Ácido nucleico  
 (C) CADENA: Única  
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

## ES 2 281 078 T3

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..66

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 29

5  
**ATG GCG CCC TCA GTT ACA CTG CCG TTG ACC ACG GCC ATC CTG GCC ATT** 48  
**Met Ala Pro Ser Val Thr Leu Pro Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ile**  
1 5 10 15  
10  
**GCC CGG CTC GTC GCC GCC** 66  
**Ala Arg Leu Val Ala Ala**  
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 30

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 30

20  
Met Ala Pro Ser Val Thr Leu Pro Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ile  
1 5 10 15  
30  
Ala Arg Leu Val Ala Ala  
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 31

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 63 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..63

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 31

50  
**ATG AAC AAG TCC GTG GCT CCA TTG CTG CTT GCA GCG TCC ATA CTA TAT** 48  
**Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr**  
1 5 10 15  
55  
**GGC GGC GCC GTC GCA** 63  
**Gly Gly Ala Val Ala**  
20  
60

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 32

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido



ES 2 281 078 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 34

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 218 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: Única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 34

Gln Thr Ser Cys Asp Gln Trp Ala Thr Phe Thr Gly Asn Gly Tyr Thr  
1 5 10 15

Val Ser Asn Asn Leu Trp Gly Ala Ser Ala Gly Ser Gly Phe Gly Cys  
20 25 30

Val Thr Ala Val Ser Leu Ser Gly Gly Ala Ser Trp His Ala Asp Trp  
35 40 45

Gln Trp Ser Gly Gly Gln Asn Asn Val Lys Ser Tyr Gln Asn Ser Gln  
50 55 60

Ile Ala Ile Pro Gln Lys Arg Thr Val Asn Ser Ile Ser Ser Met Pro  
65 70 75 80

Thr Thr Ala Ser Trp Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Ile Arg Ala Asn Val  
85 90 95

Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Ala Asn Pro Asn His Val Thr Tyr Ser  
100 105 110

Gly Asp Tyr Glu Leu Met Ile Trp Leu Gly Lys Tyr Gly Asp Ile Gly  
115 120 125

Pro Ile Gly Ser Ser Gln Gly Thr Val Asn Val Gly Gly Gln Ser Trp  
130 135 140

Thr Leu Tyr Tyr Gly Tyr Asn Gly Ala Met Gln Val Tyr Ser Phe Val  
145 150 155 160

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

Asn Tyr Leu Arg Asp Asn Lys Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gln Tyr Val  
180 185 190

Leu Ser Tyr Gln Phe Gly Thr Glu Pro Phe Thr Gly Ser Gly Thr Leu  
195 200 205

Asn Val Ala Ser Trp Thr Ala Ser Ile Asn  
210 215

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 35

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

## ES 2 281 078 T3

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENA: Única

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 35

ATGAAGTTCC TTCAAGTCCT CCCTGCCCTC ATACCGGCCG CCCTGGCCC

49

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 36

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: Única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 36

Met Lys Phe Leu Gln Val Leu Pro Ala Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ala  
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 37

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 57 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 37

AGCTCGTAGA GCGTTGACTT GCCTGTGGTC TGTCCAGACG GGGGACGATA GAATGCG

57

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 38

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 38

GTCACCTTCT CCAACATCAA GTTCGGACCC ATTGGCAGCA CCGGCTAA

48

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 39

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CADENA: doble

## ES 2 281 078 T3

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 39

5 GGGGTTTAAA CCCGCGGGGA TT 22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 40

10 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

15 (C) CADENA: simple

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 40

20 TGAGCCGAGG CCTCC 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 41

25 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

30 (C) CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 41

35 AGCTTGAGAT CTGAAGCT 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 42

40 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

45 (C) CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 42

50 CTAGAGGAGC GGTCGGGAAC CGCTAC 26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID NO: 43

55 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

60 (C) CADENA: Única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 43

65 Leu Glu Glu Arg Ser Gly Thr Ala Thr  
1 5