

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 560**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12P 7/42 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2015 PCT/US2015/036078**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15195697**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2015 E 15732504 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3087179**

54 Título: **Polipéptidos de fusión relacionados con omega-hidroxilasa con propiedades mejoradas**

30 Prioridad:

16.06.2014 US 201462012970 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2021

73 Titular/es:

**GENOMATICA, INC. (100.0%)
4757 Nexus Center Drive
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**ZHU, BAOLONG;
SCHIRMER, ANDREAS W. y
CHANG, CINDY**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 803 560 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

Polipéptidos de fusión relacionados con omega-hidroxilasa con propiedades mejoradas

5 **Campo**

La divulgación se refiere a polipéptidos de fusión relacionados con omega-hidroxilasa que dan lugar a una producción mejorada de derivados de ácidos grasos omega-hidroxilados cuando se expresan en células hospedadoras recombinantes. La divulgación se refiere además a microorganismos para expresar los polipéptidos de fusión relacionados con omega-hidroxilasa para la producción de derivados de ácidos grasos omega-hidroxilados.

Antecedentes

Las citocromo P450 monooxigenasas (P450) son un grupo diverso de enzimas. Se clasifican en familias y subfamilias. Cuando comparten una identidad de aminoácidos superior o igual al cuarenta por ciento, pertenecen a la misma familia. Cuando comparten una identidad de aminoácidos superior o igual al cincuenta y cinco por ciento, pertenecen a la misma subfamilia. Las P450 usan ácidos grasos como sustratos y catalizan reacciones de hidroxilación. Las bacterias tienen varios sistemas P450 que participan en la degradación de los alcanos y en la modificación de los ácidos grasos, y se conocen más de 1000 P450 microbianas hasta la fecha. Una subfamilia de P450 particular se conoce como cyp153A, en donde la primera se clonó de *Acinetobacter calcoaceticus* en 2001. Desde entonces, se han identificado enzimas similares en otras especies que utilizan alcanos tales como *Sphingomonas* sp. HXN200, *Mycobacterium* sp. HXN1500 y *Alcanivorax borkumensis* (Van Bogaert *et al.* (2011) *FEBS Journal* 278: 206-221). Varias P450 de la subfamilia de CYP153A bacterianas son alcano omega-hidroxilasas (ω -hidroxilasas, también denominadas ω -oxigenasas) con alta regioselectividad terminal. Las CYP153A también se han asociado con la síntesis de compuestos alifáticos omega-hidroxilados (ω -hidroxilados) industrialmente relevantes, tales como alcoholes primarios, ácidos grasos ω -hidroxilados y derivados de ácidos grasos bifuncionales tales como ácidos α,ω -dicarboxílicos y α,ω -dioles (Honda Malca *et al.* (2012) *Chem. Commun.* 48:5115-5117). Scheps *et al.* (2013) *Microbial Biotechnology* 6: 694-707 desvela la síntesis de ácido dodecanoico ω -hidroxi basado en una construcción de fusión de CYP153A diseñada genéticamente.

Sumario

La presente invención proporciona:

- Una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que comprende al menos el 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 38 y que tiene al menos una mutación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 9, 10, 11, 12, 13, 14, 28, 61, 119, 231, 233, 327, 413, 703, 745, 747, 749, 757, 770, 771 y 784, en donde dicha variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso omega-hidroxilado.

La presente invención también proporciona:

- Una célula hospedadora recombinante que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa de la presente invención, que preferentemente expresa adicionalmente un polipéptido de tioesterasa de CE 3.1.2.-, CE 3.1.1.5 o CE 3.1.2.14;
- Un cultivo celular que comprende la célula hospedadora recombinante de la presente invención;
- Un método para producir un ácido graso omega-hidroxilado que tiene un aumento en el título, que comprende:
 - i. cultivar la célula hospedadora de la presente invención con una fuente de carbono; e
 - ii) recoger un ácido graso omega-hidroxilado; y
- Un microorganismo recombinante para producir un derivado de ácido graso omega-hidroxilado *in vivo* cuando se cultiva en un caldo de fermentación en presencia de una fuente de carbono a partir de una materia prima renovable, comprendiendo dicho microorganismo una vía diseñada para expresar al menos dos secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende:
 - (i) una tioesterasa de CE 3.1.2.-, CE 3.1.1.5 o CE 3.1.2.14; e
 - (ii) una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa de la presente invención.

La presente divulgación proporciona polipéptidos de fusión relacionados con omega-hidroxilasa y variantes de los mismos que pueden producir derivados de ácidos grasos omega-hidroxilados y bifuncionales en células hospedadoras. De manera más específica, la presente divulgación proporciona variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que producen derivados de ácidos grasos omega-hidroxilados (ω -hidroxilados) y bifuncionales, y composiciones de los mismos, que incluyen ácidos grasos ω -hidroxilados, ésteres grasos ω -hidroxilados, α,ω -diácidos, α,ω -diésteres, α,ω -dioles y productos químicos derivados de los mismos, tales como las macrolactonas. También se proporcionan secuencias específicas de proteína y ácido nucleico de fusión híbrida de

CYP153A-reductasa, así como células hospedadoras recombinantes y cultivos celulares que engloban dichas variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa diseñadas genéticamente. La divulgación también proporciona métodos para usar las células hospedadoras que expresan las variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa recombinantes para fabricar derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados y/o bifuncionales, o composiciones de los mismos.

Un aspecto de la divulgación proporciona un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso o derivado de ácido graso ω -hidroxilado (ω -OH), en donde el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de polipéptido de SEQ ID NO: 6. Además, se incluyen métodos para expresar el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa y sus variantes. En un aspecto, el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene al menos el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 y la expresión del polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en una célula hospedadora recombinante produce un título más alto de ácidos grasos o derivados de ácidos grasos ω -OH, o composiciones de los mismos, en comparación con el título producido por la expresión de una CYP153A de tipo silvestre. En un aspecto, la célula hospedadora recombinante produce un ácido graso ω -OH o un derivado de ácido graso ω -OH, o una composición del mismo, con un título que es al menos aproximadamente un 10 % superior al título de un ácido graso ω -OH o un derivado de ácido graso ω -OH, o una composición del mismo, producido por una célula hospedadora que expresa una CYP153A de tipo silvestre correspondiente, cuando se cultiva en medio que contiene una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa. En otro aspecto, el ácido graso ω -OH o el derivado de ácido graso ω -OH, o la composición del mismo, se produce extracelularmente.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que tiene al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 y que tiene al menos una mutación en una posición de aminoácido que incluye la posición 796, 141, 231, 27, 82, 178, 309, 407, 415, 516 y/o 666, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso ω -OH. La variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene una mutación en una cualquiera o más de las siguientes posiciones, incluidas la posición A796V, donde la alanina (A) está sustituida con (es decir, reemplazada con) valina (V); posición V141I, donde la valina está sustituida con isoleucina (I); posición V141Q, donde la valina (V) está sustituida con glutamina (Q); posición V141G, donde la valina (V) está sustituida con glicina (G); posición V141M, donde la valina (V) está sustituida con metionina (M); posición V141L, donde la valina (V) está sustituida con leucina (L); posición V141T, donde la valina (V) sustituida con treonina (T); posición A231T, donde la alanina (A) está sustituida con treonina (T); posición R27L, donde la arginina (R) está sustituida con lisina (L); posición R82D, donde la arginina (R) está sustituida con ácido aspártico (D); posición R178N, donde la arginina (R) está sustituida con asparagina (N); posición N309R, donde la asparagina (N) está sustituida con arginina (R); posición N407A, donde la asparagina (N) está sustituida con alanina (A); posición V415R, donde la valina (V) está sustituida con arginina (R); posición T516V, donde la treonina (T) está sustituida con valina (V); posición P666A, donde la prolina (P) está sustituida con alanina (A); y posición P666D, donde la prolina (P) está sustituida con ácido aspártico (D). Los ejemplos de variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa incluyen SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 46. En una realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión de tipo CYP153A-RedRhF híbrida. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en una célula hospedadora recombinante produce un título más alto de un ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso ω -OH, o composición del mismo, en comparación con el título de un ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso ω -OH, o composición del mismo, producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en una célula hospedadora correspondiente. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene una mutación en la posición de aminoácido 796, incluyendo A796V. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene una mutación en la posición de aminoácido 231, incluyendo A231T. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene una mutación en la posición de aminoácido 141, incluyendo V141I y/o V141T. En el presente documento, la expresión de la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con mutaciones A796V, V141I, V141T y/o A231T en una célula hospedadora recombinante produce un título más alto de un ácido graso C_{12} o C_{16} ω -OH, respectivamente, en comparación con un título de un ácido graso C_{12} o C_{16} ω -OH producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa.

La divulgación contempla además un cultivo celular con una célula hospedadora recombinante que expresa una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa como se ha descrito anteriormente. El ácido graso o derivado de ácido graso ω -OH, o la composición del mismo, puede incluir uno o más de un ácido graso o derivado de ácido graso C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} y C_{20} ω -OH. El ácido graso o derivado de ácido graso ω -OH, o la composición del mismo, puede incluir un ácido graso o derivado de ácido graso ω -OH saturado o insaturado. En otra realización, el ácido graso o derivado de ácido graso ω -OH, o la composición del mismo, puede incluir uno o más de un ácido graso o derivado de ácido graso $C_{8:1}$, $C_{9:1}$, $C_{10:1}$, $C_{11:1}$, $C_{12:1}$, $C_{13:1}$, $C_{14:1}$, $C_{15:1}$, $C_{16:1}$, $C_{17:1}$, $C_{18:1}$, $C_{19:1}$ y $C_{20:1}$ ω -OH insaturado. En otra realización, el ácido graso o derivado de ácido graso ω -OH, o la

composición del mismo, puede incluir un ácido graso o derivado de ácido graso C₁₂ y/o C₁₆ y/o C_{16:1}.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un método para producir un ácido graso o derivado de ácido graso ω-OH, o una composición del mismo, que tenga un aumento en el título, que incluye cultivar la célula hospedadora que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa (descrita anteriormente) con una fuente de carbono; y recoger un ácido graso ω-OH o un derivado de ácido graso ω-OH. En un aspecto, el ácido graso o derivado de ácido graso ω-OH es al menos de aproximadamente el 20 % al 30 % superior al título de un ácido graso o derivado de ácido graso ω-OH producido por una célula hospedadora que expresa el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa. En otro aspecto, el ácido graso o derivado de ácido graso ω-OH, o la composición del mismo, se produce a un título de aproximadamente 15 g/l a aproximadamente 25 g/l a partir de una fuente de carbono.

Otro aspecto de la divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 32, que tiene una mutación en V141I y A231T, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω-OH, o una composición del mismo. Otro aspecto de la divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 34, que tiene una mutación en R27L, R82D, V141M, R178N y N407A, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω-OH, o una composición del mismo. Otro aspecto de la divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 36, que tiene una mutación en P666A, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω-OH, o una composición del mismo. Otro aspecto de la divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 38, que tiene una mutación en A796V, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω-OH, o una composición del mismo. Otro aspecto de la divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 40, que tiene una mutación en A796V, P666D y T516V, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω-OH, o una composición del mismo. Otro aspecto de la divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 42, que tiene una mutación en V141I, A231T y A796V, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω-OH, o una composición del mismo. Otro aspecto de la divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 44, que tiene una mutación en R27L, R82D, V141M, R178N, N407A y A796V, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω-OH, o una composición del mismo. Otro aspecto de la divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 46, que tiene una mutación en V141T, A231T y A796V, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω-OH, o una composición del mismo.

La divulgación contempla además una célula hospedadora recombinante que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa como se ha descrito anteriormente. En una realización, la célula hospedadora recombinante expresa una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa como se ha descrito anteriormente y un polipéptido de tioesterasa de CE 3.1.2.- o CE 3.1.1.5 o CE 3.1.2.14, en donde la célula hospedadora recombinante produce un ácido graso ω-OH o una composición del mismo con un título que es al menos un 10 % superior, al menos un 15 % superior, al menos un 20 % superior, al menos un 25 % superior o al menos un 30 % superior al título de un ácido graso ω-OH o una composición del mismo producido por una célula hospedadora que expresa un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa correspondiente, cuando se cultiva en medio que contiene una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar la variante de polipéptido de fusión híbrida de

CYP153A-reductasa. En una realización, el ácido graso ω -OH o la composición del mismo se puede producir a un título de aproximadamente 15 g/l a aproximadamente 25 g/l. En otra realización, el ácido graso ω -OH o la composición del mismo se produce extracelularmente.

- 5 En un aspecto, la divulgación engloba un microorganismo recombinante para producir un ácido graso o derivado de ácido graso ω -OH *in vivo* cuando se cultiva en un caldo de fermentación en presencia de una fuente de carbono a partir de una materia prima renovable, el microorganismo que tiene una vía diseñada genéticamente para expresar al menos dos secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye una tioesterasa de CE 3.1.2.- o CE 3.1.1.5 o 3.1.2.14; y una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene al menos el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 46. En una realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión híbrida de CYP153A-RedRhF autosuficiente.

- Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un cultivo celular que incluye la célula hospedadora recombinante como se ha descrito anteriormente, en donde el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH que incluye uno o más de un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1}, o composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{16:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₁₆ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{12:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₁₂ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{14:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₁₄ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{18:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₁₈ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{10:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₁₀ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{8:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₈ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{20:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₂₀ ω -OH saturado o una composición del mismo. En otra realización más, la célula hospedadora recombinante produce ácidos grasos ω -OH saturados o insaturados adicionales o composiciones de los mismos.

- Otro aspecto más de la presente divulgación proporciona un método para producir un ácido graso ω -OH que tiene un aumento en el título, que incluye cultivar la célula hospedadora (descrito anteriormente) con una fuente de carbono; y cosechar un ácido graso ω -OH o una composición del mismo. El método contempla la recogida de un ácido graso ω -OH que es un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1}, o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{16:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C₁₆ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{12:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C₁₂ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{14:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C₁₄ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{18:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C₁₈ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{10:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C₁₀ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{8:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C₈ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{20:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C₂₀ ω -OH saturado o una composición del mismo. En otra realización más, se producen ácidos grasos ω -OH saturados o insaturados adicionales, o composiciones de los mismos, mediante el método descrito en el presente documento.

- Otro aspecto de la presente divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que tiene al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 38 y que tiene al menos una mutación en una posición de aminoácido que incluye la posición 9, 10, 11, 12, 13, 14, 27, 28, 56, 61, 111, 119, 140, 149, 154, 157, 162, 164, 204, 231, 233, 244, 254, 271, 273, 302, 309, 327, 407, 413, 477, 480, 481, 527, 544, 546, 557, 567, 591, 648, 649, 703, 706, 707, 708, 709, 710, 719, 720, 736, 741, 745, 747, 749, 757, 770, 771, 784, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida

de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso ω -OH o una composición del mismo. La variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene una mutación en una cualquiera o más de las siguientes posiciones, que incluyen la posición D9N, donde el aspartato (D) está sustituido con (es decir, reemplazado con) asparagina (N); posición D9K, donde el aspartato (D) está sustituido con lisina (K); posición D10Y, donde el ácido aspártico (D) está sustituido con tirosina (Y); posición I11L, donde la isoleucina (I) está sustituida con leucina (L); posición Q12W, donde la glutamina (Q) está sustituida con triptófano (W); posición Q12R, donde la glutamina (Q) está sustituida con arginina (R); posición Q12T, donde la glutamina (Q) está sustituida con treonina (T); posición S13K, donde la serina (S) está sustituida con lisina (K); posición R14F, donde la arginina (R) está sustituida con fenilalanina (F); posición R27L, donde la arginina (R) está sustituida con leucina (L); posición Q28M, donde la glutamina (Q) está sustituida con metionina (M); posición Q28T, donde la glutamina (Q) está sustituida con treonina (T); posición P56Q, donde la prolina (P) está sustituida con glutamina (Q); posición N61L, donde la asparagina (N) está sustituida con leucina (L); posición F111A, donde la fenilalanina (F) está sustituida con alanina (A); posición K119R, donde la lisina (K) está sustituida con arginina (R); posición S140N, donde la serina (S) está sustituida con asparagina (N); posición P149G, donde la prolina (P) está sustituida con glicina (G); posición P149R, donde la prolina (P) está sustituida con arginina (R); posición V154G, donde la valina (V) está sustituida con glicina (G); posición S157R, donde la serina (S) está sustituida con arginina (R); posición V162C, donde la valina (V) está sustituida con cisteína (C); posición A164N, donde la alanina (A) está sustituida con asparagina (N); posición G204V, donde la glicina (G) está sustituida con valina (V); posición A231W, donde la alanina (A) está sustituida con triptófano (W); posición A231Y, donde la alanina (A) está sustituida con tirosina (Y); posición A231V, donde la alanina (A) está sustituida con valina (V); posición S233L, donde la serina (S) está sustituida con leucina (L); posición S233V, donde la serina (S) está sustituida con valina (V); posición A244R, donde la alanina (A) está sustituida con arginina (R); posición R254G, donde la arginina (R) está sustituida con glicina (G); posición E271D, donde el glutamato (E) está sustituido con aspartato (D); posición P273M, donde la prolina (P) está sustituida con metionina (M); posición T302M, donde la treonina (T) está sustituida con metionina (M); posición N309S, donde la asparagina (N) está sustituida con serina (S); posición P327D, donde la prolina (P) está sustituida con aspartato (D); posición N407G, donde la asparagina (N) está sustituida con glicina (G); posición Y413R, donde la tirosina (Y) está sustituida con arginina (R); posición P477G, donde la prolina (P) está sustituida con glicina (G); posición I480G, donde la isoleucina (I) está sustituida con glicina (G); posición G481I, donde la glicina (G) está sustituida con isoleucina (I); posición D527E, donde el aspartato (D) está sustituido con glutamato (E); posición D544N, donde el aspartato (D) está sustituido con asparagina (N); posición P546G, donde la prolina (P) está sustituida con glicina (G); posición E557R, donde el glutamato (E) está sustituido con arginina (R); posición E557W, donde el glutamato (E) está sustituido con triptófano (W); posición E567S, donde el glutamato (E) está sustituido con serina (S); posición E591Q, donde el glutamato (E) está sustituido con glutamina (Q); posición V648L, donde la valina (V) está sustituida con leucina (L); posición S649I, donde la serina (S) está sustituida con isoleucina (I); posición L703G, donde la leucina (L) está sustituida con glicina (G); posición L706E, donde la leucina (L) está sustituida con glutamato (E); posición L706S, donde la leucina (L) está sustituida con serina (S); posición L706H, donde la leucina (L) está sustituida con histidina (H); posición D707E, donde el aspartato (D) está sustituido con glutamato (E); posición P708S, donde la prolina (P) está sustituida con serina (S); posición D709L, donde el aspartato (D) está sustituido con leucina (L); posición V710C, donde la valina (V) está sustituida con cisteína (C); posición V710R, donde la valina (V) está sustituida con arginina (R); posición V710Q, donde la valina (V) está sustituida con glutamina (Q); posición R719W, donde la arginina (R) está sustituida con triptófano (W); posición D720V, donde el aspartato (D) está sustituido con valina (V); posición A736V, donde la alanina (A) está sustituida con valina (V); posición N741G, donde la asparagina (N) está sustituida con glicina (G); posición P745K, donde la prolina (P) está sustituida con lisina (K); posición P745R, donde la prolina (P) está sustituida con arginina (R); posición D747N, donde el aspartato (D) está sustituido con asparagina (N); posición E749L, donde el glutamato (E) está sustituido con leucina (L); posición E749M, donde el glutamato (E) está sustituido con metionina (M); posición E757A, donde el glutamato (E) está sustituido con alanina (A); posición T770G, donde la treonina (T) está sustituida con glicina (G); posición V771F, donde la valina (V) está sustituida con fenilalanina (F); y la posición M784I, donde la metionina (M) está sustituida con isoleucina (I). En una realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión de tipo cyp153A-RedRhF híbrida. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en una célula hospedadora recombinante produce un título más alto de un ácido graso ω -OH en comparación con el título de un ácido graso ω -OH producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en una célula hospedadora correspondiente. En otra realización, el ácido graso ω -OH es una composición de ácido graso ω -OH.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que tiene al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 38 y que tiene al menos una mutación en una posición de aminoácido que incluye la posición 747, 12, 327, 14, 61, 28, 13, 771, 119, 10, 11, 28, 745, 9, 770, 413, 784, 749, 233, 757 y 703, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso ω -OH. La variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene una mutación en una cualquiera o más de las siguientes posiciones, que incluyen la posición D747N, donde el aspartato (D) está sustituido con asparagina (N); posición Q12W, donde la glutamina (Q) está sustituida con triptófano (W); posición Q12R, donde la glutamina (Q) está sustituida con arginina (R); posición Q12T, donde la glutamina (Q) está sustituida con treonina (T); posición P327D, donde la prolina (P) está sustituida con aspartato (D); posición R14F, donde la arginina (R) está sustituida con fenilalanina (F); posición N61L, donde la asparagina (N) está sustituida con leucina (L); posición Q28M, donde la glutamina (Q) está sustituida con metionina (M); posición S13K, donde la serina (S) está sustituida con lisina

(K); posición V771F, donde la valina (V) está sustituida con fenilalanina (F); posición K119R, donde la lisina (K) está sustituida con arginina (R); posición D10Y, donde el ácido aspártico (D) está sustituido con tirosina (Y); posición I11L, donde la isoleucina (I) está sustituida con leucina (L); posición Q28T, donde la glutamina (Q) está sustituida con treonina (T); posición P745R, donde la prolina (P) está sustituida con arginina (R); posición D9N, donde el aspartato (D) está sustituido con asparagina (N); posición D9K, donde el aspartato (D) está sustituido con lisina (K); posición T770G, donde la treonina (T) está sustituida con glicina (G); posición Y413R, donde la tirosina (Y) está sustituida con arginina (R); posición M784I, donde la metionina (M) está sustituida con isoleucina (I); posición E749L, donde el glutamato (E) está sustituido con leucina (L); posición S233L, donde la serina (S) está sustituida con leucina (L); posición E757A, donde el glutamato (E) está sustituido con alanina (A); y posición L703G, donde la leucina (L) está sustituida con glicina (G). En una realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión de tipo CYP153A-RedRhF híbrida. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en una célula hospedadora recombinante produce un título más alto de un ácido graso ω -OH en comparación con el título de un ácido graso ω -OH producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en una célula hospedadora correspondiente. En otra realización, las variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa (y las secuencias de polinucleótidos correspondientes) incluyen SEQ ID NO: 47-96. En otra realización, el ácido graso ω -OH es una composición de ácido graso ω -OH.

En un aspecto, la divulgación engloba un microorganismo recombinante o una célula hospedadora recombinante para producir un ácido graso ω -OH o derivado de ácido graso ω -OH *in vivo* cuando se cultiva en un caldo de fermentación en presencia de una fuente de carbono a partir de una materia prima renovable, el microorganismo que tiene una vía diseñada genéticamente para expresar al menos dos secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye una tioesterasa de CE 3.1.2.- o CE 3.1.1.5 o 3.1.2.14; y una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene al menos el 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94 y SEQ ID NO: 96. En una realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión híbrida de CYP153A-RedRhF autosuficiente.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un cultivo celular que incluye la célula hospedadora recombinante como se ha descrito anteriormente, en donde el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso ω -OH que incluye uno o más de un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1}, o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{16:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₁₆ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{12:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₁₂ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{14:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₁₄ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{18:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₁₈ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{10:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₁₀ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{8:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₈ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el cultivo celular produce un ácido graso C_{20:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el cultivo celular produce un ácido graso C₂₀ ω -OH saturado o una composición del mismo. En otra realización más, la célula hospedadora recombinante produce ácidos grasos ω -OH saturados o insaturados adicionales o composiciones de los mismos.

Otro aspecto más de la presente divulgación proporciona un método para producir un ácido graso ω -OH que tiene un aumento en el título, que incluye cultivar la célula hospedadora (descrito anteriormente) con una fuente de carbono; y cosechar un ácido graso ω -OH o una composición del mismo. En particular, el método engloba producir un ácido graso o derivado de ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1}, o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{16:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C₁₆ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{12:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C₁₂ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{14:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C₁₄ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{18:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C₁₈ ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{10:1} ω -OH insaturado o una composición del mismo.

mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{10} ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso $C_{8:1}$ ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_8 ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso $C_{20:1}$ ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{20} ω -OH saturado o una composición del mismo. En una realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso $C_{22:1}$ ω -OH insaturado o una composición del mismo. En otra realización, el ácido graso ω -OH recogido es un ácido graso C_{22} ω -OH saturado o una composición del mismo.

10 Breve divulgación de los dibujos

La presente divulgación se entiende mejor cuando se lee junto con las figuras adjuntas, que sirven para ilustrar algunas realizaciones preferidas. Se entiende que, sin embargo, la divulgación no se limita a las realizaciones específicas desveladas en las figuras.

La **Figura 1** es una descripción esquemática de una vía biosintética a modo de ejemplo para la producción de derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados tales como, por ejemplo, ácidos grasos C_{12} ω -hidroxilados (FFA C_{12} ω -OH) y/o ácidos grasos $C_{16:1}$ ω -hidroxilados (FFA $C_{16:1}$ ω -OH) como resultado de la expresión de la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa y un polipéptido de tioesterasa en un microorganismo recombinante. FAB (*Fatty Acid Biosynthesis*) se refiere a la biosíntesis de ácidos grasos en el microorganismo; fatB1 se refiere a una acil-ACP (*Acyl Carrier Protein*) tioesterasa de cadena media de *Umbellularia californica* (Laurel de California); y fatA3 se refiere a una acil-ACP tioesterasa de cadena larga de *Arabidopsis thaliana*.

La **Figura 2** proporciona un ejemplo de la producción de ácidos grasos ω -hidroxilados como resultado de la expresión de una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa. Con el fin de ilustrar la producción de ácidos grasos ω -hidroxilados (ω -OH) mediante variantes, se empleó una mutagénesis por saturación de sitio. El gráfico representado muestra los mejores resultados de una mutagénesis por saturación de sitio de la posición de aminoácido 141 y 309 de cyp153A (G307A, A796V)-Red450RhF. La figura se refiere a las especies de ácidos grasos totales (FAS (*Fatty Acid Species*) totales) (véase la barra de color gris oscuro); a ácido hexadecenoico ω -hidroxi ($C_{16:1}$ ω -OH) (véase la barra de color gris claro); y el porcentaje de ácidos grasos ω -hidroxi (% de FFA ω -OH) (véase la flecha).

Descripción detallada

35 Visión general

Una forma de eliminar nuestra dependencia de los productos petroquímicos es producir derivados de ácidos grasos tales como los derivados de ácidos grasos ω -OH a través de microorganismos ecológicos que sirvan como hospedadores de producción en miniatura. Dichos hospedadores celulares (es decir, células hospedadoras o microorganismos recombinantes) están diseñados genéticamente para producir derivados de ácidos grasos ω -OH y derivados de ácidos grasos bifuncionales a partir de fuentes renovables tales como materia prima renovable (por ejemplo, carbohidratos fermentables, biomasa, celulosa, glicerol, CO, CO₂, etc.). Estos derivados de ácidos grasos ω -OH son las materias primas para productos industriales que incluyen productos químicos especializados, polímeros y fragancias.

La presente divulgación se refiere a polipéptidos de fusión relacionados con la ω -hidroxilasa, que incluyen polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa y variantes de los mismos que producen un título, un rendimiento y/o una productividad altos de composiciones de derivados de ácidos grasos ω -OH cuando se expresan en células hospedadoras recombinantes. En el presente documento, la biosíntesis mejorada de derivados de ácidos grasos ω -OH se logra transformando las células hospedadoras de manera que expresen un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa o una variante del mismo, que catalice la reacción de un ácido graso en un ácido graso ω -OH tal como, por ejemplo, un ácido graso o derivado de ácido graso C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , $C_{8:1}$, $C_{9:1}$, $C_{10:1}$, $C_{11:1}$, $C_{12:1}$, $C_{13:1}$, $C_{14:1}$, $C_{15:1}$, $C_{16:1}$, $C_{17:1}$, $C_{18:1}$, $C_{19:1}$ y/o $C_{20:1}$ ω -OH. La divulgación engloba las células hospedadoras recombinantes o las cepas de producción que expresan los polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa y sus variantes. En un aspecto, la divulgación se refiere a la subfamilia de P450 cyp153A.

Definiciones

Como se usan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen los referentes en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula hospedadora" incluye dos o más de dichas células hospedadoras, la referencia a "un éster graso" incluye uno o más ésteres grasos, o mezclas de ésteres, la referencia a "una secuencia de ácido nucleico" incluye una o más secuencias de ácido nucleico, la referencia a "una enzima" incluye una o más enzimas, y similares.

El término "número de clasificación enzimática (CE)" se refiere a un número que denota una actividad enzimática específica. Los números CE clasifican las enzimas de acuerdo con la reacción que catalizan bajo un sistema de

nomenclatura de enzimas. Los números CE especifican reacciones catalizadas por enzimas. Por ejemplo, si diferentes enzimas de diferentes organismos catalizan la misma reacción, entonces tienen el mismo número CE. Además, diferentes pliegues de proteínas pueden catalizar una reacción idéntica y, por lo tanto, se les asignaría un número CE idéntico (por ejemplo, enzimas isofuncionales no homólogas o NISE, *Non-homologous Isofunctional Enzymes*). Los números CE son establecidos por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology), cuya descripción se encuentra disponible en el sitio web de la Nomenclatura de enzimas IUBMB en la World Wide Web. Por ejemplo, la actividad enzimática de la citocromo P450 monooxigenasa (P450), incluyendo la actividad enzimática de ω -hidroxilasa o ω -oxigenasa se clasifica como CE 1.14.15.3. La funcionalidad de las enzimas que pertenecen a la familia de enzimas P450 se conserva en la mayoría de los procariotas de una especie a otra. Por lo tanto, diferentes especies microbianas pueden llevar a cabo la misma actividad enzimática que se clasifica como CE 1.14.15.3. Un ejemplo de una actividad enzimática característica de CE 1.14.15.3 es la actividad enzimática de un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa o una variante del mismo como se describe en el presente documento (anteriormente).

Las expresiones "ácido graso omega-hidroxilado" o "ácido graso ω -hidroxilado" o "ácido graso ω -hidroxi" o "ácido graso ω -hidroxilo" o "ácido graso ω -OH" o "ácido graso ω OH" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un ácido graso que se origina en el metabolismo de los ácidos grasos y que tiene al menos un grupo OH en la posición omega (ω). Los ejemplos de dichos ácidos grasos ω -hidroxilados son ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1}. En una realización, dichos ácidos grasos ω -hidroxilados son ácidos grasos C_{8:0} ω -OH, ácidos grasos C_{10:0} ω -OH, ácidos grasos C_{12:0} ω -OH, ácidos grasos C_{14:0} ω -OH, ácidos grasos C_{16:0} ω -OH, ácidos grasos C_{18:0} ω -OH, ácidos grasos C_{20:0} ω -OH, ácidos grasos C_{8:1} ω -OH, ácidos grasos C_{10:1} ω -OH, ácidos grasos C_{12:1} ω -OH, ácidos grasos C_{14:1} ω -OH, ácidos grasos C_{16:1} ω -OH, ácidos grasos C_{18:1} ω -OH, ácidos grasos C_{20:1} ω -OH, y similares. En un microorganismo, el ácido graso ω -hidroxilado puede usarse para producir derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados tales como ésteres grasos ω -hidroxilados, así como derivados de ácidos grasos bifuncionales que incluyen α,ω -diácidos, α,ω -diésteres y α,ω -dioles. En ese sentido, Las expresiones "derivado de ácido graso omega-hidroxilado" y "derivado de ácido graso ω -hidroxilado" y "derivado de ácido graso ω -hidroxi" y "derivado de ácido graso ω -hidroxilo" y "derivado de ácido graso α,ω -bifuncional" y "derivado de ácido graso ω -OH" se refiere a una entidad química que se originó a partir del metabolismo de los ácidos grasos y que tiene al menos un grupo OH en la posición omega o se deriva de un producto intermedio que tiene al menos un grupo OH en la posición omega. En el presente documento, la "posición omega (ω)" se refiere al átomo de carbono terminal de un derivado de ácido graso en el extremo opuesto con respecto a su grupo funcional primario. Dichos derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados incluyen, pero sin limitación, α,ω -diácidos; α,ω -diésteres; α,ω -dioles y productos químicos derivados de los mismos (por ejemplo, macrolactonas).

Una "composición de ácido graso ω -hidroxilado" o "composición de ácido graso ω -OH" como se menciona en el presente documento es producida por una célula hospedadora recombinante y normalmente incluye una mezcla de ciertos tipos de ácidos grasos ω -hidroxilados con distintas longitudes de cadena y/o características de saturación y/o de ramificación. De manera similar, una célula hospedadora recombinante produce una "composición de derivado de ácido graso ω -hidroxilado" y normalmente comprende una mezcla de ciertos tipos de derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados con distintas longitudes de cadena y/o características de saturación y/o de ramificación (por ejemplo, ácidos grasos ω -hidroxilados con distintas longitudes de cadena y/o características de saturación y/o de ramificación; ésteres grasos ω -hidroxilados con distintas longitudes de cadena y/o características de saturación y/o de ramificación; α,ω -diácidos de distintas longitudes de cadena y/o características de saturación y/o de ramificación; α,ω -diésteres de distintas longitudes de cadena y/o características de saturación y/o de ramificación; α,ω -dioles de distintas longitudes de cadena y/o características de saturación y/o de ramificación; y similares). En algunos casos, la composición de derivado de ácido graso ω -OH incluye principalmente un tipo de derivado de ácido graso ω -OH tal como, por ejemplo, 1,12-dodecenodiol, o 1,14-tetradecanodiol, o éster metílico del ácido 16-hidroxi-hexadecanoico, o ácido 16-hidroxi-hexadecenoico, o ácido 15-hidroxi-pentadecanoico, o ácido 15-hidroxi-pentadecenoico, o ácido 18-hidroxi-octadecenoico, o los ésteres metílicos de cualquiera de estos derivados de ácidos grasos, u otros. En otros casos más, la composición de derivado de ácido graso ω -OH comprende una mezcla de más de un tipo de derivado de ácido graso ω -OH para proporcionar una composición diseñada específicamente (por ejemplo, aproximadamente el 20 % de ácido 12-hidroxi-dodecanoico y aproximadamente el 80 % de ácido 1,14-14-hidroxi-tetradecanoico en la misma composición proporcionaría dicho ejemplo).

La expresión "número de registro" o "número de registro NCBI" o "número de registro GenBank" se refiere a un número que denota una secuencia específica de ácido nucleico. Los números de registro de secuencias mencionados en la presente descripción se obtuvieron de las bases de datos proporcionadas por el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Centro Nacional de Información Biotecnológica) mantenido por los Institutos Nacionales de Salud, EE. UU., y de las bases de datos UniProt Knowledgebase (UniProtKB) y Swiss-Prot proporcionadas por el Instituto Suizo de Bioinformática (también denominado número de registro UniProtKB).

Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a una unidad monomérica de un polinucleótido que consiste en una base heterocíclica, un azúcar y uno o más grupos fosfato. Las bases naturales (guanina, (G), adenina, (A), citosina, (C), timina, (T) y uracilo (U)) normalmente se derivan de purina o pirimidina, aunque debe entenderse que también se incluyen análogos de bases naturales y no naturales. El azúcar natural es la

pentosa (azúcar de cinco átomos de carbono) desoxirribosa (que forma el ADN) o ribosa (que forma el ARN), aunque debe entenderse que también se incluyen análogos de azúcares naturales y no naturales. Los ácidos nucleicos normalmente están unidos mediante enlaces fosfato para formar ácidos nucleicos o polinucleótidos, aunque se conocen muchos otros enlaces en la técnica (por ejemplo, fosforotioatos, boranofosfatos y similares).

El término "polinucleótido" se refiere a un polímero de ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN), que puede ser monocatenario o bicatenario y que puede contener nucleótidos no naturales o modificados. Los términos "polinucleótido", "secuencia de ácido nucleico", y "secuencia de nucleótidos" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, bien ARN o ADN. Estos términos se refieren a la estructura primaria de la molécula y, por lo tanto, incluyen ADN bicatenario y monocatenario, y ARN bicatenario y monocatenario. Los términos incluyen, como equivalentes, análogos de ARN o ADN hechos de análogos de nucleótidos y polinucleótidos modificados tales como, pero sin limitación, polinucleótidos metilados y/o protegidos terminalmente. El polinucleótido puede estar en cualquier forma, incluyendo, pero sin limitación, de plásmido, vírica, cromosómica, EST, ADNc, ARNm y ARNr.

Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. La expresión "polipéptido recombinante" se refiere a un polipéptido que se produce mediante técnicas recombinantes, en donde, en general, el ADN o ARN que codifica la proteína expresada se inserta en un vector de expresión adecuado que, a su vez, se usa para transformar una célula hospedadora para producir el polipéptido. De manera similar, las expresiones "polinucleótido recombinante" o "ácido nucleico recombinante" o "ADN recombinante" se producen mediante técnicas recombinantes que son conocidas por los expertos en la materia.

El término "homólogo" se refiere a un polinucleótido o un polipéptido que comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 50 por ciento (%) idéntica a la secuencia polinucleotídica o polipeptídica correspondiente. Preferentemente, los polinucleótidos o polipéptidos homólogos tienen secuencias de polinucleótidos o secuencias de aminoácidos que tienen al menos aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de homología con la secuencia de aminoácidos o la secuencia polinucleotídica correspondientes. Como se usan en el presente documento, los términos "homología" de secuencia e "identidad" de secuencia se usan indistintamente. Un experto en la materia conoce los métodos de determinación de la homología entre dos o más secuencias. En resumen, los cálculos de "homología" entre dos secuencias se pueden realizar de la siguiente manera. Se alinean las secuencias con fines comparativos óptimos (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo, y las secuencias no homólogas se pueden descartar para fines comparativos). En una realización preferida, la longitud de una primera secuencia que se alinea con fines comparativos es al menos aproximadamente un 30 %, preferentemente, al menos aproximadamente un 40 %, más preferentemente, en al menos aproximadamente un 50 %, incluso más preferentemente, al menos aproximadamente un 60 %, e incluso más preferentemente, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente un 98 % o aproximadamente un 100 % de la longitud de una segunda secuencia. Luego se comparan los restos de aminoácidos o nucleótidos de las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes de la primera y segunda secuencias. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de homología entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. Puede realizarse la comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias usando un algoritmo matemático, tal como BLAST (Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410). El porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch, que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de separación de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 (Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453). El porcentaje de homología entre dos secuencias de nucleótidos también se puede determinar usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de separación de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un experto en la materia puede realizar cálculos iniciales de homología y ajustar los parámetros del algoritmo en consecuencia. Un conjunto preferido de parámetros (y el que debería usarse si un profesional no estuviera seguro acerca de qué parámetros deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de una limitación de homología de las reivindicaciones) es una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por hueco extendido de 4 y una penalización por hueco de desplazamiento de fase de 5. Se conocen métodos adicionales de alineamiento de secuencias en las técnicas de biotecnología (véase, por ejemplo, Rosenberg (2005) *BMC Bioinformatics* 6:278; Altschul *et al.* (2005) *FEBS J.* 272(20):5101-5109).

La expresión "se hibrida en condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad media, alta rigurosidad o muy alta rigurosidad" describe condiciones de hibridación y lavado. Puede encontrarse orientación para llevar a cabo las reacciones de hibridación en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6. En esa referencia, se describen métodos acuosos y no acuosos, y puede usarse cualquier método. Las condiciones de

hibridación específicas citadas en el presente documento son las siguientes: (1) condiciones de hibridación de baja rigurosidad: 6x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de dos lavados en 0,2x SSC, SDS al 0,1 % al menos a 50 °C (la temperatura de los lavados se puede aumentar hasta 55 °C para condiciones de baja rigurosidad); (2) condiciones de hibridación de rigurosidad media: 6x SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2x SSC, SDS al 0,1 % a 60 °C; (3) condiciones de hibridación de alta rigurosidad: 6x SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2x SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C; y (4) condiciones de hibridación de muy alta rigurosidad: fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7 % a 65 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2x SSC, SDS al 1 % a 65 °C. Las condiciones de rigurosidad muy alta (4) son las condiciones preferidas a menos que se especifique lo contrario.

Un polipéptido "endógeno" se refiere a un polipéptido codificado por el genoma de la célula primaria (o célula hospedadora). Un polipéptido "exógeno" se refiere a un polipéptido que no está codificado por el genoma de la célula primaria. Una variante de polipéptido o polipéptido mutante es un ejemplo de un polipéptido exógeno. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico que no se produce de manera natural se considera que es exógena con respecto a la célula una vez introducida en la célula. Una molécula de ácido nucleico que se produce de manera natural también puede ser exógena con respecto a una célula particular. Por ejemplo, una secuencia codificante completa aislada de una célula X es un ácido nucleico exógeno con respecto a la célula Y una vez que la secuencia codificante se introduce en la célula Y, incluso si X e Y son el mismo tipo de célula.

El término "sobrexpresado" significa que se hace que un gen se transcriba a una tasa elevada en comparación con la tasa de transcripción endógena para ese gen. En algunos ejemplos, la sobreexpresión incluye adicionalmente una tasa elevada de traducción del gen en comparación con la tasa de traducción endógena para ese gen. En la técnica, se conocen bien métodos de ensayo para la sobreexpresión, por ejemplo, los niveles de ARN transcrito pueden evaluarse usando rtPCR y los niveles de proteína pueden evaluarse usando análisis en gel de SDS page.

El término "heterólogo" significa derivado de un organismo diferente, un tipo de célula diferente o diferentes especies. Como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia nucleotídica, polinucleotídica, polipeptídica o proteica, no presente de manera natural en un organismo dado. Por ejemplo, se puede introducir una secuencia polinucleotídica que es nativa de las cianobacterias en una célula hospedadora de *E. coli* mediante métodos recombinantes, y que el polinucleótido de las cianobacterias sea entonces heterólogo a la célula de *E. coli* (por ejemplo, célula recombinante). El término "heterólogo" también puede usarse con referencia a una secuencia nucleotídica, polinucleotídica, polipeptídica o proteica que está presente en una célula hospedadora recombinante en un estado no nativo. Por ejemplo, una secuencia nucleotídica, polinucleotídica, polipeptídica o proteica "heteróloga" puede modificarse con respecto a la secuencia de tipo silvestre presente de manera natural en la célula hospedadora de tipo silvestre correspondiente, por ejemplo, una modificación en el nivel de expresión o en la secuencia de un nucleótido, un polinucleótido, un polipéptido o una proteína.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" de un polipéptido se refiere a una parte más corta de un polipéptido o de una proteína de longitud completa que varía en tamaño desde dos restos de aminoácidos hasta la secuencia de aminoácidos completa menos un resto de aminoácido. En ciertas realizaciones de la divulgación, un fragmento se refiere a la secuencia de aminoácidos completa de un dominio de un polipéptido o de una proteína (por ejemplo, un dominio de unión al sustrato o un dominio catalítico).

El término "mutagénesis" se refiere a un proceso mediante el que la información genética de un organismo se cambia de manera estable. La mutagénesis de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína produce una proteína mutante. La mutagénesis también se refiere a cambios en las secuencias de ácido nucleico no codificantes que producen una actividad proteica modificada.

Una "mutación", como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio permanente en una posición de ácido nucleico de un gen o en una posición de aminoácido de un polipéptido o de una proteína. Las mutaciones incluyen sustituciones, adiciones, inserciones y eliminaciones. Por ejemplo, una mutación en una posición de aminoácido puede ser una sustitución de un tipo de aminoácido con otro tipo de aminoácido (por ejemplo, una serina (S) puede ser sustituida con una alanina (A); una lisina (L) puede ser sustituida con una treonina (T); etc.). Como tales, un polipéptido o una proteína puede tener una o más mutaciones en las que un aminoácido está sustituido con otro aminoácido.

Como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican un producto de ARN o un producto proteico, así como secuencias de ácido nucleico unidas operativamente que afectan a la expresión del ARN o proteína (por ejemplo, dichas secuencias incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras o potenciadoras) o secuencias de ácido nucleico unidas operativamente que codifican secuencias que afectan a la expresión del ARN o proteína (por ejemplo, dichas secuencias incluyen, pero sin limitación, sitios de unión a ribosomas o secuencias de control de la traducción).

Las secuencias de control de la expresión son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores de la transcripción, sitios de entrada al ribosoma internos (IRES, *Internal Ribosome Entry Sites*) y similares, que proporcionan la expresión de la secuencia polinucleotídica en una célula hospedadora. Las secuencias de control de la expresión interactúan específicamente con proteínas

celulares que participan en la transcripción (Maniatis *et al.*, (1987) *Science* 236:1237-1245). Se describen ejemplos de secuencias de control de la expresión en, por ejemplo, Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology", Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). En los métodos de la divulgación, una secuencia de control de la expresión está unida operativamente a una secuencia polinucleotídica. Por "unidas operativamente" se entiende que una secuencia polinucleotídica y una secuencia de control de la expresión están conectadas de manera que permiten la expresión génica cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) se unen a la secuencia de control de la expresión. Los promotores unidos operativamente se encuentran en dirección 5' de la secuencia polinucleotídica seleccionada en términos de la dirección de transcripción y traducción. Los potenciadores unidos operativamente se pueden ubicar en dirección 5', dentro o en dirección 3' del polinucleótido seleccionado.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico, es decir, una secuencia polinucleotídica, al que se ha unido. Un tipo de vector útil es un episoma (es decir, un ácido nucleico capaz de realizar la replicación extracromosómica). Los vectores útiles son aquellos capaces de realizar la replicación autónoma y/o expresión de los ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos operativamente se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante suelen estar en forma de "plásmidos", que generalmente se refieren a bucles circulares de ADN bicatenario que, en su forma vectorial, no están unidos al cromosoma. Se proporcionan otros vectores de expresión útiles en forma lineal. También se incluyen otras de dichas formas de vectores de expresión que cumplen funciones equivalentes y que se han dado a conocer en la técnica posteriormente a continuación. En algunas realizaciones, un vector recombinante incluye además un promotor unido operativamente a la secuencia polinucleotídica. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor regulado por el desarrollo, un promotor específico de orgánulo, un promotor específico de tejido, un promotor inducible, un promotor constitutivo o un promotor específico de célula. El vector recombinante normalmente comprende al menos una secuencia seleccionada entre una secuencia de control de la expresión acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia polinucleotídica; una secuencia marcadora acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; una fracción de purificación acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; y una secuencia de direccionamiento acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica. En ciertas realizaciones, la secuencia nucleotídica se incorpora de manera estable en el ADN genómico de la célula hospedadora, y la expresión de la secuencia nucleotídica está bajo el control de una región promotora regulada. Los vectores de expresión como se usan en el presente documento incluyen una secuencia polinucleotídica particular como se describe en el presente documento en una forma adecuada para la expresión de la secuencia polinucleotídica en una célula hospedadora. Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se vaya a transformar, el nivel de expresión del polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión descritos en el presente documento se pueden introducir en las células hospedadoras para producir polipéptidos, incluyendo los polipéptidos de fusión, codificados por las secuencias polinucleotídicas como se describe en el presente documento. La expresión de genes que codifican polipéptidos en procariotas, por ejemplo, *E. coli*, se realiza con mayor frecuencia con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos de fusión o no fusión. Los vectores de fusión agregan una cantidad de aminoácidos a un polipéptido codificado en los mismos, usualmente al extremo amino o carboxi del polipéptido recombinante. Dichos vectores de fusión normalmente sirven para uno o más de los tres siguientes propósitos, que incluyen para aumentar la expresión del polipéptido recombinante; para aumentar la solubilidad del polipéptido recombinante; y para ayudar en la purificación del polipéptido recombinante actuando como ligando en la purificación por afinidad. Con frecuencia, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión de la fracción de fusión y el polipéptido recombinante. Esto permite la separación del polipéptido recombinante de la fracción de fusión después de la purificación del polipéptido de fusión. En ciertas realizaciones, una secuencia polinucleotídica de la divulgación está unida operativamente a un promotor derivado del bacteriófago T5.

En ciertas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de levadura, y el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en levaduras *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari *et al.* (1987) *EMBO J.* 6: 229-234); pMFa (Kurjan *et al.* (1982) *Cell* 30:933-943); pJRY88 (Schultz *et al.* (1987) *Gene* 54: 113-123); pYES2 (Invitrogen Corp., San Diego, CA) y picZ (Invitrogen Corp., San Diego, CA). En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula de insecto, y el vector de expresión es un vector de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf9) incluyen, por ejemplo, la serie pAc (Smith *et al.* (1983) *Mol. Cell Biol.* 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow *et al.* (1989) *Virology* 170: 31-39). En otra realización más, las secuencias polinucleotídicas descritas en el presente documento pueden expresarse en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas son bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).

Como se usa en el presente documento, el término "CoA" o "acil-CoA" se refiere a un aciltoéster formado entre el átomo de carbono carbonílico de la cadena de alquilo y el grupo sulfhidrilo de la fracción 4'-fosfopantetonilo de la coenzima A (CoA), que tiene la fórmula R-C(O)S-CoA, donde R es cualquier grupo alquilo que tiene al menos 4 átomos

de carbono.

El término "ACP" significa proteína portadora de acilo. ACP es un vehículo altamente conservado de productos intermedios de acilo durante la biosíntesis de ácidos grasos, en donde la cadena de crecimiento se une durante la síntesis como un éster de tiol en el tiol distal de una fracción 4'-fosfopanteteína. La proteína existe en dos formas, es decir, apo-ACP (inactiva en la biosíntesis de ácidos grasos) y ACP u holo-ACP (activa en la biosíntesis de ácidos grasos). Los términos "ACP" y "holo-ACP" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la forma activa de la proteína. Una enzima denominada fosfopanteteiniltransferasa participa en la conversión de la apo-ACP inactiva en la holo-ACP activa. De manera más específica, la ACP se expresa en la forma inactiva de apo-ACP y una fracción 4'-fosfopanteteína debe unirse después de la traducción a un resto de serina conservado en la ACP por la acción de la proteína portadora sintasa de holo-acilo (ACPS), una fosfopanteteiniltransferasa, para producir holo-ACP.

Como se usa en el presente documento, el término "acil-ACP" se refiere a un aciltioéster formado entre el carbono carbonílico de una cadena de alquilo y el grupo sulfhidrilo de la fracción fosfopanteteinilo de una proteína portadora de acilo (ACP). En algunas realizaciones, una ACP es un producto intermedio en la síntesis de acil-ACP completamente saturadas. En otras realizaciones, una ACP es un producto intermedio en la síntesis de acil-ACP insaturadas. En algunas realizaciones, la cadena de carbono tendrá aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 átomos de carbono.

Como se usa en el presente documento, la expresión "derivado de ácido graso" significa un "ácido graso" o un "derivado de ácido graso", que pueden denominarse "ácido graso o derivado del mismo". El término "ácido graso" significa un ácido carboxílico que tiene la fórmula RCOOH . R representa un grupo alifático, preferentemente, un grupo alquilo. R puede incluir entre aproximadamente 4 y aproximadamente 22 átomos de carbono. Los ácidos grasos pueden estar saturados, monoinsaturados o poliinsaturados. Un "derivado de ácido graso" es un producto creado en parte a partir de la vía biosintética de ácidos grasos del organismo hospedador de producción (por ejemplo, célula hospedadora o microorganismo recombinante). "Derivados de ácidos grasos" incluye productos creados en parte a partir de ACP, acil-ACP o derivados de acil-ACP. Los ejemplos de derivados de ácidos grasos incluyen, por ejemplo, acil-CoA, ácidos grasos, aldehídos grasos, alcoholes de cadena corta y larga, alcoholes grasos, hidrocarburos, ésteres (por ejemplo, ceras, ésteres de ácidos grasos o ésteres grasos), olefinas terminales, olefinas internas, cetonas, así como ácidos grasos ω -OH y sus derivados de ácidos grasos ω -OH, incluidos los α,ω -diácidos y otros compuestos bifuncionales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vía biosintética de los ácidos grasos" significa una vía biosintética que produce ácidos grasos y derivados de los mismos. La vía biosintética de los ácidos grasos puede incluir enzimas adicionales para producir derivados de ácidos grasos que tengan las características deseadas.

El grupo R de un ácido graso puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada. Las cadenas ramificadas pueden tener más de un punto de ramificación y pueden incluir ramificaciones cíclicas. En algunas realizaciones, el ácido graso ramificado es un ácido graso C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23} , C_{24} , C_{25} o C_{26} ramificado. En otras realizaciones, el ácido graso ramificado es un ácido graso C_6 , C_8 , C_{10} , C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} o C_{20} ramificado. En ciertas realizaciones, el grupo hidroxilo (OH) del ácido graso ramificado está en la posición omega (ω). En ciertas realizaciones, el ácido graso ramificado es un ácido iso-graso o un ácido anteiso-graso. En realizaciones ilustrativas, el ácido graso ramificado se selecciona entre ácido graso iso- $\text{C}_{7:0}$, iso- $\text{C}_{8:0}$, iso- $\text{C}_{9:0}$, iso- $\text{C}_{10:0}$, iso- $\text{C}_{11:0}$, iso- $\text{C}_{12:0}$, iso- $\text{C}_{13:0}$, iso- $\text{C}_{14:0}$, iso- $\text{C}_{15:0}$, iso- $\text{C}_{16:0}$, iso- $\text{C}_{17:0}$, iso- $\text{C}_{18:0}$, iso- $\text{C}_{19:0}$, iso- $\text{C}_{20:0}$, anteiso- $\text{C}_{7:0}$, anteiso- $\text{C}_{9:0}$, anteiso- $\text{C}_{11:0}$, anteiso- $\text{C}_{13:0}$, anteiso- $\text{C}_{15:0}$, anteiso- $\text{C}_{17:0}$ y anteiso- $\text{C}_{19:0}$ ramificado.

El grupo R de un ácido graso puede estar saturado o insaturado. Si está insaturado, el grupo R puede tener uno o más de un punto de insaturación. En algunas realizaciones, el ácido graso insaturado es un ácido graso monoinsaturado. En ciertas realizaciones, el ácido graso insaturado es un ácido graso $\text{C}_{8:1}$, $\text{C}_{9:1}$, $\text{C}_{10:1}$, $\text{C}_{11:1}$, $\text{C}_{12:1}$, $\text{C}_{13:1}$, $\text{C}_{14:1}$, $\text{C}_{15:1}$, $\text{C}_{16:1}$, $\text{C}_{17:1}$, $\text{C}_{18:1}$, $\text{C}_{19:1}$, $\text{C}_{20:1}$, $\text{C}_{21:1}$, $\text{C}_{22:1}$, $\text{C}_{23:1}$, $\text{C}_{24:1}$, $\text{C}_{25:1}$ o $\text{C}_{26:1}$ insaturado. En ciertas realizaciones, el ácido graso insaturado es $\text{C}_{8:1}$, $\text{C}_{10:1}$, $\text{C}_{12:1}$, $\text{C}_{14:1}$, $\text{C}_{16:1}$, $\text{C}_{18:1}$ o $\text{C}_{20:1}$. En otras realizaciones más, el ácido graso insaturado está insaturado en la posición omega-7. En ciertas realizaciones, el ácido graso insaturado tiene un doble enlace *cis*.

Como se usa en el presente documento, una "célula hospedadora recombinante" o "célula hospedadora diseñada genéticamente" es una célula hospedadora, por ejemplo, un microorganismo que se ha modificado de modo que produce ácidos grasos ω -hidroxilados y derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados, incluidos derivados de ácidos grasos bifuncionales. En algunas realizaciones, la célula hospedadora recombinante incluye uno o más polinucleótidos, cada polinucleótido codifica un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa o una variante del mismo que tiene actividad de enzima biosintética ω -hidroxilasa, en donde la célula hospedadora recombinante produce un ácido graso ω -hidroxilado y/o un derivado de ácido graso ω -hidroxilado, o una composición del mismo, cuando se cultiva en presencia de una fuente de carbono en condiciones eficaces para expresar los polinucleótidos.

Como se usa en el presente documento, el término "clon" normalmente se refiere a una célula o a un grupo de células descendientes de y esencialmente idénticas genéticamente a un único ancestro común, por ejemplo, las bacterias de una colonia bacteriana clonada surgieron de una sola célula bacteriana.

Como se usa en el presente documento, el término "cultivo" normalmente se refiere a un medio líquido que comprende células viables. En una realización, un cultivo comprende células que se reproducen en un medio de cultivo predeterminado en condiciones controladas, por ejemplo, un cultivo de células hospedadoras recombinantes cultivadas en medios líquidos que comprenden una fuente de carbono seleccionada y/o nitrógeno.

Los términos "cultivar" o "cultivo" se refieren al crecimiento de una población de células (por ejemplo, células microbianas) en condiciones adecuadas en un medio líquido o sólido. En realizaciones particulares, cultivar se refiere a la bioconversión fermentativa de un sustrato hasta la obtención de un producto final. Los medios de cultivo son bien conocidos, y los componentes individuales de dichos medios de cultivo están disponibles en fuentes comerciales, por ejemplo, en los medios DIFCO y en los medios BBL. En un ejemplo no limitante, el medio de nutrientes acuoso es un "medio rico" que comprende fuentes complejas de nitrógeno, sales y carbono, tales como el medio YP, que comprende 10 g/l de peptona y 10 g/l de extracto de levadura de dicho medio. Además, la célula hospedadora puede diseñarse genéticamente para asimilar carbono de manera eficaz y usar materiales celulósicos como fuentes de carbono de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.000.000; 5.028.539; 5.424.202; 5.482.846; 5.602.030 y WO2010127318. Además, la célula hospedadora se puede diseñar genéticamente para expresar una invertasa a fin de poderse usar la sacarosa como fuente de carbono.

Como se usa en el presente documento, la expresión "en condiciones eficaces para expresar dichas secuencias nucleotídicas heterólogas" significa cualquier condición que permita que una célula hospedadora produzca un derivado de ácido graso deseado (por ejemplo, ácido graso ω -OH y/o derivado de ácido graso ω -OH). Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, las condiciones de fermentación.

Como se usa en el presente documento, actividad "modificada" o un "nivel alterado de" actividad de una proteína, por ejemplo, una enzima, en una célula hospedadora recombinante se refiere a una diferencia en una o más características en la actividad determinada en relación con la célula hospedadora primaria o nativa. Por lo general, las diferencias en la actividad se determinan entre una célula hospedadora recombinante, que tiene actividad modificada y la célula hospedadora de tipo silvestre correspondiente (por ejemplo, comparación de un cultivo de una célula hospedadora recombinante con respecto a la célula hospedadora de tipo silvestre). Las actividades modificadas pueden ser el resultado de, por ejemplo, cantidades modificadas de proteína expresadas por una célula hospedadora recombinante (por ejemplo, como resultado del aumento o de la disminución del número de copias de secuencias de ADN que codifican la proteína, aumento o disminución del número de transcripciones de ARNm que codifican la proteína, y/o aumento o disminución de las cantidades de traducción proteica de la proteína a partir del ARNm); cambios en la estructura de la proteína (por ejemplo, cambios en la estructura primaria, tales como, cambios en la secuencia de codificación de la proteína que producen cambios en la especificidad del sustrato, cambios en los parámetros cinéticos observados); y cambios en la estabilidad de la proteína (por ejemplo, aumento o disminución de la degradación de la proteína). En algunas realizaciones, el polipéptido es un mutante o una variante de cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento. En determinados casos, la secuencia de codificación para los polipéptidos como se describen en el presente documento son de codones optimizados para la expresión en una célula hospedadora en particular. Por ejemplo, para la expresión en *E. coli*, se pueden optimizar uno o más codones (Grosjean *et al.* (1982) *Gene* 18: 199-209).

La expresión "secuencias reguladoras", como se usa en el presente documento, normalmente se refiere a una secuencia de bases en el ADN, unida operativamente a secuencias de ADN que codifican una proteína que finalmente controla la expresión de la proteína. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras de ARN, secuencias de unión de factor de transcripción, secuencias de terminación de la transcripción, moduladores de la transcripción (tales como elementos potenciadores), secuencias de nucleótidos que afectan a la estabilidad del ARN y secuencias reguladoras de la traducción (tales como sitios de unión a ribosomas (por ejemplo, secuencias de Shine-Dalgarno en procariotas o secuencias de Kozak en eucariotas), codones de inicio, codones de terminación).

Como se usa en el presente documento, la expresión "la expresión de dicha secuencia de nucleótidos se modifica con respecto a la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre", significa un aumento o una disminución en el nivel de expresión y/o la actividad de una secuencia de nucleótidos endógena o la expresión y/o actividad de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido heterólogo o no nativo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "la actividad de una variante de secuencia de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se modifica en relación con la actividad de una secuencia de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa" (es decir, un molde de polipéptido) significa un aumento o una disminución del nivel de actividad de una variante de secuencia de polipéptido expresada en comparación con un molde de secuencia de polipéptido expresada. El molde de polipéptido está codificado por un molde de ácido nucleico (es decir, una secuencia de molde de ADN). Un ejemplo de un molde de secuencia de polipéptido es la secuencia de proteína de fusión híbrida de cyp153A-RedRhF, en donde cyp153A se fusiona con un dominio reductasa. Otro ejemplo de un molde de secuencia de polipéptido es SEQ ID NO: 6. Otro ejemplo de un molde de secuencia de polipéptido es SEQ ID NO: 38. Cualquier secuencia de polipéptido puede servir como un molde que incluye variantes.

Como se usa en el presente documento, el término "expresar" con respecto a un polinucleótido es hacer que funcione. Un polinucleótido que codifica un polipéptido (o una proteína), cuando se expresa, se transcribirá o se traducirá para producir ese polipéptido (o esa proteína). Como se usa en el presente documento, el término "sobrexexpresar" significa expresar (o hacer que se exprese) un polinucleótido o polipéptido en una célula a una concentración superior a la expresada normalmente en una célula de tipo silvestre correspondiente en las mismas condiciones. En otra realización, el término "sobrexexpresar" significa expresar (o hacer que se exprese) un polinucleótido o polipéptido en una célula a una concentración superior la que normalmente se expresa en una célula correspondiente que expresa la secuencia de polinucleótido molde o polipéptido molde en las mismas condiciones. Un ejemplo de una secuencia de polipéptido molde es el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-RedRhF.

La expresión "nivel de expresión alterado" y "nivel de expresión modificado" se usan indistintamente, y significan que un polinucleótido, polipéptido o derivado de ácido graso está presente a una concentración diferente en una célula hospedadora modificada en comparación con su concentración en una célula de tipo silvestre correspondiente en las mismas condiciones.

Como se usa en el presente documento, el término "título" se refiere a la cantidad de ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH producidos por unidad de volumen de cultivo de células hospedadoras. En cualquier aspecto de las composiciones y de los métodos descritos en el presente documento, se produce un ácido graso ω -OH y/o un derivado de ácido graso ω -OH a un título de aproximadamente 25 mg/l, aproximadamente 50 mg/l, aproximadamente 75 mg/l, aproximadamente 100 mg/l, aproximadamente 125 mg/l, aproximadamente 150 mg/l, aproximadamente 175 mg/l, aproximadamente 200 mg/l, aproximadamente 225 mg/l, aproximadamente 250 mg/l, aproximadamente 275 mg/l, aproximadamente 300 mg/l, aproximadamente 325 mg/l, aproximadamente 350 mg/l, aproximadamente 375 mg/l, aproximadamente 400 mg/l, aproximadamente 425 mg/l, aproximadamente 450 mg/l, aproximadamente 475 mg/l, aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 525 mg/l, aproximadamente 550 mg/l, aproximadamente 575 mg/l, aproximadamente 600 mg/l, aproximadamente 625 mg/l, aproximadamente 650 mg/l, aproximadamente 675 mg/l, aproximadamente 700 mg/l, aproximadamente 725 mg/l, aproximadamente 750 mg/l, aproximadamente 775 mg/l, aproximadamente 800 mg/l, aproximadamente 825 mg/l, aproximadamente 850 mg/l, aproximadamente 875 mg/l, aproximadamente 900 mg/l, aproximadamente 925 mg/l, aproximadamente 950 mg/l, aproximadamente 975 mg/l, aproximadamente 1000 mg/l, aproximadamente 1050 mg/l, aproximadamente 1075 mg/l, aproximadamente 1100 mg/l, aproximadamente 1125 mg/l, aproximadamente 1150 mg/l, aproximadamente 1175 mg/l, aproximadamente 1200 mg/l, aproximadamente 1225 mg/l, aproximadamente 1250 mg/l, aproximadamente 1275 mg/l, aproximadamente 1300 mg/l, aproximadamente 1325 mg/l, aproximadamente 1350 mg/l, aproximadamente 1375 mg/l, aproximadamente 1400 mg/l, aproximadamente 1425 mg/l, aproximadamente 1450 mg/l, aproximadamente 1475 mg/l, aproximadamente 1500 mg/l, aproximadamente 1525 mg/l, aproximadamente 1550 mg/l, aproximadamente 1575 mg/l, aproximadamente 1600 mg/l, aproximadamente 1625 mg/l, aproximadamente 1650 mg/l, aproximadamente 1675 mg/l, aproximadamente 1700 mg/l, aproximadamente 1725 mg/l, aproximadamente 1750 mg/l, aproximadamente 1775 mg/l, aproximadamente 1800 mg/l, aproximadamente 1825 mg/l, aproximadamente 1850 mg/l, aproximadamente 1875 mg/l, aproximadamente 1900 mg/l, aproximadamente 1925 mg/l, aproximadamente 1950 mg/l, aproximadamente 1975 mg/l, aproximadamente 2000 mg/l (2 g/l, 3 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l) o un intervalo limitado por cualquiera de los dos valores anteriores. En otras realizaciones, se produce un ácido graso ω -OH y/o un derivado de ácido graso ω -OH a un título de más de 100 g/l, más de 200 g/l, más de 300 g/l o superior, tal como 500 g/l, 700 g/l, 1000 g/l, 1200 g/l, 1500 g/l o 2000 g/l. En una realización, el título de un ácido graso ω -OH y/o un derivado de ácido graso ω -OH producido por una célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la divulgación es de 5 g/l a 200 g/l, de 10 g/l a 150 g/l, de 20 g/l a 120 g/l, de 25 g/l a 110 g/l y de 30 g/l a 100 g/l.

Como se usa en el presente documento, la expresión "rendimiento de los ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH producidos por una célula hospedadora" se refiere a la eficacia con la que una fuente de carbono de entrada se convierte en producto (es decir, ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH) en una célula hospedadora. Las células hospedadoras diseñadas genéticamente para producir ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH de acuerdo con los métodos de la divulgación tienen un rendimiento de al menos el 3 %, al menos el 4 %, al menos el 5 %, al menos el 6 %, al menos el 7 %, al menos el 8 %, al menos el 9 %, al menos el 10 %, al menos el 11 %, al menos el 12 %, al menos el 13 %, al menos el 14 %, al menos el 15 %, al menos el 16 %, al menos el 17 %, al menos el 18 %, al menos el 19 %, al menos el 20 %, al menos el 21 %, al menos el 22 %, al menos el 23 %, al menos el 24 %, al menos el 25 %, al menos el 26 %, al menos el 27 %, al menos el 28 %, al menos el 29 % o al menos el 30 % o un intervalo delimitado por dos valores cualquiera de los anteriores. En otras realizaciones, se produce un ácido graso ω -OH y/o un derivado de ácido graso ω -OH con un rendimiento de más del 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o superior. Como alternativa, o además, el rendimiento es de aproximadamente el 30 % o inferior, aproximadamente el 27 % o inferior, aproximadamente el 25 % o inferior, o aproximadamente el 22 % o inferior. Por lo tanto, el rendimiento puede estar limitado por dos cualquiera de los criterios de valoración anteriores. Por ejemplo, el rendimiento de un ácido graso ω -OH y/o un derivado de ácido graso ω -OH producido por la célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la divulgación puede ser del 5 % al 15 %, del 10 % al 25 %, del 10 % al 22 %, del 15 % al 27 %, del 18 % al 22 %, del 20 % al 28 %, del 20 % al 30 %, del 25 % al 40 % o superior. Un ejemplo de un rendimiento preferido de un ácido graso ω -OH y/o un derivado de ácido graso ω -OH producido por la célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la divulgación es del 10 % al 30 %.

Otro ejemplo de un rendimiento preferido de un ácido graso ω -OH y/o un derivado de ácido graso ω -OH producido por la célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la divulgación es del 10 % al 40 %. Otro ejemplo de un rendimiento preferido de un ácido graso ω -OH y/o un derivado de ácido graso ω -OH producido por la célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la divulgación es del 10 % al 50 %.

Como se usa en el presente documento, el término "productividad" se refiere a la cantidad de ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH producidos por unidad de volumen de cultivo de células hospedadoras por unidad de tiempo. En cualquier aspecto de las composiciones y de los métodos descritos en el presente documento, la productividad de un ácido graso ω -OH y/o un derivado de ácido graso ω -OH producido por una célula hospedadora recombinante es de al menos 100 mg/l/hora, al menos 200 mg/l/hora, al menos 300 mg/l/hora, al menos 400 mg/l/hora, al menos 500 mg/l/hora, al menos 600 mg/l/hora, al menos 700 mg/l/hora, al menos 800 mg/l/hora, al menos 900 mg/l/hora, al menos 1000 mg/l/hora, al menos 1100 mg/l/hora, al menos 1200 mg/l/hora, al menos 1300 mg/l/hora, al menos 1400 mg/l/hora, al menos 1500 mg/l/hora, al menos 1600 mg/l/hora, al menos 1700 mg/l/hora, al menos 1800 mg/l/hora, al menos 1900 mg/l/hora, al menos 2000 mg/l/hora, al menos 2100 mg/l/hora, al menos 2200 mg/l/hora, al menos 2300 mg/l/hora, al menos 2400 mg/l/hora o al menos 2500 mg/l/hora. Además, la productividad puede ser de 2500 mg/l/hora o inferior, 2000 mg/l/DO₆₀₀ o inferior, 1500 mg/l/DO₆₀₀ o inferior, 120 mg/l/hora o inferior, 1000 mg/l/hora o inferior, 800 mg/l/hora o inferior, o 600 mg/l/hora o inferior. Por lo tanto, la productividad puede estar limitada por dos cualquiera de los criterios de valoración anteriores. Por ejemplo, la productividad puede ser de 3 a 30 mg/l/hora, de 6 a 20 mg/l/hora o de 15 a 30 mg/l/hora. La productividad preferida de un ácido graso ω -OH y/o un derivado de ácido graso ω -OH producido por una célula hospedadora recombinante de acuerdo con los métodos de la divulgación se selecciona entre de 500 mg/l/hora a 2500 mg/l/hora, o de 700 mg/l/hora a 2000 mg/l/hora.

Las expresiones "especies grasas totales (FAS)" y "producto de ácidos grasos totales" se pueden usar indistintamente en el presente documento con referencia a la cantidad total de ácidos grasos ω -OH y ácidos grasos presentes en una muestra evaluada por GC-FID como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional WO 2008/119082.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tasa de utilización de glucosa" significa la cantidad de glucosa usada por el cultivo por unidad de tiempo, indicada como gramos/litro/hora (g/l/h).

La expresión "fuente de carbono de una materia prima renovable", cuando se usa sola o en referencia a una fuente de alimentación incluye cualquier material biológico (incluidas las materias primas renovables y/o la biomasa y/o los productos de desecho) de los que se deriva el carbono, excepto los productos oleoquímicos (es decir, aceites refinados de plantas y animales tales como ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, TAG, ácidos grasos hidroxil y similares) y productos petroquímicos (es decir, productos químicos derivados del petróleo tales como alcanos, alquenos y similares). Por lo tanto, la expresión "fuente de carbono de una materia prima renovable", como se usa en el presente documento, excluye el carbono derivado de productos oleoquímicos y petroquímicos. En algunas realizaciones, la fuente de carbono incluye azúcares o carbohidratos (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos o polisacáridos). En algunas realizaciones, la fuente de carbono es glucosa y/o sacarosa. En otras realizaciones, la fuente de carbono se deriva de una materia prima renovable tal como carbohidratos de maíz, caña de azúcar o biomasa lignocelulósica; o productos de desecho tales como glicerol, gas de escape, gas de síntesis; o la reforma de materiales orgánicos tales como biomasa o gas natural; o es dióxido de carbono que se fija fotosintéticamente. En otras realizaciones, una biomasa se procesa en una fuente de carbono, que es adecuada para la bioconversión. En otras realizaciones más, la biomasa no requiere un procesamiento adicional en una fuente de carbono, sino que puede usarse directamente como fuente de carbono. Una fuente ilustrativa de dicha biomasa es materia vegetal o vegetación, tal como césped. Otra fuente de carbono ilustrativa incluye productos de desecho metabólico, tales como materia animal (por ejemplo, estiércol de vaca). Otras fuentes ilustrativas de carbono incluyen algas y otras plantas marinas. Otra fuente de carbono (incluida la biomasa) incluye productos de desecho de la industria, la agricultura, la silvicultura y los hogares, incluidos, pero sin limitación, desechos de fermentación, biomasa de fermentación, glicerol/glicerina, ensilado, paja, madera, aguas residuales, basura, desechos sólidos manipulados, residuos urbanos celulósicos y restos de comida.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado", con respecto a productos tales como ácidos grasos ω -OH y sus derivados se refiere a productos que están separados de los componentes celulares, medios de cultivo celular, o precursores químicos o sintéticos. Los ácidos grasos y sus derivados (por ejemplo, ácido graso ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH) producidos mediante los métodos descritos en el presente documento pueden ser relativamente inmiscibles en el caldo de fermentación, así como en el citoplasma. Por lo tanto, los ácidos grasos y sus derivados pueden acumularse en una fase orgánica, ya sea intracelular o extracelularmente.

Como se usa en el presente documento, Los términos "purificar", "purificado/a" o "purificación" significan la eliminación o el aislamiento de una molécula de su entorno mediante, por ejemplo, aislamiento o separación. Las moléculas "esencialmente purificadas" están al menos aproximadamente un 60 % libres (por ejemplo, al menos aproximadamente un 70 % libres, al menos aproximadamente un 75 % libres, al menos aproximadamente un 85 % libres, al menos aproximadamente un 90 % libres, al menos aproximadamente un 95 % libres, al menos aproximadamente un 97 % libres, al menos aproximadamente un 99 % libres) de otros componentes con los que están asociados. Como se usa en el presente documento, estos términos también se refieren a la eliminación de

contaminantes de una muestra. Por ejemplo, la eliminación de contaminantes puede producir un aumento en el porcentaje de derivados de ácidos grasos tales como ácido graso ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH en una muestra. Por ejemplo, cuando se produce un derivado de ácido graso en una célula hospedadora recombinante, el derivado de ácido graso puede purificarse mediante la eliminación de proteínas de la célula hospedadora u otros materiales de la célula hospedadora. Después de la purificación, el porcentaje de derivado de ácido graso en la muestra aumenta. Los términos "purificar", "purificado/a" y "purificación" son términos relativos que no requieren una pureza absoluta. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se produce un derivado de ácido graso en células hospedadoras recombinantes, un derivado de ácido graso purificado es un derivado de ácido graso que está sustancialmente separado de otros componentes celulares (por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, lípidos, carbohidratos u otros hidrocarburos).

Producción de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos omega-hidroxilados

La divulgación proporciona la producción de ácidos grasos ω -OH y derivados de ácidos grasos ω -OH en una célula hospedadora. La producción de ácido graso ω -OH puede potenciarse como resultado de la expresión de una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa. Las variantes del polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa producen los derivados y las composiciones de ácido graso ω -OH en un título alto. En el presente documento, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa participa en una vía biosintética para la producción de derivados de ácidos grasos ω -OH; se puede usar sola o en combinación con otras enzimas. Por ejemplo, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se puede usar en una vía biosintética diseñada en donde una enzima tioesterasa (es decir, expresada de forma natural o heteróloga) convierte una acil-ACP en un ácido graso. La variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa puede convertir el ácido graso en un ácido graso ω -OH (véase la Figura 1). Enzimas adicionales en la vía pueden convertir los ácidos grasos ω -OH en otros derivados de ácidos grasos bifuncionales tales como α,ω -diácidos.

De manera más específica, un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es una secuencia de polipéptido que tiene al menos el 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 y sirve como una secuencia molde para introducir mutaciones con el fin de crear variantes con actividad enzimática mejorada para la producción de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos ω -OH. El polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es autosuficiente y posee actividad enzimática ω -hidroxilasa que cataliza la reacción de un ácido graso a un ácido graso ω -OH. Un ejemplo de un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es un polipéptido de fusión híbrida de tipo cyp153A-RedRhF. En una realización, la expresión variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se refiere a un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa modificado que tiene al menos una mutación en su secuencia de aminoácidos que incluye, pero sin limitación, una mutación en la posición de aminoácido 796, 141, 231, 27, 82, 178, 309, 407, 415, 516 y 666 o una combinación de los mismos. La expresión de la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en células hospedadoras recombinantes produce un título, un rendimiento y/o una productividad mejorados de ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH o composiciones de los mismos en comparación con la expresión del polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en una célula hospedadora correspondiente.

Un ejemplo de una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es SEQ ID NO: 38, que tiene una mutación en la posición 796, en donde una alanina se reemplaza con una valina. Esta variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene una secuencia de polipéptido que tiene al menos el 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 38 y además sirve como una secuencia molde para crear mutaciones adicionales o variantes adicionales. De manera similar, Esta variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es autosuficiente y posee actividad enzimática ω -hidroxilasa que cataliza la reacción de un ácido graso a un ácido graso ω -OH. En una realización, la expresión variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se refiere a un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa modificado que tiene al menos una mutación adicional en su secuencia de aminoácidos que incluye, pero sin limitación, una mutación en la posición de aminoácido 747, 12, 327, 14, 61, 28, 13, 771, 119, 10, 11, 28, 745, 9, 770, 413, 784, 749, 231, 233, 757 y 703 o una combinación de los mismos. La expresión de la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en células hospedadoras recombinantes produce un título, un rendimiento y/o una productividad mejorados de ácidos grasos ω -OH y/o derivados de ácidos grasos ω -OH en comparación con la expresión del polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa (SEQ ID NO: 6) en una célula hospedadora correspondiente.

Cuando una célula se ha transformado con una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa, es una célula que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa (por ejemplo, una célula recombinante). En una realización, el título y/o el rendimiento de un ácido graso ω -OH producido por una célula que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es al menos el doble que el de una célula correspondiente que expresa el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa. En un hospedador tal como *Escherichia coli*, los ácidos grasos ω -OH pueden convertirse en derivados de ácidos grasos bifuncionales mediante enzimas expresadas de forma natural o heteróloga. En otra realización, el título y/o el rendimiento de un ácido graso ω -OH o derivado del mismo producido por una célula que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrida de

CYP153A-reductasa es al menos aproximadamente 1 vez, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces o al menos aproximadamente 10 veces superior al de una célula correspondiente que expresa el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa. En una realización, el título y/o el rendimiento de un ácido graso ω -OH o derivado del mismo producido por una célula que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es al menos aproximadamente el 1 por ciento, al menos aproximadamente el 2 por ciento, al menos aproximadamente el 3 por ciento, al menos aproximadamente el 4 por ciento, al menos aproximadamente el 5 por ciento, al menos aproximadamente el 6 por ciento, al menos aproximadamente el 7 por ciento, al menos aproximadamente el 8 por ciento, al menos aproximadamente el 9 por ciento o al menos aproximadamente el 10 por ciento superior al de una célula correspondiente que expresa el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa. En otra realización, el título y/o el rendimiento de un ácido graso ω -OH o derivado del mismo producido en una célula recombinante debido a la expresión de una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es al menos aproximadamente el 20 por ciento a al menos aproximadamente el 80 por ciento superior al de una célula correspondiente que expresa el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa. En algunas realizaciones, el título y/o el rendimiento de un ácido graso ω -OH producido por una célula es al menos aproximadamente el 20 por ciento, al menos aproximadamente el 25 por ciento, al menos aproximadamente el 30 por ciento, al menos aproximadamente el 35 por ciento, al menos aproximadamente el 40 por ciento, al menos aproximadamente el 45 por ciento, al menos aproximadamente el 50 por ciento, al menos aproximadamente el 55 por ciento, al menos aproximadamente el 60 por ciento, al menos aproximadamente el 65 por ciento, al menos aproximadamente el 70 por ciento, al menos aproximadamente el 75 por ciento, al menos aproximadamente el 80 por ciento, al menos aproximadamente el 85 por ciento, al menos aproximadamente el 90 por ciento, al menos aproximadamente el 95 por ciento, al menos aproximadamente el 97 por ciento, al menos aproximadamente el 98 por ciento o al menos aproximadamente el 100 por ciento superior al de la célula correspondiente que expresa el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa.

Por lo tanto, la divulgación proporciona células hospedadoras recombinantes, que se han diseñado genéticamente para expresar una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa para producir ácidos grasos ω -OH o derivados de los mismos. La biosíntesis de los ácidos grasos ω -OH se mejora en relación con las células hospedadoras que expresan el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa, es decir, células hospedadoras que expresan el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa basado en SEQ ID NO: 6 (es decir, polipéptido molde) u otros polipéptidos con la misma función enzimática. Se puede modificar una variedad de células hospedadoras diferentes para expresar una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tal como las descritas en el presente documento, dando lugar a células hospedadoras recombinantes adecuadas para la producción mejorada de ácido graso ω -OH y derivados de ácidos grasos ω -OH, o composiciones del mismo. Los ejemplos de ácidos grasos ω -OH que se producen son ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1}. En una realización, dichos ácidos grasos ω -OH son ácidos grasos C_{8:0} ω -OH, ácidos grasos C_{10:0} ω -OH, ácidos grasos C_{12:0} ω -OH, ácidos grasos C_{14:0} ω -OH, ácidos grasos C_{16:0} ω -OH, ácidos grasos C_{18:0} ω -OH, ácidos grasos C_{20:0} ω -OH, ácidos grasos C_{8:1} ω -OH, ácidos grasos C_{10:1} ω -OH, ácidos grasos C_{12:1} ω -OH, ácidos grasos C_{14:1} ω -OH, ácidos grasos C_{16:1} ω -OH, ácidos grasos C_{18:1} ω -OH, ácidos grasos C_{20:1} ω -OH, y similares. Se entiende que una variedad de células puede proporcionar fuentes de material genético, incluyendo secuencias polinucleotídicas que codifican polipéptidos adecuados para usar en una célula hospedadora recombinante como se describe en el presente documento.

45 **Diseño mediante ingeniería genética de vías y actividades enzimáticas**

La síntesis de ácidos grasos es uno de los sistemas más conservados de la maquinaria biosintética bacteriana. El complejo de múltiples enzimas de la ácido graso sintasa (FAS, *Fatty Acid Synthase*) está presente en todas las bacterias y organismos eucariotas. La mayoría de los genes relacionados con la FAS son indispensables para el crecimiento y la supervivencia de las células. La FAS eucariota y bacteriana conducen esencialmente el mismo tipo de transformación bioquímica. En eucariotas, la FAS se conoce como FASI, y la mayoría de sus dominios catalíticos están codificados por una cadena polipeptídica (no disociable). En procariotas tales como las bacterias, FAS se conoce como FASII y sus enzimas individuales y proteínas portadoras están codificadas por genes separados que codifican proteínas diferenciadas (disociables). Como tal, FASII es un sistema complejo con variaciones significativas y distintas peculiaridades.

La proteína portadora de acilo (ACP) junto con las enzimas en una vía de FAS controlan la longitud, el grado de saturación y de ramificación de los ácidos grasos producidos en un organismo nativo. Las etapas de esta vía son catalizadas por enzimas de las familias de genes de biosíntesis de ácidos grasos (FAB) y acetil-CoA carboxilasa (ACC, *Acetyl-CoA Carboxylase*). Por ejemplo, las enzimas que pueden incluirse en una vía FAS incluyen AccABCD, FabD, FabH, FabG, FabA, FabZ, FabI, FabK, FabL, FabM, FabB y FabF. Dependiendo del producto deseado, uno o más de estos genes pueden atenuarse o sobreexpresarse. Como tal, Se han diseñado genéticamente procariotas para aumentar la producción de derivados de ácidos grasos a partir de materias primas renovables tales como glucosa u otras fuentes de carbono. En el presente documento, la objetivo principal es aumentar la actividad de las enzimas de control clave que regulan la producción de derivados de ácidos grasos para convertir la cepa bacteriana en una fábrica de microbios para la producción de derivados de ácidos grasos, incluidos ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME,

Fatty Acid Methyl Esters), ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE, *Fatty Acid Ethyl Esters*) y alcoholes grasos (FALC, *FAtty AlCohols*) (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 8.283.143).

La presente divulgación identifica polinucleótidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que codifican polipéptidos de función enzimática para modificar vías enzimáticas para la producción de compuestos deseables tales como ácidos grasos ω -OH y derivados de ácidos grasos ω -OH. Estos polipéptidos, que se identifican en el presente documento por los números de registro de enzimas (números CE), son útiles para diseñar genéticamente vías de ácidos grasos que conducen a la producción de ácidos grasos ω -OH y otras moléculas bifuncionales tales como derivados de ácidos grasos ω -OH como los α,ω -diácidos (véase la Figura 1).

En una realización, en la Figura 1, se representan vías que usan una fuente de carbono derivada de una materia prima renovable como la glucosa para producir derivados de ácidos grasos ω -OP. Un carbohidrato (por ejemplo, la glucosa) es convertido en un acil-tioéster tal como un acil-ACP por el organismo nativo (véase la etapa 1 de la Figura 1). Los polinucleótidos que codifican polipéptidos con actividad enzimática de degradación de ácidos grasos pueden atenuarse opcionalmente dependiendo del producto deseado (véanse el apartado de Ejemplos, más adelante). Son ejemplos no limitantes de dichos polipéptidos la acil-CoA sintetasa (FadD) y la acil-CoA deshidrogenasa (FadE). La Tabla 1 proporciona una lista completa de la actividad enzimática (más adelante) dentro de la vía metabólica, incluyendo distintas enzimas de degradación de ácidos grasos que pueden atenuarse opcionalmente de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 8.283.143, mencionada anteriormente).

Por ejemplo, FadR (véase la Tabla 1, más adelante) es un factor regulador clave que participa en la degradación de los ácidos grasos y las vías biosintéticas de los ácidos grasos (Cronan *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 29(4), 937-943 (1998)). La enzima FadD de *E. coli* (véase la Tabla 1, más adelante) y la proteína transportadora de ácidos grasos FadI son componentes de un sistema de absorción de ácidos grasos. FadI media el transporte de los ácidos grasos a la célula bacteriana, y FadD media la formación de acil-CoA ésteres. Cuando no hay otra fuente de carbono disponible, los ácidos grasos exógenos son absorbidos por bacterias y convertidos en acil-CoA ésteres, que puede unirse al factor de transcripción FadR y deprimir la expresión de los genes *fad* que codifican las proteínas responsables del transporte (FadI), de la activación (FadD) y de la β -oxidación (FadA, FadB y FadE) de los ácidos grasos. Cuando hay fuentes alternativas de carbono disponibles, las bacterias sintetizan ácidos grasos como acil-ACP, que se usan para la síntesis de fosfolípidos, pero no son sustratos para la β -oxidación. Por lo tanto, la acil-CoA y la acil-ACP son fuentes independientes de ácidos grasos que pueden dar lugar a diferentes productos finales (Caviglia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279(12): 1163-1169 (2004)).

Tabla 1: Actividades enzimáticas

Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
Aumento de la producción de ácido graso					
accA	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad A (carboxiltransferasa alfa)	AAC73296, NP_414727	6.4.1.2	aumento de la producción de Malonil-CoA
accB	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad B (BCCP: proteína portadora de carboxilo de biotina)	NP_417721	6.4.1.2	aumento de la producción de Malonil-CoA
accC	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad C (biotina carboxilasa)	NP_417722	6.4.1.2, 6.3.4.14	aumento de la producción de Malonil-CoA
accD	<i>E. coli</i> , <i>Lactococci</i>	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad D (carboxiltransferasa beta)	NP_416819	6.4.1.2	aumento de la producción de Malonil-CoA
fadD	<i>E. coli</i> W3110	acil-CoA sintasa	AP_002424	2.3.1.86, 6.2.1.3	aumento de la producción de ácido graso
fabA	<i>E. coli</i> K12	β -hidroxidecanoil tioéster deshidratasa/isomerasa	NP_415474	4.2.1.60	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabB	<i>E. coli</i>	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] sintasa I	BAA16180	2.3.1.41	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabD	<i>E. coli</i> K12	[acil-proteína portadora] S-maloniltransferasa	AAC74176	2.3.1.39	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabF	<i>E. coli</i> K12	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] sintasa II	AAC74179	2.3.1.179	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabG	<i>E. coli</i> K12	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] reductasa	AAC74177	1.1.1.100	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabH	<i>E. coli</i> K12	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] sintasa III	AAC74175	2.3.1.180	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabI	<i>E. coli</i> K12	enol-[acil-proteína portadora] reductasa	NP_415804	1.3.1.9	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso

(continuación)

Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
Aumento de la producción de ácido graso					
fabR	<i>E. coli</i> K12	Represor de la transcripción	NP_418398	ninguno	modulación de la producción de ácidos grasos insaturados
fabV	<i>Vibrio cholerae</i>	enol-[acil-proteína portadora] reductasa	YP_001217283	1.3.1.9	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fabZ	<i>E. coli</i> K12	Proteína portadora de (3R)-hidroximiristo-acilo deshidratasa NP_414722		4.2.1.-	aumento de la producción de acil-ACP/CoA graso
fadE	<i>E. coli</i> K13	acil-CoA deshidrogenasa	AAC73325	1.3.99.3, 1.3.99.-	reducción de la degradación de ácidos grasos
fadD	<i>E. coli</i> K12	acil-CoA sintetasa	NP_416319	6.2.1.3	reducción de la degradación de ácidos grasos
fadA	<i>E. coli</i> K12	3-cetoacil-CoA tiolasa	YP_02627	2.3.1.16	reducción de la degradación de ácidos grasos
fadB	<i>E. coli</i> K12	enol-CoA hidratasa, 3-OH acil-CoA epimerasa/deshidrogenasa	NP_418288	4.2.1.17, 5.1.2.3, 1.1.1.35	reducción de la degradación de ácidos grasos
fadR	<i>E. coli</i>	proteína reguladora de la transcripción	NP_415705	ninguno	Bloqueo e inversión de la degradación de ácidos grasos
Control de la longitud de la cadena					
tesA (con o sin secuencia líder)	<i>E. coli</i>	Tioesterasa - la secuencia líder es la de los aminoácidos 1-26	P0ADA1	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de cadena de C18
tesA (sin secuencia líder)	<i>E. coli</i>	tioesterasa	AAC73596, NP_415027	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de la cadena C18:1
tesA (mutante de tioesterasa I de <i>E. coli</i> complejada con ácido octanoico)	<i>E. coli</i>	tioesterasa	L109P	3.1.2.-, 3.1.1.5	Longitud de cadena <C18
fatB1	<i>Umbellularia californica</i>	tioesterasa	Q41635	3.1.2.14	Longitud de la cadena C12:0
fatB2	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC49269	3.1.2.14	Longitud de la cadena C8:0 - C10:0

(continuación)

Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
Control de la longitud de la cadena					
fatB3	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC72881	3.1.2.14	Longitud de la cadena C14:0 - C16:0
fatB	<i>Cinnamomum camphora</i>	tioesterasa	Q39473	3.1.2.14	Longitud de la cadena C14:0
fatB	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tioesterasa	CAA85388	3.1.2.14	Longitud de la cadena C16:1
Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
fatB1	<i>Umbellularia californica</i>	tioesterasa	Q41635	3.1.2.14	Longitud de la cadena C12:0
fatA1	<i>Helianthus annuus</i>	tioesterasa	AAL79361	3.1.2.14	Longitud de la cadena C18:1
fatA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tioesterasa	NP_189147, NP_193041	3.1.2.14	Longitud de la cadena C18:1
fatA	<i>Brassica juncea</i>	tioesterasa	CAC39106	3.1.2.14	Longitud de la cadena C18:1
fatA	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterasa	AAC72883	3.1.2.14	Longitud de la cadena C18:1
tes	<i>Photobacterium profundum</i>	tioesterasa	YP_130990	3.1.2.14	Longitud de la cadena
tesB	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_414986	3.1.2.14	Longitud de la cadena
fadM	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_414977	3.1.2.14	Longitud de la cadena
yclA	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_415769	3.1.2.14	Longitud de la cadena
ybgC	<i>E. coli</i>	tioesterasa	NP_415264	3.1.2.14	Longitud de la cadena
Control del nivel de saturación					
Sfa	<i>E. coli</i>	Supresor de fabA	AAN79592, AAC44390	ninguno	aumento de ácidos grasos monoinsaturados
fabA	<i>E. coli</i> K12	β -hidroxidecanoil tioéster deshidratasa/isomerasa	NP_415474	4.2.1.60	producción de ácidos grasos insaturados
GnsA	<i>E. coli</i>	supresores de la mutación nula secG	ABD18647.1	ninguno	aumento ésteres de ácidos grasos insaturados

(continuación)

Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
Control del nivel de saturación					
GnsB	<i>E. coli</i>	supresores de la mutación nula secG	AAC74076.1	ninguno	aumento ésteres de ácidos grasos insaturados
fabB	<i>E. coli</i>	3-oxoacil-[acil-proteína portadora] sintasa I	BAA16180	2.3.1.41	modulación de la producción de ácidos grasos insaturados
des	<i>Bacillus subtilis</i>	D5 acil grasa desaturasa	034653	1.14.19	modulación de la producción de ácidos grasos insaturados
Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
Producción de ésteres					
AT3G51970	<i>Arabidopsis thaliana</i>	alcohol de cadena larga O-grasa-aciltransferasa	NP_190765	2.3.1.26	producción de ésteres
EL01	<i>Pichia angusta</i>	Ácido graso elongasa	BAD98251	2.3.1.-	producción de ácidos grasos de longitud de cadena muy larga
plsC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	aciltransferasa	AAA16514	2.3.1.51	producción de ésteres
DAGAT/DGA T	<i>Arabidopsis thaliana</i>	diacilglicerol aciltransferasa	AAF19262	2.3.1.20	producción de ésteres
hWS	<i>Homo sapiens</i>	acil-CoA alcohol de cera aciltransferasa	AAX48018	2.3.1.20	producción de ésteres
a ft1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	éster de cera sintasa/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa bifuncional	AA017391	2.3.1.20	producción de ésteres
ES9	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	éster de cera sintasa	ABO21021	2.3.1.20	producción de ésteres
mWS	<i>Simmondsia chinensis</i>	éster de cera sintasa	AAD38041	2.3.1.-	producción de ésteres
Producción de alcoholes grasos					
		tiosterasas (véase lo anterior)			aumento de la producción de ácidos grasos/alcoholes grasos

(continuación)

Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
Producción de alcoholes grasos					
BmFAR	<i>Bombyx mori</i>	FAR (acil-CoA reductasa formadora de alcoholes grasos)	BAC79425	1.1.1.-	conversión de acil-CoA en alcohol graso
acr1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	acil-CoA reductasa	YP_047869	1.2.1.42	reducción de acil graso-CoA en aldehídos grasos
yqhD	<i>E. coli W3110</i>	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.-.-	reducción de aldehídos grasos en alcoholes grasos; aumento de la producción de alcoholes grasos
alrA	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	alcohol deshidrogenasa	CAG70252	1.1.-.-	reducción de aldehídos grasos en alcoholes grasos
BmFAR	<i>Bombyx mori</i>	FAR (acil-CoA reductasa formadora de alcoholes grasos)	BAC79425	1.1.1.-	reducción de acil graso-CoA en alcohol graso
GTNG_1865	<i>Geobacillus thermodenitrificans NG80-2</i>	aldehído deshidrogenasa de cadena larga	YP_001125970	1.2.1.3	reducción de aldehídos grasos en alcoholes grasos
AAR	<i>Synechococcus elongatus</i>	Acil-ACP reductasa	YP_400611	1.2.1.42	reducción de acil graso-ACP/CoA en aldehídos grasos
carB	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	proteína ácido carboxílico reductasa	YP_889972	6.2.1.3, 1.2.1.42	reducción de ácidos grasos en aldehído graso
FadD	<i>E. coli K12.</i>	acil-CoA sintetasa	NP_416319	6.2.1.3	activación de los ácidos grasos a acil graso-CoA
atoB	<i>Erwinia carotovora</i>	acetil-CoA acetiltransferasa	YP_049388	2.3.1.9	producción de butanol
hbd	<i>Butyrivibrio fibris olvens</i>	Beta-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	BAD51424	1.1.1.157	producción de butanol
CPE0095	<i>Clostridium perfringens</i>	crotonasabutiril-CoA deshidrogenasa	BAB79801	4.2.1.55	producción de butanol

(continuación)

Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
Producción de alcoholes grasos					
lecho	<i>Clostridium beijerinckii</i>	butiril-CoA deshidrogenasa	AAM14583	1.3.99.2	producción de butanol
ALDH	<i>Clostridium beijerinckii</i>	aldehído deshidrogenasa de acilación de la coenzima A	AAT66436	1.2.1.3	producción de butanol
AdhE	<i>E. coli CFT073</i>	aldehído-alcohol deshidrogenasa	AAN80172	1.1.1.1 1.2.1.10	producción de butanol
Producción de éster acetílico de alcohol graso					
		tioesterasas (véase lo anterior)			modificación de la producción
acr1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	acil-CoA reductasa	YP_047869	1.2.1.42	modificación de la producción
yqhD	<i>E. Coli K12</i>	alcohol deshidrogenasa	AP_003562	1.1.-.-	modificación de la producción
AAT	<i>Fragaria xananassa</i>	alcohol O-acetiltransferasa	AAG13130	2.3.1.84	modificación de la producción
Producción de olefina terminal					
Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
OleT	<i>Jeotgalicoccus sp.</i>	Ácido graso descarboxilasa	HQ709266	1.11.2.4	ácidos grasos descarboxilados
Exportación de productos					
AtMRP5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	asociada a resistencia a múltiples fármacos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_171908	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AmiS2	<i>Rhodococcus sp.</i>	Transportador de ABC AmiS2	JC5491	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AtPGP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	p glucoproteína 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_181228	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AcrA	<i>Candidatus Protochlamydia amoebophila UWE25</i>	supuesta proteína de transporte de salida de múltiples fármacos acrA	CAF23274	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AcrB	<i>Candidatus Protochlamydia amoebophila UWE25</i>	probable proteína transportadora de salida de múltiples fármacos, acrB	CAF23275	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto

(continuación)

Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
Exportación de productos					
TolC	<i>Francisellatularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	Proteína de membrana externa [biogénesis de la envoltura celular,	ABD59001	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AcrE	<i>Shigella sonnei</i> Ss046	la proteína transmembrana afecta a la formación de septos y a la permeabilidad de la membrana celular	YP_312213	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
AcrF	<i>E. coli</i>	proteína F de resistencia a la acriflavina	P24181	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
tlh1619	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> [BP-1]	transportador de salida de múltiples fármacos	NP_682409.1	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
tlh0139	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> [BP-1]	transportador de salida de múltiples fármacos	NP_680930.1	ninguno	modificación de la cantidad de exportación de producto
Fermentación					
genes de puntos de control de la replicación					aumento de la eficiencia de la producción
Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
umuD	<i>Shigella sonnei</i> Ss046	ADN polimerasa V, subunidad	YP_310132	3.4.21.-	aumento de la eficiencia de la producción
umuC	<i>E. coli</i>	ADN polimerasa V, subunidad	ABC42261	2.1.1.1	aumento de la eficiencia de la producción
pntA, pntB	<i>Shigella flexneri</i>	NADH:NADPH transhidrogenasa (subunidades alfa y beta)	P07001, P0AB70	1.6.1.2	aumento de la eficiencia de la producción
Otros					
fabK	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	trans-2-enoil-ACP reductasa II	AAF98273	1.3.1.9	Contribución a la biosíntesis de los ácidos grasos

(continuación)

Designación del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	N.º de registro	Número de CE	Uso ilustrativo
Otros					
fabL	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	enoiI-(acil proteína transportadora) reductasa	AAU39821	1.3.1.9	Contribución a la biosíntesis de los ácidos grasos
fabM	<i>Streptococcus mutans</i>	trans-2, cis-3-decenoiI-ACP isomerasa	DAA05501	4.2.1.17	Contribución a la biosíntesis de los ácidos grasos

La Figura 1 muestra una vía ilustrativa en la que un acil tioéster tal como una acil-ACP puede convertirse en un ácido graso C₁₂ o C_{16:1} (FFA) como un precursor intermedio. En la Etapa 1 de la Figura 1, se emplea una tioesterasa para convertir una acil-ACP en un FFA. En ciertas realizaciones, el gen que codifica una tioesterasa es *tesA*, *'tesA*, *tesB*, *fatB1*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA1*, o *fatA* (véase también la Tabla 1, que muestra polipéptidos que tienen la actividad enzimática de una tioesterasa que puede usarse para catalizar esta etapa, descrito anteriormente). En la etapa 2, se usa un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa o una variante del mismo para generar ácidos grasos ω-OP (FFA ω-OP) a partir de ácidos grasos. Se pueden producir otras moléculas bifuncionales en dirección 3' de la vía, por ejemplo, α,ω-diácidos u otros derivados de ácidos grasos ω-OP, dependiendo de las funcionalidades enzimáticas que están presentes en la vía.

Polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa

Las ω-hidroxilasas (o ω-oxigenasas) incluyen ciertas di-oxigenasas de hierro de tipo no hemo (por ejemplo, alkB de *Pseudomonas putida* GPo1) y ciertas oxigenasas P450 de tipo hemo (por ejemplo, ω-hidroxilasas tales como cyp153A de *Marinobacter aquaeolei*). Las P450 son enzimas distribuidas ubicuamente, que poseen una alta complejidad y muestran un amplio campo de actividad. Son proteínas codificadas por una superfamilia de genes que convierten una amplia variedad de sustratos y catalizan una variedad de reacciones químicas. Cyp153A es una subfamilia de P450 del citocromo bacterianas solubles que hidroxilan cadenas de hidrocarburo con alta selectividad por la posición ω (van Beilen *et al.* (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* 72:59-65). Se ha demostrado *in vitro* que los miembros de la familia cyp153A hidroxilan selectivamente la posición ω de los alcanos, ácidos grasos o alcoholes grasos, por ejemplo, cyp153A6 de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 (Funhoff *et al.* (2006) *J. Bacteriol.* 188: 5220-5227), cyp153A16 de *Mycobacterium marinum* y cyp153A de *Polaromonas* sp. JS666 (Scheps *et al.* (2011) *Org. Biomol. Chem.* 9: 6727-6733), así como cyp153A de *Marinobacter aquaeoli* (Honda-Malca *et al.* (2012) *Chem. Commun.* 48:5115-5117). Las Tablas 2A y 2B que figuran a continuación muestran ejemplos de enzimas y parejas rédox que tienen actividad enzimática de ω-hidroxilasa que pueden usarse para producir ácidos grasos ω-OP y derivados de ácidos grasos ω-OP.

Tabla 2A: Ejemplos de actividad enzimática de ω-hidroxilasa (P450) (CE 1.14.15.3)

Designación del gen	Organismo fuente	N.º de registro	Sistema rédox	Posición de hidroxilación
cyp153A (aciA)	<i>Acinetobacter</i> sp. OC4	BAE78452	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω-hidroxilasa
cyp153A16	<i>Mycobacterium marinum</i> M	YP_001851443	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω-hidroxilasa
cyp153A6	<i>Mycobacterium</i> sp. HXN-1500	AJ833989	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω-hidroxilasa
cyp153A	<i>Marinobacter aquaeoli</i> VT8	YP_957888	operón con ferredoxina y ferredoxina reductasa	ω-hidroxilasa
alkB	<i>Pseudomonas putida</i> GPo1	CAB54050	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω-hidroxilasa
alkB	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO	CAB51045	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω-hidroxilasa
alkM	<i>Acinetobacter baylyi</i>	YP_046098	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω-hidroxilasa
alkB	<i>Gordonia</i> sp. SoGc	ADT82701	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω-hidroxilasa
alkW1	<i>Dietzia</i> sp. DQ12-45-1b	HQ850582	fusión de rubredoxina c-terminal, requiere rubredoxina reductasa	ω-hidroxilasa
alkB	<i>Pseudomonas putida</i> GPo1	CAB54050	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω-hidroxilasa
alkB	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO	CAB51045	requiere rubredoxina y rubredoxina reductasa	ω-hidroxilasa

Tabla 2B: Ejemplos de parejas rédox para la actividad enzimática de ω -hidroxilasa (P450) (EC 1.14.15.3)

Designación/Nombre	Organismo	N.º de registro
ferredoxina, ferredoxina reductasa	<i>Acinetobacter</i> sp. OC4	BAE78451, BAE78453
ferredoxina, ferredoxina reductasa	<i>Mycobacterium marinum</i> M	YP_001851444, YP_001851442
ferredoxina, ferredoxina reductasa	<i>Marinobacter aquaeoli</i> VT8	YP_957887, YP_957889
alkG, alkT	<i>Pseudomonas putida</i> GPo1	CAB54052, CAB54063
rubA, rubB	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	CAA86925, CAA86926

Como con todas las P450 del citocromo, las ω -hidroxilasas Cyp153A requieren electrones para su actividad catalítica, que se proporcionan a través de proteínas rédox específicas tales como ferredoxina y ferredoxina reductasa. Estas son proteínas diferenciadas que interactúan con cyp153A. Ya se ha creado una oxigenasa cyp153A híbrida autosuficiente (quimérica) (es decir, una oxigenasa que no requiere proteínas diferenciadas de ferredoxina y ferredoxina reductasa para la actividad) fusionando cyp153A de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Kubota *et al.* (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:2421-2430; Fujita *et al.* (2009) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1825-1830) con el dominio reductasa de P450RhF, que incluye sitios de unión a mononucleótidos de flavina (FMN) y NADPH y un centro de ferredoxina [2FeS] (Hunter *et al.* (2005) *FEBS Lett.* 579:2215-2220). P450RhF pertenece a PFOR fusionado con P450 de clase I (DeMot y Parret (2003) *Trends Microbiol.* 10: 502). Esta proteína de fusión de cyp153A-RedRhF híbrida se observó en biotransformaciones *in vitro* para hidroxilar octano en la posición ω y también hidroxilar otros compuestos tales como ciclohexano o butilbenceno. Se han creado otras oxigenasas cyp153A híbridas autosuficientes (quiméricas) fusionando cyp153A de *Marinobacter aquaeolei* con los dominios reductasa de P450RhF y P450-BM3 (Scheps *et al.* (2013) *Microb. Biotechnol.* 6:694-707). En las Tablas 2C y 2D que figuran a continuación se muestran ejemplos de proteínas de fusión de P450-reductasa naturales.

Tabla 2C: Ejemplos de proteínas de fusión ω -1, ω -2, ω -3-hidroxilasas autosuficientes (CE 1.14.14.1)

Designación del gen	Organismo fuente	N.º de registro	Sistema rédox	Hidroxilación Posición
P450-BM3 (cyp102A1)	<i>Bacillus megaterium</i>	AAA87602	proteína de fusión con dominio reductasa	hidroxilación en ω -1, ω -2, ω -3
yrhJ (cyp102A3)	<i>Bacillus subtilis</i>	NP_390594	proteína de fusión con dominio reductasa	hidroxilación en ω -1, ω -2, ω -3
yrhJ (cyp102A7)	<i>Bacillus licheniformis</i>	AAU41718	proteína de fusión con dominio reductasa	hidroxilación en ω -1, ω -2, ω -3

Tabla 2D: Ejemplos de proteínas de fusión PFOR fusionadas con P450 de clase I autosuficientes

Designación/Nombre	Organismo	N.º de registro
P450RhF	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 9784	AAM67416
REQ_44300	<i>Rhodococcus equi</i> 103S	YP_004009071
HMPREF0018_01193	<i>Acinetobacter radioresistens</i> SH164	ZP_06072406
BMAA1669	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	YP_106239
Rmet_4932	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	YP_587063
H16_B1279	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	YP_840799

Dada su alta selectividad hacia la posición ω de las cadenas de hidrocarburo, la familia de oxigenasas cyp153A parecía ser buenos ejemplos de candidatos adecuados para producir derivados de ácidos grasos α,ω -bifuncionales a partir de una fuente de carbono renovable. Esto permitiría el desarrollo de procesos viables a nivel comercial para producir estos valiosos compuestos. No obstante, como con otras P450 del citocromo, las proteínas de la familia cyp153A hasta ahora se han aplicado principalmente a experimentos *in vitro* con enzimas purificadas o lisados de células brutas o en biotransformaciones de células en reposo a las que se añaden derivados de ácidos grasos o hidrocarburos de forma exógena (Kubota *et al.*, Fujita *et al.*, Honda-Malca *et al.*, Scheps *et al.*, mencionados anteriormente). Sin embargo, los procedimientos *in vitro* que emplean fusión híbrida o las biotransformaciones de células en reposo no conducen a una producción a gran escala y rentable de derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados. El conocimiento ampliamente aceptado en la técnica es que muchas P450 del citocromo, así como las ω -hidroxilasas de tipo alkB no son fáciles de

expresar funcionalmente en microorganismos recombinantes, porque las enzimas suelen estar inactivas y su química ha sido difícil de dilucidar. De hecho, el único trabajo *in vivo* que usa una fuente de carbono renovable distinta de los derivados de ácidos grasos que se ha intentado hasta ahora empleaba la alquil ω -hidroxilasa, y ha logrado solo un título bajo de derivados de ácidos grasos ω -hidroxi en una fermentación de alta densidad celular (documento WO2013/024114A2).

La presente divulgación proporciona variantes de proteína de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que son capaces de producir eficazmente derivados de ácidos grasos ω -hidroxi *in vivo* a partir de una fuente de carbono renovable. De manera más específica, un gen de *Marinobacter aquaeoli* que codifica una proteína de fusión híbrida del dominio catalítico de P450 CYP153A (G307A), donde una glicina (G) fue sustituida por una alanina (A) en la posición 307, se fusionó con un gen codificante del dominio reductasa que contenía FMN y Fe/S c-terminal de P450RhF de *Rhodococcus* sp. NCIMB9784. El polipéptido resultante es un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-RedRhF (SEQ ID NO: 6) con una secuencia de ácido nucleico correspondiente (SEQ ID NO: 5). Cuando esta proteína de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se expresó en células de *E. coli* con una fuente de carbono simple, tal como glucosa, los derivados de ácidos grasos se convirtieron eficazmente en derivados de ácidos grasos ω -hidroxi (véase el Ejemplo 1). Otros ejemplos de ω -hidroxilasas adecuadas (CE 1.14.15.3) y sus parejas redox que pueden usarse para generar polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa similares se enumeran en las Tablas 2A y 2B (anteriores).

Variantes del polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa

La presente divulgación identifica variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que producen un título, un rendimiento y/o una productividad altos de composiciones de derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados cuando se expresan en células hospedadoras. En ejemplos no limitantes de la presente divulgación (véanse los Ejemplos 1-7, más adelante) el polipéptido de fusión de CYP153A (G307A)-RedRhF híbrida (*supra*) se usó como molde para diseñar de manera eficaz variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa para producir mayores cantidades de ácidos grasos ω -OP y derivados de ácidos grasos ω -OP. Por ejemplo, dicha variante de polipéptido de fusión de CYP153A-reductasa híbrida puede convertir eficazmente compuestos tales como el ácido dodecanoico en ácido 12-hidroxi-dodecanoico *in vivo* a partir de una fuente de carbono simple tal como glucosa. Cualquier fuente de carbono simple, por ejemplo, como la derivada de una materia prima renovable es adecuada. Se demostró que las variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa diseñadas genéticamente (es decir, las ilustradas a través de una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-RedRhF diseñado genéticamente) pueden convertir eficazmente ácidos grasos *in vivo* en compuestos deseables específicos que incluyen ácidos grasos ω -OP cuando se expresa junto con una tioesterasa en una célula hospedadora tal como *E. coli* mediante el uso de una fuente de carbono tal como la glucosa de una materia prima renovable (véase el apartado de Ejemplos, más adelante). Siguiendo la presente divulgación, se pueden diseñar otras variantes de polipéptidos de fusión híbrida uniendo un gen mutado, tal como un gen codificante de una proteína CYP153A a un gen mutado codificante de un dominio reductasa c-terminal (véanse las Tablas 2A a 2D, anteriores). En el presente documento, se engloban variaciones, por ejemplo, mutando ambos genes (el dominio P450 y reductasa) o mutando un gen (el dominio P450 o reductasa). Siguiendo estas instrucciones, se pueden crear variantes de proteínas de fusión similares a partir de otros tipos de ω -hidroxilasas.

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que producen un título, un rendimiento y/o una productividad altos de composiciones de derivados de ácidos grasos ω -hidroxilados cuando se expresan en células hospedadoras. Las variantes del polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tienen una o más mutaciones en el dominio CYP153A o dominio de reductasa, o ambos. En una realización, la presente divulgación proporciona una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que tiene al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 y que tiene una o más mutaciones en una posición de aminoácido que incluye la posición 27, 82, 141, 178, 231, 309, 407, 415, 516, 666 y/o 796, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso ω -OP. De manera más específica, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene una o más de las siguientes mutaciones, que incluyen R27L, donde la arginina (R) está sustituida con lisina (L); posición R82D, donde la arginina (R) está sustituida con ácido aspártico (D); posición V141I, donde la valina está sustituida con isoleucina (I); posición V141Q, donde la valina (V) está sustituida con glutamina (Q); posición V141G, donde la valina (V) está sustituida con glicina (G); posición V141M, donde la valina (V) está sustituida con metionina (M); posición V141L, donde la valina (V) está sustituida con leucina (L); posición V141T, donde la valina (V) está sustituida con treonina (T); posición R178N, donde la arginina (R) está sustituida con asparagina (N); posición A231T, donde la alanina (A) está sustituida con treonina (T); posición N309R, donde la asparagina (N) está sustituida con arginina (R); posición N407A, donde la asparagina (N) está sustituida con alanina (A); posición V415R, donde la valina (V) está sustituida con arginina (R); posición T516V, donde la treonina (T) está sustituida con valina (V); posición P666A, donde la prolina (P) está sustituida con alanina (A); posición P666D, donde la prolina (P) está sustituida con ácido aspártico (D); y posición A796V, donde la alanina (A) está sustituida con valina (V). Los ejemplos de variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa incluyen SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 46. En una realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es una variante de proteína de

fusión de tipo CYP153A-RedRhF híbrida. En otra realización, la variante del polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en una célula hospedadora recombinante produce un título más alto de un derivado de ácido graso ω -OP o composición del mismo en comparación con el título de un ácido graso ω -OP o composición del mismo producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en una célula hospedadora correspondiente.

5 En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene una mutación en la posición de aminoácido 141, incluyendo V141I y/o V141T. En el presente documento, la expresión de la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con mutaciones V141I o V141T en una célula hospedadora recombinante produce un título más alto de un ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω -OP respectivamente, en
10 comparación con un título de un ácido graso C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω -OP producido mediante la expresión de un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa. En una realización, la variante del polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene mutaciones V141I y A231T (SEQ ID NO: 32) y produce mayores cantidades de ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω -OP cuando se expresa en una célula hospedadora con una función enzimática de tioesterasa. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene mutaciones R27L, R82D, V141M, R178N y N407A (SEQ ID NO: 34) y produce mayores cantidades de ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω -OP cuando se expresa en una célula hospedadora con una función enzimática de tioesterasa. En otra
20 realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene la mutación P666A (SEQ ID NO: 36) y produce mayores cantidades de ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω -OP cuando se expresa en una célula hospedadora con una función enzimática de tioesterasa. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene la mutación A796V (SEQ ID NO: 38) y produce mayores cantidades de ácidos grasos
25 C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω -OP cuando se expresa en una célula hospedadora con una función enzimática de tioesterasa. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene mutaciones A796V, P666D y T516V (SEQ ID NO: 40) y produce mayores cantidades de ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω -OP cuando se expresa en una célula hospedadora con una función enzimática de tioesterasa. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene mutaciones V141I, A231T y A796V (SEQ ID NO: 42) y produce mayores cantidades de ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω -OP cuando se expresa en una célula hospedadora con una función enzimática de tioesterasa. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene mutaciones R27L, R82D, V141M, R178N, N407A y A796V (SEQ ID NO: 44) y produce mayores cantidades de ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω -OP cuando se expresa en una célula hospedadora con una función enzimática de tioesterasa. En otra realización, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene mutaciones V141T, A231T y A796V (SEQ ID NO: 46) y produce mayores cantidades de
40 ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1} ω -OP cuando se expresa en una célula hospedadora con una función enzimática de tioesterasa. En una realización, las variantes de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 46 produjeron mayores cantidades de ácidos grasos o derivados de ácidos grasos ω -OP en comparación con SEQ ID NO: 6. En una realización, estos ácidos grasos ω -
45 OP son ácidos grasos C_{8:0} ω -OP, ácidos grasos C_{10:0} ω -OP, ácidos grasos C_{12:0} ω -OP, ácidos grasos C_{14:0} ω -OP, ácidos grasos C_{16:0} ω -OP, ácidos grasos C_{18:0} ω -OP, ácidos grasos C_{20:0} ω -OP, ácidos grasos C_{8:1} ω -OP, ácidos grasos C_{10:1} ω -OP, ácidos grasos C_{12:1} ω -OP, ácidos grasos C_{14:1} ω -OP, ácidos grasos C_{16:1} ω -OP, ácidos grasos C_{18:1} ω -OP, ácidos grasos C_{20:1} ω -OP y similares.

50 La divulgación identifica variantes de polinucleótidos y polipéptidos relacionados con la fusión híbrida de CYP153A-reductasa. Las variantes del polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa incluyen SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 y 46. Las variantes de ácido nucleico de fusión híbrida de CYP153A-reductasa (secuencias de ADN) incluyen SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 y 47. Sin embargo, se reconocerá que no es necesaria la identidad de secuencia absoluta para las
55 variantes de polinucleótidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa. Por ejemplo, se pueden hacer cambios en una secuencia polinucleotídica particular, y el polipéptido codificado puede cribarse en busca de actividad. Dichos cambios normalmente incluyen mutaciones conservativas y mutaciones silenciosas tales como, por ejemplo, a través de la optimización de codones. Los polinucleótidos modificados o mutados (es decir, mutantes) y las variantes de polipéptidos codificadas pueden cribarse en busca de una función deseada, tal como, una función mejorada en
60 comparación con el polipéptido de tipo silvestre o molde, que incluye, pero sin limitación, una mayor actividad catalítica, mayor estabilidad o menor inhibición (por ejemplo, disminución de la inhibición de retroalimentación), usando métodos conocidos en la técnica. La divulgación identifica actividades enzimáticas implicadas en distintas etapas (es decir, reacciones) de las vías biosintéticas de ácidos grasos descritas en el presente documento de acuerdo con el número de clasificación enzimática (CE), y proporciona polipéptidos ilustrativos (por ejemplo, que funcionan como enzimas
65 específicas y muestran actividad enzimática específica) categorizados por dichos números de CE y polinucleótidos ilustrativos que codifican dichos polipéptidos. Dichos polipéptidos y polinucleótidos ilustrativos, que se identifican en

el presente documento por los números de identificación de secuencia (SEQ ID NO; anteriores), son útiles para diseñar genéticamente vías de ácidos grasos en células hospedadoras como la que se muestra en la Figura 1. Debe entenderse, sin embargo, que los polipéptidos y polinucleótidos descritos en el presente documento son ilustrativos y, por lo tanto, no limitantes. Las secuencias de homólogos de polipéptidos ilustrativos descritos en el presente documento están disponibles para los expertos en la técnica usando bases de datos tales como, por ejemplo, las bases de datos Entrez proporcionadas por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), las bases de datos ExPasy proporcionadas por el Instituto Suizo de Bioinformática, la base de datos BRENDA proporcionada por la Universidad Técnica de Braunschweig y la base de datos KEGG proporcionada por el Centro de Bioinformática de la Universidad de Kyoto y la Universidad de Tokio, estando todas ellas disponibles en la World Wide Web.

Una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa para usar en la práctica de la divulgación tiene al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 46. En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se deriva de un polipéptido CYP153A (G307A) de *Marinobacter aquaeolei* donde una glicina (G) está sustituida por una alanina (A), y se fusiona con un dominio reductasa de P450RhF de *Rhodococcus* sp. NCIMB9784. El citocromo P450RhF es autosuficiente, muestra un alto grado de promiscuidad del sustrato y cataliza una amplia gama de grupos funcionales. En otras realizaciones, una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa para usar en la práctica de la divulgación tiene al menos aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46, y también puede incluir una o más sustituciones que producen características y/o propiedades útiles como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa para usar en la práctica de la divulgación tiene al menos aproximadamente el 100 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46. En otras realizaciones más, el dominio catalítico de P450 de la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se deriva de un organismo distinto de *Marinobacter aquaeolei*. Dichos otros organismos incluyen, pero sin limitación, *Acinetobacter* sp., *Mycobacterium marinum*, *Polaromonas* sp., *Alcanivorax borkumensis*, *Burkholderia fungorum*, *Caulobacter crescentus*, *Hyphomonas neptunium*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Sphingomonas* sp., *Mycobacterium* sp. En otras realizaciones más, El dominio reductasa de la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se deriva de un organismo distinto de *Rhodococcus* sp. Dichos otros organismos incluyen, pero sin limitación, *Rhodococcus equi*, *Acinetobacter radioresistens*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia mallei*, *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus metallidurans*.

La divulgación incluye una variante de polinucleótido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que tiene al menos aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47. La secuencia de ácido nucleico codifica una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con una o más sustituciones que produce características y/o propiedades mejoradas como se describe en el presente documento. En otra realización relacionada más, una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa para usar en la práctica de la divulgación está codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 100 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47. En otro aspecto, la divulgación se refiere a variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que abarcan una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas sobre sustancialmente la longitud completa de una secuencia de ácido nucleico correspondiente a SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47. En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se deriva de *Marinobacter aquaeolei*. En otras realizaciones, el polipéptido de fusión híbrida de P450 se deriva de *Acinetobacter* sp., *Mycobacterium marinum*, *Polaromonas* sp., *Alcanivorax borkumensis*, *Burkholderia fungorum*, *Caulobacter crescentus*, *Hyphomonas neptunium*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Sphingomonas* sp. y *Mycobacterium* sp.

Variantes adicionales de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa

La divulgación identifica variantes adicionales de polinucleótidos y polipéptidos relacionados con la fusión híbrida de CYP153A-reductasa, en donde se usó una variante como molde. La variante molde de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se basa en el polipéptido de fusión híbrida de CYP153A (G307A)-RedRhF, e incluye además la mutación A796V (SEQ ID NO: 38). Se construyó una biblioteca de saturación total de proteína de fusión cyp153A-Red450RhF, y se seleccionaron las variantes que mostraron mejoras frente a cyp153A (G307A)-Red450RhF (A796V) (SEQ ID NO: 38) (véase el Ejemplo 7). Las mutaciones G307A y A796V son mutaciones beneficiosas que mejoran la actividad ω -hidroxilasa de cyp153A (véase SEQ ID NO: 38). Las variantes del polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa resultantes se muestran en la Tabla 11 (más adelante). Estas variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa produjeron una mayor cantidad de ácidos grasos ω -hidroxilados (título de FFA ω -OP) en comparación con SEQ ID NO: 38, e incluyen las SEQ ID NO: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 y 96. Estas variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa pueden producir mayores cantidades de ácidos grasos ω -OP, incluidos ácidos grasos y/o derivados de ácidos grasos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C_{8:1}, C_{9:1}, C_{10:1}, C_{11:1}, C_{12:1}, C_{13:1}, C_{14:1}, C_{15:1}, C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1}, C_{19:1} y/o C_{20:1}.

Las variantes de ácido nucleico de fusión híbrida de CYP153A-reductasa (secuencias de ADN) incluyen SEQ ID NO: 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93 y 95. Sin embargo, se reconocerá que no es necesaria la identidad de secuencia absoluta para las variantes de polinucleótidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa. Por ejemplo, se pueden hacer cambios en una secuencia polinucleotídica particular, y el polipéptido codificado puede cribarse en busca de actividad. Dichos cambios normalmente incluyen mutaciones conservativas y mutaciones silenciosas tales como, por ejemplo, a través de la optimización de codones. Los polinucleótidos modificados o mutados (es decir, mutantes) y las variantes de polipéptidos codificadas pueden cribarse en busca de una función deseada, tal como, una función mejorada en comparación con el polipéptido de tipo silvestre o molde, que incluye, pero sin limitación, una mayor actividad catalítica, mayor estabilidad o menor inhibición (por ejemplo, disminución de la inhibición de retroalimentación), usando métodos conocidos en la técnica. La divulgación identifica actividades enzimáticas implicadas en distintas etapas (es decir, reacciones) de las vías biosintéticas de ácidos grasos descritas en el presente documento de acuerdo con el número de clasificación enzimática (CE), y proporciona polipéptidos ilustrativos (por ejemplo, que funcionan como enzimas específicas y muestran actividad enzimática específica) categorizados por dichos números de CE y polinucleótidos ilustrativos que codifican dichos polipéptidos. Dichos polipéptidos y polinucleótidos ilustrativos, que se identifican en el presente documento por los números de identificación de secuencia (SEQ ID NO; anteriores), son útiles para diseñar genéticamente vías de ácidos grasos en células hospedadoras como la que se muestra en la Figura 1. Debe entenderse, sin embargo, que los polipéptidos y polinucleótidos descritos en el presente documento son ilustrativos y, por lo tanto, no limitantes. Las secuencias de homólogos de polipéptidos ilustrativos descritos en el presente documento están disponibles para los expertos en la técnica usando bases de datos tales como, por ejemplo, las bases de datos Entrez proporcionadas por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), las bases de datos ExPasy proporcionadas por el Instituto Suizo de Bioinformática, la base de datos BRENDA proporcionada por la Universidad Técnica de Braunschweig y la base de datos KEGG proporcionada por el Centro de Bioinformática de la Universidad de Kyoto y la Universidad de Tokio, estando todas ellas disponibles en la World Wide Web.

Una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa para usar en la práctica de la divulgación tiene al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94 y SEQ ID NO: 96. En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se deriva de un polipéptido CYP153A (G307A) de *Marinobacter aquaeolei* donde una glicina (G) se reemplaza con una alanina (A), y se fusiona con un dominio reductasa de P450RhF de *Rhodococcus* sp. NCIMB9784, e incluye una mutación adicional de A796V donde una alanina (A) se reemplaza con una valina (V). El citocromo P450RhF es autosuficiente, muestra un alto grado de promiscuidad del sustrato y cataliza una amplia gama de grupos funcionales. En otras realizaciones, una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa para usar en la práctica de la divulgación tiene al menos aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 96, y también puede incluir una o más sustituciones que producen características y/o propiedades útiles como se describe en el presente documento. Una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa para usar en la práctica de la divulgación tiene al menos aproximadamente el 100 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO:

- 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 96. En otras realizaciones más, el dominio catalítico de P450 de la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se deriva de un organismo distinto de *Marinobacter aquaeolei*. Dichos otros organismos incluyen, pero sin limitación, *Acinetobacter* sp., *Mycobacterium marinum*, *Polaromonas* sp., *Alcanivorax borkumensis*, *Burkholderia fungorum*, *Caulobacter crescentus*, *Hyphomonas neptunium*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Sphingomonas* sp., *Mycobacterium* sp. En otras realizaciones más, El dominio reductasa de la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se deriva de un organismo distinto de *Rhodococcus* sp. Dichos otros organismos incluyen, pero sin limitación, *Rhodococcus equi*, *Acinetobacter radioresistens*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia mallei*, *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus metallidurans*.
- La divulgación incluye una variante de polinucleótido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que tiene al menos aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93 o SEQ ID NO: 95. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico codifica una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa con una o más sustituciones que produce características y/o propiedades mejoradas como se describe en el presente documento. En otra realización relacionada más, una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa para usar en la práctica de la divulgación está codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 100 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93 o SEQ ID NO: 95. En otro aspecto, la divulgación se refiere a variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que abarcan una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas sobre sustancialmente la longitud completa de una secuencia de ácido nucleico correspondiente a SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93 o SEQ ID NO: 95. En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa se deriva de una especie de *Marinobacter aquaeolei*. En otras realizaciones, el polipéptido de fusión híbrida de P450 se deriva de *Acinetobacter* sp., *Mycobacterium marinum*, *Polaromonas* sp., *Alcanivorax borkumensis*, *Burkholderia fungorum*, *Caulobacter crescentus*, *Hyphomonas neptunium*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Sphingomonas* sp. y *Mycobacterium* sp.

Secuencias

- Las variantes que se muestran en la tabla que se presenta a continuación se basan en la proteína de fusión híbrida de cyp153A16(G307A)-RedRhF del citocromo P450.

TABLA DE SECUENCIAS con variantes basadas en la proteína de fusión híbrida de citocromo P450 cyp153A16(G307A)-RedRhF	
Descripción	Número de identificación de secuencia (SEQ ID NO:)
Secuencia de tipo silvestre de P450 Cyp153A de <i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 (ADN)	1
Secuencia de tipo silvestre de P450 Cyp153A de <i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 (proteína)	2
Citocromo P450 Cyp153A16(G307A) de <i>Marinobacter aquaeolei</i> , YP_957888 (ADN)	3
Citocromo P450 Cyp153A16(G307A) de <i>Marinobacter aquaeolei</i> , YP_957888 (proteína)	4
Proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF (Molde) (ADN)	5

(continuación)

TABLA DE SECUENCIAS con variantes basadas en la proteína de fusión híbrida de citocromo P450 cyp153A16(G307A)-RedRhF	
Descripción	Número de identificación de secuencia (SEQ ID NO:)
Proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF (Molde) (proteína)	6
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L (ADN)	7
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L (proteína)	8
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R82D (ADN)	9
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R82D (proteína)	10
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I (ADN)	11
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I (proteína)	12
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141Q (ADN)	13
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141Q (proteína)	14
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141G (ADN)	15
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141G (proteína)	16
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141M (ADN)	17
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141M (proteína)	18
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141L (ADN)	19
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141L (proteína)	20
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141T (ADN)	21
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141T (proteína)	22
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R178N (ADN)	23
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R178N (proteína)	24
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF N309R (ADN)	25

(continuación)

TABLA DE SECUENCIAS con variantes basadas en la proteína de fusión híbrida de citocromo P450 cyp153A16(G307A)-RedRhF	
Descripción	Número de identificación de secuencia (SEQ ID NO:)
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF N309R (proteína)	26
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF N407A (ADN)	27
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF N407A (proteína)	28
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V415R (ADN)	29
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V415R (proteína)	30
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I y A231T (ADN)	31
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I y A231T (proteína)	32
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L, R82D, V141M, R178N y N407A (ADN)	33
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L, R82D, V141M, R178N y N407A (proteína)	34
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF P666A (ADN)	35
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF P666A (proteína)	36
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF A796V (ADN)	37
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF A796V (proteína)	38
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF T516V, P666D y A796V (ADN)	39
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF T516V, P666D y A796V (proteína)	40
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I, A231T y A796V (ADN)	41
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141I, A231T y A796V (proteína)	42
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L, R82D, V141M, R178N, N407A y A796V (ADN)	43
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF R27L, R82D, V141M, R178N, N407A y A796V (proteína)	44
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141T, A231T y A796V (ADN)	45

(continuación)

TABLA DE SECUENCIAS con variantes basadas en la proteína de fusión híbrida de citocromo P450 cyp153A16(G307A)-RedRhF	
Descripción	Número de identificación de secuencia (SEQ ID NO:)
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF V141T, A231T y A796V (proteína)	46

Las variantes que se muestran en la tabla que se presenta a continuación se basan en la proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 cyp153A (G307A)-Red450RhF (A796V).

TABLA DE SECUENCIA con variantes basadas en la proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 cyp153A(G307A)-Red450RhF (A796V)	
Descripción	Número de identificación de secuencia (SEQ ID NO:)
Proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A(G307A)-Red450RhF(A796V) (Molde) (ADN)	37
Proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A(G307A)-Red450RhF(A796V) (Molde) (proteína)	38
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) D747N (ADN)	47
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) D747N (proteína)	48
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q12W (ADN)	49
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q12W (proteína)	50
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) P327D (ADN)	51
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) P327D (proteína)	52
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) R14F (ADN)	53
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) R14F (proteína)	54
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) N61L (ADN)	55
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) N61L (proteína)	56
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q28M (ADN)	57
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q28M (proteína)	58
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) S13K (ADN)	59

(continuación)

TABLA DE SECUENCIA con variantes basadas en la proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 cyp153A(G307A)-Red450RhF (A796V)	
Descripción	Número de identificación de secuencia (SEQ ID NO:)
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) S13K (proteína)	60
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) V771F (ADN)	61
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) V771F (proteína)	62
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q12T (ADN)	63
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q12T (proteína)	64
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) K119R (ADN)	65
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) K119R (proteína)	66
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) D10Y (ADN)	67
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) D10Y (proteína)	68
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q12R (ADN)	69
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q12R (proteína)	70
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) I11L (ADN)	71
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) I11L (proteína)	72
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q28T (ADN)	73
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Q28T (proteína)	74
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) A231Y (ADN)	75
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) A231Y (proteína)	76
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) P745R (ADN)	77
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) P745R (proteína)	78
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) D9N (ADN)	79

(continuación)

TABLA DE SECUENCIA con variantes basadas en la proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 cyp153A(G307A)-Red450RhF (A796V)	
Descripción	Número de identificación de secuencia (SEQ ID NO:)
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) D9N (proteína)	80
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) T770G (ADN)	81
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) T770G (proteína)	82
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Y413R (ADN)	83
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) Y413R (proteína)	84
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) M784I (ADN)	85
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) M784I (proteína)	86
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) D9K (ADN)	87
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) D9K (proteína)	88
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) E749L (ADN)	89
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) E749L (proteína)	90
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) S233L (ADN)	91
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) S233L (proteína)	92
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) E757A (ADN)	93
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) E757A (proteína)	94
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) L703G (ADN)	95
Variante de proteína de fusión híbrida de Citocromo P450 Cyp153A16(G307A)-RedRhF(A796V) L703G (proteína)	96

Variaciones y mutaciones

- 5 Una variante de polipéptido, como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de un polipéptido de tipo silvestre o molde en al menos un aminoácido. Por ejemplo, la variante (por ejemplo, mutante) puede tener una o más de las siguientes sustituciones conservativas de aminoácidos, incluyendo, pero sin limitación, el reemplazo de un aminoácido alifático, tal como alanina, valina, leucina e isoleucina, con otro aminoácido alifático; el reemplazo de una serina con una treonina; el reemplazo de una treonina con una serina; el reemplazo de un resto ácido, tal como el ácido aspártico y el ácido glutámico, con otro resto ácido;

el reemplazo de un resto portador de un grupo amida, tal como la asparagina y la glutamina, con otro resto portador de un grupo amida; el intercambio de un resto básico, tal como lisina y arginina, con otro resto básico; y el reemplazo de un resto aromático, tal como fenilalanina y tirosina, con otro resto aromático. La variante de polipéptido tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 o más sustituciones, adiciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos. Algunos fragmentos preferidos de un polipéptido que funcionan como una variante o mutante retienen parte o la totalidad de la función biológica (por ejemplo, actividad enzimática) del polipéptido de tipo silvestre correspondiente. El fragmento retiene al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % o más de la función biológica del polipéptido de tipo silvestre o molde correspondiente. En otras realizaciones, el fragmento o mutante retiene aproximadamente el 100 % de la función biológica del polipéptido de tipo silvestre o molde correspondiente. En otras realizaciones, algunos fragmentos presentan una mayor función biológica en comparación con el polipéptido de tipo silvestre o molde correspondiente. Se puede encontrar orientación para determinar qué restos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o eliminados sin afectar a la actividad biológica usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, Software LASERGENE (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Un fragmento presenta un aumento de la función biológica en comparación con un polipéptido de tipo silvestre o polipéptido molde correspondiente. Por ejemplo, un fragmento puede mostrar al menos un 10 %, al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 % o al menos un 90 % de mejora en la actividad enzimática en comparación con el polipéptido de tipo silvestre o polipéptido molde correspondiente. El fragmento muestra al menos el 100 %, al menos el 200 % o al menos el 500 % de mejora en la actividad enzimática en comparación con el polipéptido de tipo silvestre o polipéptido molde correspondiente.

Se entiende que los polipéptidos descritos en el presente documento pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas o no esenciales adicionales que no tengan un efecto sustancial sobre la función del polipéptido. Se puede determinar si se tolerará o no una sustitución particular (es decir, si no afectará negativamente a la función biológica deseada, tal como la actividad enzimática ω -hidroxilasa), como se conoce en la técnica (véase Bowie *et al.* (1990) *Science*, 247: 1306-1310). Una sustitución conservativa de aminoácidos es aquella en la que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica, se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Las variantes pueden ser naturales o creadas *in vitro*. En particular, dichas variantes se pueden crear usando técnicas de ingeniería genética, tales como mutagénesis dirigida, mutagénesis química aleatoria, procedimientos de eliminación de exonucleasa III o técnicas de clonación convencionales. Como alternativa, dichas variantes, mutantes, fragmentos, análogos o derivados se pueden crear mediante síntesis química o procedimientos de modificación. Los métodos para crear variantes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes se pueden preparar usando mutagénesis aleatoria y dirigida. La mutagénesis aleatoria y dirigida se conoce, en general, en la técnica (véase, por ejemplo, Arnold (1993) *Curr. Opin. Biotech.* 4:450-455). La mutagénesis aleatoria se puede lograr usando PCR propensa a errores (véase, por ejemplo, Leung *et al.* (1989) *Technique* 1:11-15; y Caldwell *et al.* (1992) *PCR Methods Applic.* 2: 28-33). En la PCR propensa a errores, la PCR real se realiza en condiciones en las que la fidelidad de copias de la ADN polimerasa es baja, de modo que se obtiene una alta tasa de mutaciones puntuales a lo largo de toda la longitud del producto de PCR. En resumen, en dichos procedimientos, los ácidos nucleicos que se van a mutagenizar (por ejemplo, una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína P450 o un polipéptido de fusión híbrida de P450) se mezclan con cebadores de PCR, tampón de reacción, $MgCl_2$, $MnCl_2$, Taq polimerasa y una concentración apropiada de dNTP para lograr una alta tasa de mutación puntual a lo largo de toda la longitud del producto de PCR. Por ejemplo, la reacción se puede realizar usando 20 fmoles de ácido nucleico que se va a mutagenizar, 30 pmol de cada cebador de PCR, un tampón de reacción que comprende KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM (pH 8,3), gelatina al 0,01 %, $MgCl_2$ 7 mM, $MnCl_2$ 0,5 mM, 5 unidades de Taq polimerasa, dGTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dCTP 1 mM y dTTP 1 mM. La PCR se puede realizar durante 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, a 45 °C durante 1 min y a 72 °C durante 1 min. Sin embargo, los expertos en la materia apreciarán que estos parámetros pueden variarse según sea apropiado. Los ácidos nucleicos mutagenizados se clonan luego en un vector apropiado, y se evalúan las actividades de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos mutagenizados. La mutagénesis dirigida se puede realizar usando mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para generar mutaciones específicas del sitio en cualquier ADN clonado de interés. La mutagénesis de oligonucleótidos se describe en la técnica (véase, por ejemplo, Reidhaar-Olson *et al.* (1988) *Science* 241:53-57). En resumen, en dichos procedimientos, se sintetiza una pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios portadores de una o más mutaciones para introducirlos en el ADN clonado, y se insertan en el ADN clonado que se va a mutagenizar (por ejemplo, una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido P450 o un polipéptido de fusión híbrida de P450). Se recuperan los clones que contienen el ADN mutagenizado y se evalúan las actividades de los polipéptidos que codifican.

Otro método para generar variantes es la PCR de ensamblaje. La PCR de ensamblaje implica el ensamblaje de un producto de PCR a partir de una mezcla de pequeños fragmentos de ADN. Se produce una gran cantidad de diferentes reacciones de PCR en paralelo en el mismo vial, Cebando con los productos de una reacción a los productos de otra reacción (véase la patente de EE.UU. n.º 5.965.408). Otro método más para generar variantes es la mutagénesis por

PCR sexual. En la mutagénesis por PCR sexual, se produce la recombinación homóloga forzada entre moléculas de ADN de diferentes, pero muy relacionadas, secuencias de ADN *in vitro* como resultado de la fragmentación aleatoria de la molécula de ADN basada en la homología de secuencia. A esto, le sigue la fijación del cruce por extensión del cebador en una reacción de PCR. La mutagénesis por PCR sexual se describe en publicaciones conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:10747-10751). También se pueden crear variantes por mutagénesis *in vivo*. En algunas realizaciones, se generan mutaciones aleatorias en una secuencia de ácido nucleico propagando la secuencia en una cepa bacteriana, tal como una cepa de *E. coli*, que porta mutaciones en una o más de las vías de reparación del ADN. Dichas cepas mutantes tienen una tasa de mutación aleatoria más alta que la de una cepa de tipo silvestre. La propagación de una secuencia de ADN (por ejemplo, una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de fusión híbrida de P450) en una de estas cepas finalmente generará mutaciones aleatorias dentro del ADN. Las cepas mutantes adecuadas para usar para la mutagénesis *in vivo* se describen en la publicación en la técnica (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente internacional n.º WO1991/016427). Las variantes también se pueden generar usando mutagénesis en casete. En la mutagénesis en casete, una pequeña región de una molécula de ADN bicatenaria se reemplaza con un casete de oligonucleótido sintético que difiere de la secuencia nativa. El oligonucleótido suele contener una secuencia nativa completa y/o parcialmente aleatoria. La mutagénesis de conjunto recursivo también se puede usar para generar variantes. La mutagénesis de conjunto recursivo es un algoritmo para el diseño genético de proteínas (es decir, mutagénesis de proteínas), desarrollado para producir distintas poblaciones de mutantes relacionados fenotípicamente, cuyos miembros difieren en la secuencia de aminoácidos. Este método usa un mecanismo de retroalimentación para controlar series sucesivas de mutagénesis en casete combinatoria (véase, por ejemplo, Arkin *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU. 89:7811-7815). Las variantes se crean usando mutagénesis de conjunto exponencial. La mutagénesis de conjunto exponencial es un proceso para generar bibliotecas combinatorias con un alto porcentaje de mutantes únicos y funcionales, en donde pequeños grupos de restos son aleatorizados en paralelo para identificar, en cada posición alterada, aminoácidos que conduzcan a proteínas funcionales (véase, por ejemplo, Delegrave *et al.* (1993) *Biotech. Res.* 11:1548-1552). En algunas realizaciones, se crean variantes usando procedimientos de barajado en los que porciones de una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos distintos se fusionan para crear secuencias de ácido nucleico quimérico que codifican polipéptidos quiméricos (como se describe en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.965.408 y 5.939.250).

30 Células hospedadoras

Las estrategias para aumentar la producción de composiciones de ácido graso ω -OP por las células hospedadoras recombinantes incluyen un mayor flujo a través de la vía biosintética de ácidos grasos mediante la expresión de un gen de fusión híbrida de CYP153A-reductasa y un gen de tioesterasa en el hospedador de producción. Como se usa en el presente documento, la expresión célula hospedadora recombinante o célula hospedadora modificada se refiere a una célula hospedadora cuya composición genética ha sido alterada en relación con la célula hospedadora de tipo silvestre correspondiente, por ejemplo, mediante la introducción deliberada de nuevos elementos genéticos y/o la modificación deliberada de elementos genéticos presentes de manera natural en la célula hospedadora. La descendencia de dichas células hospedadoras recombinantes también contiene estos elementos genéticos nuevos y/o modificados. En cualquiera de los aspectos de la divulgación descritos en el presente documento, la célula hospedadora puede seleccionarse entre una célula vegetal, célula de insecto, célula fúngica (por ejemplo, un hongo filamentos, tal como *Candida* sp. o una levadura incipiente, tal como *Saccharomyces* sp.), una célula de algas y una célula bacteriana. En una realización, las células hospedadoras recombinantes son microorganismos recombinantes. Los ejemplos de células hospedadoras que son microorganismos incluyen, pero sin limitación, células del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* o *Streptomyces*. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula bacteriana Gram-positiva. En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula bacteriana Gram-negativa. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *E. coli*. En alguna realización, la célula hospedadora es un linfocito B de *E. coli*, un linfocito C de *E. coli*, un linfocito K de *E. coli* o un linfocito W de *E. coli*. En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *Bacillus lentus*, una célula de *Bacillus brevis*, una célula de *Bacillus stearothermophilus*, una célula de *Bacillus licheniformis*, una célula de *Bacillus alkalophilus*, una célula de *Bacillus coagulans*, una célula de *Bacillus circulans*, una célula de *Bacillus pumilis*, una célula de *Bacillus thuringiensis*, una célula de *Bacillus clausii*, una célula de *Bacillus megaterium*, una célula de *Bacillus subtilis* o una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *Trichoderma koningii*, una célula de *Trichoderma viride*, una célula de *Trichoderma reesei*, una célula de *Trichoderma longibrachiatum*, una célula de *Aspergillus awamori*, una célula de *Aspergillus fumigatus*, una célula de *Aspergillus foetidus*, una célula de *Aspergillus nidulans*, una célula de *Aspergillus niger*, una célula de *Aspergillus oryzae*, una célula de *Humicola insolens*, una célula de *Humicola lanuginosa*, una célula de *Rhodococcus opacus*, una célula de *Rhizomucormiehei* o una célula de *Mucormichei*. En otras realizaciones más, la célula hospedadora es una célula de *Streptomyces lividans* o una célula de *Streptomyces murinus*. En otras realizaciones más, la célula hospedadora es una célula de *Actinomycetes*. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *Saccharomyces cerevisiae*.

En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula vegetal eucariota, una célula de alga, una célula de cianobacteria, una célula de bacteria verde de azufre, una célula de bacteria verde sin azufre, una célula de bacteria

púrpura de azufre, una célula de bacteria púrpura sin azufre, una célula extremófila, una célula de levadura, una célula de hongo, una célula diseñada genéticamente de cualquiera de los organismos descritos en el presente documento o un organismo sintético. En algunas realizaciones, la célula hospedadora depende de la luz o fija el carbono. En algunas realizaciones, la célula hospedadora tiene actividad autótrofa. En algunas realizaciones, la célula hospedadora tiene actividad fotoautótrofa, tal como en presencia de luz. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es heterótrofa o mixotrófica en ausencia de luz. En ciertas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *Arabidopsis thaliana*, *Panicum virgatum*, *Miscanthus giganteus*, *Zea mays*, *Botryococcuse braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Synechococcus* Sp. PCC 7002, *Synechococcus* Sp. PCC 7942, *Synechocystis* Sp. PCC 6803, *Thermosynechococcus elongates BP-1*, *Chlorobium tepidum*, *Chlorojlexus auranticus*, *Chromatiumm vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palusris*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium thermocellum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichiapastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens* o *Zymomonas mobilis*. En una realización, la célula microbiana es de una cianobacteria que incluye, pero sin limitación, *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Cyanothece* y *Nostoc punctiforme*. En otra realización, la célula microbiana es de una especie cianobacteriana específica que incluye, pero sin limitación, *Synechococcus elongatus* PCC7942, *Synechocystis* sp. PCC6803 y *Synechococcus* sp. PCC7001.

Vectores de expresión

En algunas realizaciones, se proporciona una secuencia polinucleotídica (o gen) a la célula hospedadora por medio de un vector recombinante, que incluye un promotor unido operativamente a la secuencia polinucleotídica. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor de desarrollo regulado, específico de orgánulo, específico de tejido, inducible, constitutivo o específico de célula. En algunas realizaciones, el vector recombinante incluye al menos una secuencia seleccionada entre una secuencia de control de la expresión acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; un marcador de selección acoplado operativamente a la secuencia polinucleotídica; una secuencia marcadora acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; un resto de purificación acoplado operativamente a la secuencia polinucleotídica; una secuencia de secreción acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica; y una secuencia de dirección acoplada operativamente a la secuencia polinucleotídica. Los vectores de expresión descritos en el presente documento incluyen una secuencia polinucleotídica en una forma adecuada para la expresión de la secuencia polinucleotídica en una célula hospedadora. Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se vaya a transformar, del nivel de expresión del polipéptido deseado, y similares. Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden introducirse en células hospedadoras para producir polipéptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por las secuencias de polinucleótidos como se ha descrito anteriormente. La expresión de genes que codifican polipéptidos en procariotas, por ejemplo, *E. coli*, se realiza con mayor frecuencia con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos de fusión o no fusión. Los vectores de fusión agregan una cantidad de aminoácidos a un polipéptido codificado en los mismos, usualmente al extremo amino o carboxi del polipéptido recombinante. Dichos vectores de fusión normalmente sirven para uno o más de los tres siguientes propósitos, que incluyen aumentar la expresión del polipéptido recombinante; aumentar la solubilidad del polipéptido recombinante; y ayudar en la purificación del polipéptido recombinante actuando como ligando en la purificación por afinidad. Con frecuencia, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión de la fracción de fusión y el polipéptido recombinante. Esto permite la separación del polipéptido recombinante de la fracción de fusión después de la purificación del polipéptido de fusión. Los ejemplos de dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el factor Xa, la trombina y la enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión ilustrativos incluyen el vector pGEX (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ; Smith *et al.* (1988) *Gene* 67:31-40), vector pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y vector pRITS (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N.J.), que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* sin fusión, inducibles, incluyen el vector pTrc (Amann *et al.* (1988) *Gene* 69: 301-315) y el vector pET 11d (Studier *et al.*, "Gene Expression Technology": *Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89). La expresión de genes diana a partir del vector pTrc se basa en la transcripción de la ARN polimerasa del hospedador a partir de un promotor de fusión híbrida de trp-lac. La expresión de genes diana a partir del vector pET 11d se basa en la transcripción de un promotor de fusión de T7 gn10-lac mediada por una ARN polimerasa vírica expresada conjuntamente (T7 gn1). Esta polimerasa vírica es suministrada por cepas hospedadoras tales como BL21(DE3) o HMS174(DE3) de un profago λ residente que alberga un gen T7 gn1 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5. Los sistemas de expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory). Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* inducibles no de fusión adecuados incluyen el vector pTrc (Amann *et al.* (1988) *Gene* 69:301-315) y el vectgor PET 11d (Studier *et al.* (1990) "Gene Expression Technology": *Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA, pág. 60-89). En ciertas realizaciones, una secuencia polinucleotídica de la divulgación está unida operativamente a un promotor derivado del bacteriófago T5. En una realización, la célula hospedadora es una célula de levadura. En esta realización, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Los vectores pueden introducirse en células procariotas o eucariotas mediante una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula hospedadora. Se pueden encontrar métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras en, por ejemplo, Sambrook *et al.* (anterior). Para la

transformación estable de células bacterianas, se sabe que (dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transformación usada) una cierta fracción de células absorberá y replicará el vector de expresión. Para identificar y seleccionar estos transformantes, se puede introducir un gen que codifique un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a un antibiótico) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos tales como, pero sin limitación, ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los ácidos nucleicos que codifican un marcador seleccionable pueden introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que el que codifica un polipéptido descrito en el presente documento o pueden introducirse en un vector separado.

10 Diseño por ingeniería genética de vías opcionales

Las células o los microorganismos hospedadoras de la divulgación incluyen cepas hospedadoras o células hospedadoras que están diseñadas o modificadas genéticamente para contener alteraciones con el fin de probar la eficacia de mutaciones específicas en actividades enzimáticas (es decir, células recombinantes o microorganismos recombinantes). Se pueden usar distintas manipulaciones y alteraciones genéticas opcionales indistintamente de una célula hospedadora a otra, dependiendo de qué vías enzimáticas nativas estén presentes en la célula hospedadora original. En una realización, se puede usar una cepa hospedadora para probar la expresión de una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en combinación con otros polipéptidos biosintéticos (por ejemplo, enzimas). Una cepa hospedadora puede englobar una serie de alteraciones genéticas para probar variables específicas, incluyendo, pero sin limitación, condiciones de cultivo, incluidos los componentes de fermentación, fuente de carbono (por ejemplo, materia prima), la temperatura, la presión, las condiciones de contaminación reducida de cultivos y los niveles de oxígeno.

En una realización, una cepa hospedadora engloba una delección de *fadE* y *fhuA* opcional. La acil-CoA deshidrogenasa (FadE) es una enzima que es importante para metabolizar los ácidos grasos. Cataliza la segunda etapa en la utilización de los ácidos grasos (beta-oxidación), que es el proceso de romper las cadenas largas de ácidos grasos (acil-CoA) en moléculas de acetyl-CoA. De manera más específica, la segunda etapa del ciclo de β -oxidación de la degradación de los ácidos grasos en las bacterias es la oxidación de acil-CoA a 2-enoil-CoA, que es catalizada por FadE. Cuando *E. coli* carece de FadE, no puede crecer en los ácidos grasos como fuente de carbono, pero puede crecer en el acetato. La incapacidad para utilizar ácidos grasos de cualquier longitud de cadena coincide con el fenotipo reportado de las cepas de *fadE*, es decir, cepas mutantes de *fadE* donde la función de FadE está interrumpida. El gen *fadE* puede eliminarse o atenuarse opcionalmente para garantizar que las acil-CoA, que pueden ser productos intermedios en una vía de derivados de ácidos grasos, puedan acumularse en la célula de modo que todas las acil-CoA se puedan convertir de manera eficaz en derivados de ácidos grasos. Sin embargo, la atenuación de *fadE* es opcional cuando se usa el azúcar como fuente de carbono, ya que, en dichas condiciones, la expresión de FadE probablemente inhibida y, por lo tanto, FadE solo puede estar presente en pequeñas cantidades y no puede competir eficazmente con la éster sintasa u otras enzimas por los sustratos de acil-CoA. La FadE se inhibe debido a la represión catabólica. *E. coli* y muchos otros microbios prefieren consumir azúcar frente a los ácidos grasos, por lo que, cuando ambas fuentes están disponibles, el azúcar se consume primero reprimiendo el regulón de *fad* (véase D. Clark, *J Bacteriol.* (1981) 148(2):521-6)). Además, la ausencia de azúcares y la presencia de ácidos grasos induce la expresión de FadE. Los productos intermedios de acil-CoA podrían perderse en la vía de oxidación beta, ya que las proteínas expresadas por el regulón de *fad* (incluyendo *FadE*) están reguladas y competirán eficazmente por las acil-CoA. Por lo tanto, puede ser beneficioso tener el gen *fadE* inactivado o atenuado. Como la mayoría de las fuentes de carbono se basan principalmente en el azúcar, es opcional atenuar *FadE*. El gen *fhuA* codifica la proteína TonA, que es un transportador y receptor acoplado a energía en la membrana externa de *E. coli* (V. Braun (2009) *J Bacteriol.* 191(11):3431-3436). Su eliminación es opcional. La eliminación de *fhuA* permite que la célula se vuelva más resistente al ataque de fagos, lo que puede ser beneficioso en ciertas condiciones de fermentación. Por lo tanto, puede ser deseable eliminar *fhuA* en una célula hospedadora que probablemente esté sujeta a una posible contaminación durante los procesos de fermentación.

En otra realización, la cepa hospedadora (anterior) también abarca la sobreexpresión opcional de uno o más de los siguientes genes, incluyendo *fadR*, *fabA*, *fabD*, *fabG*, *fabH*, *fabV* y/o *fabF*. Los ejemplos de dichos genes son *fadR* de *Escherichia coli*, *fabA* de *Salmonella typhimurium* (NP_460041), *fabD* de *Salmonella typhimurium* (NP_460164), *fabG* de *Salmonella typhimurium* (NP_460165), *fabH* de *Salmonella typhimurium* (NP_460163), *fabV* de *Vibrio cholera* (YP_001217283) y *fabF* de *Clostridium acetobutylicum* (NP_350156). La sobreexpresión de uno o más de estos genes, que codifican enzimas y reguladores en la biosíntesis de ácidos grasos, puede servir para aumentar el título de los compuestos derivados de ácidos grasos que incluyen ácidos grasos ω -OP y derivados de los mismos en distintas condiciones de cultivo.

En otra realización, las cepas de *E. coli* se usan como células hospedadoras para la producción de ácidos grasos ω -OH y derivados de los mismos. De manera similar, estas células hospedadoras proporcionan una sobreexpresión opcional de uno o más genes de biosíntesis (es decir, genes que codifican enzimas y reguladores de la biosíntesis de los ácidos grasos) que pueden aumentar o mejorar aún más el título de los compuestos derivados de ácidos grasos como los derivados de ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos ω -OP y α,ω -diácidos, etc.) en distintas condiciones de cultivo, incluyendo, pero sin limitación, *fadR*, *fabA*, *fabD*, *fabG*, *fabH*, *fabV* y/o *fabF*. Los ejemplos de modificaciones genéticas incluyen *fadR* de *Escherichia coli*, *fabA* de *Salmonella typhimurium* (NP_460041), *fabD* de *Salmonella*

typhimurium (NP_460164), *fabG* de *Salmonella typhimurium* (NP_460165), *fabH* de *Salmonella typhimurium* (NP_460163), *fabV* de *Vibrio cholera* (YP_001217283) y *fabF* de *Clostridium acetobutylicum* (NP_350156). En algunas realizaciones, los operones sintéticos portadores de estos genes biosintéticos se pueden diseñar y expresar en células para probar la expresión de P450 en distintas condiciones de cultivo y/o mejorar aún más la producción de los ácidos grasos ω -OP y α,ω -diácidos. Dichos operones sintéticos contienen uno o más genes biosintéticos. Un operón diseñado genéticamente puede contener genes biosintéticos de ácidos grasos opcionales, incluyendo *fabV* de *Vibrio cholera*, *fabH* de *Salmonella typhimurium*, *fabD* de *S. typhimurium*, *fabG* de *S. typhimurium*, *fabA* de *S. typhimurium* y/o *fabF* de *Clostridium acetobutylicum* que pueden usarse para facilitar la sobreexpresión de derivados de ácidos grasos para probar condiciones de cultivo específicas. Una ventaja de dichos operones sintéticos es que la tasa de producción de derivados de ácidos grasos ω -OP puede aumentarse o potenciarse.

En algunas realizaciones, las células o los microorganismos hospedadores que se usan para expresar ACP y enzimas biosintéticas (por ejemplo, ω -hidroxilasa, tioesterasa, etc.) expresarán además genes que abarcarán ciertas actividades enzimáticas que podrán aumentar la producción a uno o más derivados de ácidos grasos particulares tales como ácidos grasos ω -OP, derivados de ácidos grasos ω -OP, α,ω -diácidos y similares. En una realización, la célula hospedadora tiene actividad tioesterasa (C.E. 3.1.2.* o C.E. 3.1. 2.14 o C.E. 3.1.1.5) para la producción de ácidos grasos que se puede aumentar sobreexpresando el gen. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad éster sintasa (C.E. 2.3.1.75) para la producción de ésteres grasos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (CE 1.2.1.80) y/o actividad alcohol deshidrogenasa (CE 1.11.1.) y/o actividad alcohol graso acil-CoA reductasa (FAR) (CE 1.1.1.*) y/o actividad ácido carboxílico reductasa (CAR) (CE 1.2.99.6) para la producción de alcoholes grasos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (C.E. 1.2.1.80) para la producción de aldehídos grasos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (C.E. 1.2.1.80) y actividad descarboxilasa (ADC) para la producción de alcanos y alquenos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad acil-CoA reductasa (C.E. 1.2.1.50), actividad acil-CoA sintasa (FadD) (C.E. 2.3.1.86) y actividad tioesterasa (C.E. 3.1.2.* o C.E. 3.1. 2.14 o C.E. 3.1.1.5) para la producción de alcoholes grasos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad éster sintasa (C.E. 2.3.1.75), actividad acil-CoA sintasa (FadD) (C.E. 2.3.1.86) y actividad tioesterasa (C.E. 3.1.2.* o C.E. 3.1. 2.14 o C.E. 3.1.1.5) para la producción de ésteres grasos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad OleA para la producción de cetonas. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad OleBCD para la producción de olefinas internas. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad acil-ACP reductasa (AAR) (C.E. 1.2.1.80) y actividad alcohol deshidrogenasa (C.E. 1.11.1.) para la producción de alcoholes grasos. En otra realización, la célula hospedadora tiene actividad tioesterasa (C.E. 3.1.2.* o C.E. 3.1. 2.14 o C.E. 3.1.1.5) y actividad descarboxilasa para formación de olefinas terminales. La expresión de actividades enzimáticas en microorganismos y células microbianas se enseña en los números de patente de EE.UU. n.º 8.097.439; 8.110.093; 8.110.670; 8.183.028; 8.268.599; 8.283.143; 8.232.924; 8.372.610; y 8.530.221. En otras realizaciones, las células o los microorganismos hospedadores que se usan para expresar ACP y otras enzimas biosintéticas incluirán ciertas actividades enzimáticas nativas que se regulan positivamente o se sobreexpresan para producir uno o más derivados de ácidos grasos particulares, tales como los ácidos grasos ω -OP, derivados de ácidos grasos ω -OH y α,ω -diácidos. En una realización, la célula hospedadora tiene una actividad tioesterasa nativa (C.E. 3.1.2.* o C.E. 3.1.2.14 o C.E. 3.1.1.5) para la producción de ácidos grasos que pueden aumentarse mediante la sobreexpresión del gen de tioesterasa.

La presente divulgación incluye cepas o microorganismos hospedadores que expresan genes que codifican variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153A-reductasa y otras enzimas biosintéticas (anteriores). Las células hospedadoras recombinantes producen derivados de ácidos grasos tales como los ácidos grasos ω -OP, derivados de ácidos grasos ω -OH, α,ω -diácidos, y composiciones y mezclas de los mismos. Los derivados de ácidos grasos normalmente se recuperan del medio de cultivo y/o se aíslan de las células hospedadoras. En una realización, los derivados de ácidos grasos se recuperan del medio de cultivo (extracelular). En otra realización, los derivados de ácidos grasos se aíslan de las células hospedadoras (intracelular). En otra realización, los derivados de ácidos grasos se recuperan del medio de cultivo y se aíslan de las células hospedadoras. Los derivados o las composiciones de ácidos grasos producidos por una célula hospedadora pueden analizarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, GC-FID, para determinar la distribución de derivados de ácidos grasos particulares, así como la longitud de las cadenas y el grado de saturación de los componentes de los derivados de ácidos grasos ω -OH, tales como los ácidos grasos ω -OH, ésteres grasos ω -OH, α,ω -diácidos y similares.

Cultivo y fermentación

Como se usa en el presente documento, el término fermentación se refiere, en general, a la conversión de materiales orgánicos en sustancias diana por las células hospedadoras, por ejemplo, la conversión de una fuente de carbono por células hospedadoras recombinantes en ácidos grasos ω -OH o derivados de los mismos mediante la propagación de un cultivo de las células hospedadoras recombinantes en un medio que comprende la fuente de carbono. Las condiciones permisivas para la producción se refieren a cualquier condición que permita que una célula hospedadora produzca un producto deseado, tales como los ácidos grasos ω -OH. De manera similar, la condición o las condiciones en las que se expresa la secuencia polinucleotídica de un vector significa cualquier condición que permita que una célula hospedadora sintetice un polipéptido. Las condiciones adecuadas incluyen, por ejemplo, las condiciones de fermentación. Las condiciones de fermentación pueden incluir muchos parámetros que incluyen, pero sin limitación, intervalos de temperatura, niveles de aireación, tasas de alimentación y composición de los medios. Cada una de

estas condiciones, de forma individual y en combinación, permite que la célula hospedadora crezca. La fermentación puede ser aeróbica, anaeróbica o variaciones de las mismas (tal como microaeróbica). Los medios de cultivo ilustrativos incluyen caldos o geles. En general, el medio incluye una fuente de carbono que puede ser metabolizada directamente por una célula hospedadora. Además, Las enzimas se pueden usar en el medio para facilitar la

movilización (por ejemplo, la despolimerización de almidón o celulosa a azúcares fermentables) y el metabolismo posterior de la fuente de carbono.

Para la producción a pequeña escala, las células hospedadoras diseñadas se pueden cultivar en lotes de, por ejemplo, aproximadamente 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 25 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml, 500 ml, 1 l, 2 l, 5 l o 10 l; fermentarse; e inducirse a expresar una secuencia polinucleotídica deseada, tal como una secuencia polinucleotídica codificante de un polipéptido de fusión híbrida de P450. Para la producción a gran escala, las células hospedadoras modificadas pueden crecer en lotes de aproximadamente 10 L, 100 L, 1000 L, 10,000 L, 100,000 L y 1,000,000 L o más; fermentarse; e inducirse a expresar una secuencia polinucleotídica deseada. Como alternativa, se puede llevar a cabo una fermentación a gran escala alimentada por lotes. Los ácidos grasos ω-OP, los derivados y las composiciones de los mismos, como se describe en el presente documento, se encuentran en el entorno extracelular del cultivo de células hospedadoras recombinantes, y pueden aislarse fácilmente del medio de cultivo. Un ácido graso ω-OP o un derivado del mismo puede ser secretado por la célula hospedadora recombinante, transportada al entorno extracelular o transferida pasivamente al entorno extracelular del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Los ácidos grasos ω-OP o sus derivados se aíslan de un cultivo de células hospedadoras recombinantes usando métodos habituales conocidos en la técnica.

Productos derivados de células hospedadoras recombinantes

Como se usa en el presente documento, la fracción de carbono moderno o fM tiene el mismo significado definido por los materiales de referencia estándar del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, National Institute of Standards and Technology) (SRM, *Standard Reference Materials*, 4990B y 4990C, conocidos como los estándares de ácidos oxálicos HOxI y HOxII, respectivamente. La definición fundamental se refiere a 0,95 veces la proporción de isótopos de $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ HOxI (denominada AD 1950). Esto es más o menos equivalente a la madera de antes de la revolución industrial corregida para la desintegración. Para la biosfera viva actual (materia vegetal), fM es de aproximadamente 1,1. Los bioproductos (por ejemplo, los derivados de ácidos grasos que incluyen ácidos grasos ω-OP y derivados producidos de acuerdo con la presente divulgación) incluyen compuestos orgánicos producidos biológicamente. En particular, los derivados de ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos ω-OP y derivados de los mismos) producidos usando la vía biosintética de los ácidos grasos en el presente documento, no han sido producidos a partir de fuentes renovables y, como tales, son nuevas composiciones de materia. Estos nuevos bioproductos se pueden distinguir de los compuestos orgánicos derivados del carbono petroquímico basándose en la huella isotópica del carbono doble o la datación por ^{14}C . Adicionalmente, la fuente específica de carbono de origen biológico (por ejemplo, glucosa frente a glicerol) puede determinarse mediante la huella isotópica del carbono doble (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 7.169.588). La capacidad de distinguir los bioproductos de los compuestos orgánicos a base de petróleo es beneficiosa para rastrear estos materiales en el comercio. Por ejemplo, Los compuestos orgánicos o productos químicos, incluidos los perfiles de isótopos de carbono tanto biológicos como derivados del petróleo, se pueden distinguir de los compuestos orgánicos y de los productos químicos hechos solo de materiales basados en el petróleo. Por consiguiente, los bioproductos del presente documento pueden seguirse o rastrearse en el comercio en función de su perfil único de isótopos de carbono. Los bioproductos se pueden distinguir de los compuestos orgánicos a base de petróleo mediante la comparación de la proporción estable de isótopos de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) en cada muestra. La proporción de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de un bioproducto dado es una consecuencia de la proporción de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el dióxido de carbono atmosférico en el momento en que se fija el dióxido de carbono. También refleja la vía metabólica exacta. También se producen variaciones regionales. El petróleo, las plantas C3 (de hoja ancha), las plantas C4 (hierbas) y los carbonatos marinos, muestran diferencias significativas en la $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y en los valores correspondientes de $\delta^{13}\text{C}$. Además, la materia lipídica de plantas C3 y C4 se analiza de manera diferente a la de los materiales derivados de los componentes de hidratos de carbono de las mismas plantas como consecuencia de la vía metabólica. Dentro de la precisión de la medición, el ^{13}C muestra grandes variaciones debido a los efectos de fraccionamiento isotópico, siendo el más significativo de los cuales para los bioproductos el mecanismo fotosintético. La principal causa de las diferencias en la proporción de isótopos de carbono en las plantas está estrechamente asociada a las diferencias en la vía del metabolismo de carbono fotosintético en las plantas, en particular, teniendo lugar la reacción durante la primera carboxilación (es decir, la fijación inicial del CO_2 atmosférico). Dos grandes clases de vegetación son las que incorporan el ciclo fotosintético C3 (o de Calvin-Benson) y las que incorporan el ciclo fotosintético C4 (o de Hatch-Slack). En las plantas C3, la fijación primaria de CO_2 o la reacción de carboxilación implica la enzima ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa, y el primer producto estable es un compuesto de 3 átomos de carbono. Las plantas C3, tales como de madera dura y las coníferas, son dominantes en las zonas de clima templado. En las plantas C4, una reacción de carboxilación adicional que implica otra enzima, fosfoenol-piruvato carboxilasa, es la reacción de carboxilación primaria. El primer compuesto de carbono estable es un ácido de 4 átomos de carbono que posteriormente se descarboxila. El CO_2 así liberado vuelve a fijarse mediante el ciclo C3. Son ejemplos de plantas C4 los pastos tropicales, el maíz y la caña de azúcar. Las plantas tanto C4 como C3 presentan un intervalo de proporciones isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, pero los valores típicos son de aproximadamente -7 a aproximadamente -13 por mil para las plantas C4 y de aproximadamente -19 a aproximadamente -27 por mil para las plantas C3 (véase, por ejemplo, Stuiver *et al.* (1977) "Radiocarbon" 19:355). El carbón y el petróleo se encuentran generalmente en este

último intervalo. La escala de medición de ^{13}C se definió originalmente por un ajuste a cero con piedra caliza belemnita Pee Dee (PDB, *Pee Dee Belemnite*), en donde los valores se dan en partes por mil desviaciones con respecto a este material. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ están en partes por mil (por mil), abreviado, ‰, y se calculan de la siguiente manera:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left[\left(\frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}} \right)_{\text{muestra}} - \left(\frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}} \right)_{\text{patrón}} \right] / \left(\frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}} \right)_{\text{patrón}} \times 1000$$

Dado que el material de referencia (MR) PDB se ha agotado, se ha desarrollado una serie de MR alternativos en cooperación con el IAEA (*International Atomic Energy Agency*, organismo internacional de energía atómica), USGS, el NIST y con otros laboratorios de isótopos internacionales seleccionados. Las anotaciones para las desviaciones por mil de PDB es $\delta^{13}\text{C}$. Las mediciones se realizan en CO_2 mediante espectrometría de masas de proporción estable de alta precisión (IRMS) sobre iones moleculares de las masas 44, 45 y 46. Las composiciones descritas en el presente documento incluyen bioproductos producidos por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, entre ellos, por ejemplo, productos derivados de ácidos grasos. Específicamente, el bioproducto puede tener un $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -28 o superior, de aproximadamente -27 o superior, -20 o superior, -18 o superior, -15 o superior, -13 o superior, -10 o superior, o -8 o superior. Por ejemplo, el bioproducto puede tener un $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -30 a aproximadamente -15, de aproximadamente -27 a aproximadamente -19, de aproximadamente -25 a aproximadamente -21, de aproximadamente -15 a aproximadamente -5, de aproximadamente -13 a aproximadamente -7, o de aproximadamente -13 a aproximadamente -10. En otros casos, el bioproducto puede tener un $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -10, -11, -12 o -12,3. Los bioproductos producidos de acuerdo con la divulgación del presente documento, también se puede distinguir de los compuestos orgánicos a base de petróleo comparando la cantidad de ^{14}C de cada compuesto. Como el ^{14}C tiene una semivida nuclear de 5.730 años, los combustibles a base de petróleo que contienen carbono más antiguo se pueden distinguir de los bioproductos que contienen carbono más nuevo (véase, por ejemplo, Currie, "Source Apportionment of Atmospheric Particles, Characterization of Environmental Particles", J. Buffle y H. P. van Leeuwen, Eds., 1 de Vol. I de IUPAC Environmental Analytical Chemistry Series (Lewis Publishers, Inc.) 3-74, (1992)). La suposición básica en la datación de radiocarbono es que la constancia de la concentración de ^{14}C en la atmósfera conduce a la constancia de ^{14}C en los organismos vivos. Sin embargo, debido a las pruebas nucleares atmosféricas desde 1950 y a la quema de combustible fósil desde 1850, el ^{14}C ha adquirido una segunda característica temporal geoquímica. Su concentración en el CO_2 atmosférico y, por consiguiente, en la biosfera viva, aproximadamente se ha duplicado en el máximo de las pruebas nucleares, a mediados de la década de los 60 del siglo pasado. Desde entonces, ha regresado gradualmente a la tasa de isótopos basales cosmogénicos (atmosféricos) en estado estacionario ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$) de aproximadamente $1,2 \times 10^{-12}$, con una "semivida" de relajación aproximada de 7-10 años. Esta última semivida no debe tomarse literalmente; si no que, debe usarse la función de entrada nuclear atmosférica/desintegración detallada para trazar la variación del ^{14}C atmosférico y biosférico desde el inicio de la era nuclear. Es esta última característica temporal del ^{14}C biosférico la que mantiene la promesa de la datación anual del carbono biosférico reciente. El ^{14}C puede medirse mediante espectrometría de masas con acelerador (EMA), con los resultados dados en unidades de fracción de carbono moderno (fM). fM está definido por los materiales de referencia estándar (SRM) 4990B y 4990C del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) usados en el presente documento, la fracción de carbono moderno o fM tiene el mismo significado definido por los materiales de referencia estándar (SRM) 4990B y 4990C del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, National Institute of Standards and Technology), conocidos como patrones de ácidos oxálicos HOxI y HOxII, respectivamente. La definición fundamental se refiere a 0,95 veces la proporción de isótopos de $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ HOxI (denominada AD 1950). Esto es más o menos equivalente a la madera de antes de la revolución industrial corregida para la desintegración. Para la biosfera viva actual (materia vegetal), fM es de aproximadamente 1,1. Las composiciones descritas en el presente documento incluyen bioproductos que pueden tener una fM ^{14}C de al menos aproximadamente 1. Por ejemplo, el bioproducto de la divulgación puede tener una fM ^{14}C de al menos aproximadamente 1,01, una fM ^{14}C de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5, una fM ^{14}C de aproximadamente 1,04 a aproximadamente 1,18, o una fM ^{14}C de aproximadamente 1,111 a aproximadamente 1,124.

Otra medida de ^{14}C se conoce como el porcentaje de carbono moderno (pMC). Para un arqueólogo o geólogo que usa dataciones con ^{14}C , AD 1950 es igual a cero años. Esto también representa un pMC de 100. La bomba de carbono en la atmósfera alcanzó casi el doble del nivel normal en 1963 en el pico de las armas termo-nucleares. Su distribución dentro de la atmósfera se ha aproximado desde su aparición, mostrando valores superiores a pMC de 100 para plantas y animales que viven desde AD 1950. Ha disminuido gradualmente con el tiempo y el valor actual está cerca de un pMC de 107,5. Esto significa que un material de biomasa nuevo, tal como de maíz, daría un distintivo de ^{14}C de pMC cercano a 107,5. Los compuestos a base de petróleo tendrán un valor de pMC de cero. La combinación de carbono fósil con carbono actual dará lugar a una dilución del contenido actual de pMC. Suponiendo que un pMC de 107,5 representa el contenido de ^{14}C de los materiales de biomasa actuales y un pMC de 0 representa el contenido de ^{14}C de los productos derivados del petróleo, el valor medido de pMC para ese material reflejará las proporciones de los dos tipos de componentes. Por ejemplo, un material derivado al 100 % de la soja actual daría un distintivo de radiocarbono de un valor de pMC cercano a 107,5. Si ese material se diluyera al 50 % con productos a base de petróleo, daría un distintivo de radiocarbono de un pMC de aproximadamente 54. Se deriva un contenido de carbono con base biológica asignando el 100 % igual a 107,5 pMC y el 0 % igual a 0 pMC. Por ejemplo, una muestra que mide un pMC de 99 dará un contenido de carbono con base biológica equivalente del 93 %. Este valor se conoce como el resultado medio de carbono con base biológica, y supone que todos los componentes de dentro del material analizado se originaron a partir del material biológico actual o del material a base de petróleo. Un bioproducto que comprende uno o más derivados de ácidos grasos como se describe en el presente documento puede tener un pMC de al menos

aproximadamente 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100. En otros casos, un derivado de ácido graso descrito en el presente documento puede tener un pMC de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100; de aproximadamente 60 y aproximadamente 100; de aproximadamente 70 y aproximadamente 100; de aproximadamente 80 y aproximadamente 100; de aproximadamente 85 y aproximadamente 100; de aproximadamente 87 y aproximadamente 98; o de aproximadamente 90 y aproximadamente 95. En otros casos más, un derivado de ácido graso descrito en el presente documento puede tener un pMC de aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94 o 94,2.

Ejemplos

- 10 Los siguientes ejemplos específicos están destinados a ilustrar la divulgación, y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera.

Protocolos y Métodos

15 Cribado de una biblioteca

- 20 Todos los protocolos descritos en el presente documento se basan en un sistema de placa de 96 pocillos de bloque maestro de 2 ml (Greiner Bio-One, Monroe, NC o Corning, Ámsterdam, Países Bajos) para cultivos en crecimiento y placas (Costar, Inc.) para extraer especies de ácidos grasos del caldo de cultivo. Los protocolos que se proporcionan a continuación son ejemplos de condiciones de fermentación. Se pueden usar protocolos alternativos para evaluar la producción de especies de ácidos grasos.

Protocolo de cultivo Plim a 32 °C

- 25 Se usaron 30 µl de cultivo LB (de un cultivo LB que crecía en una placa de 96 pocillos) para inocular 290 µl de medio Plim (Tabla 2), que luego se incubó durante aproximadamente 16 horas con agitación a 32 °C. Se usaron 40 µl de la semilla durante la noche para inocular 360 µl de medio Plim. Tras crecer a 32 °C durante 2 horas, los cultivos fueron inducidos con IPTG (concentración final de 1 mM) (Tabla 3 a continuación). Los cultivos se incubaron a 32 °C con agitación durante 20 horas si no se indica lo contrario, después de lo que se extrajeron siguiendo el protocolo de extracción convencional detallado a continuación.

Protocolo de cultivo Nlim a 35 °C

- 35 Se usaron 40 µl de cultivo LB (de un cultivo LB que crecía en una placa de 96 pocillos) para inocular 360 µl de medio LB (Tabla 3 a continuación), que luego se incubó durante aproximadamente 4 horas con agitación a 32 °C. Se usaron 40 µl de la semilla de LB para inocular 360 µl de medio Nlim. Después de crecer a 32 °C durante 2 h a 35 °C, los cultivos fueron inducidos con IPTG (concentración final de 1 mM) (Tabla 3 a continuación). Los cultivos se incubaron a 35 °C con agitación durante 20 horas si no se indica lo contrario, después de lo que se extrajeron siguiendo el protocolo de extracción convencional detallado a continuación.

Tabla 3: Nombres de medios y formulaciones

Nombre del medio	Formulación		
Plim	1	x	Solución salina de Plim con (NH ₄) ₂ SO ₄ x5
	1	x	Vitaminas traza x1000
	1	mg/l	10 mg/ml de tiamina
	1	mM	MgSO ₄ 1 M
	0,1	mM	CaCl ₂ 1 M
	40	g/l	500 g/l de glucosa

(continuación)

Nombre del medio	Formulación		
	1	x	Minerales traza x1000
	10	mg/l	10 g/l de citrato de Fe
	100	µg/ml	100 mg/ml de espectinomicina
	100	mM	BisTris 2 M (pH 7,0)
	0,5	mM	Ácido aminolevulínico
Nlim	1	x	Solución salina con NH ₄ Cl x5
	1	x	Vitaminas traza x1000
	1	mg/l	10 mg/ml de tiamina
	1	mM	MgSO ₄ 1 M
	0,1	mM	CaCl ₂ 1 M
	40	g/l	500 g/l de glucosa
	1	x	Minerales traza x1000
	10	mg/l	10 g/l de citrato de Fe
	100	µg/ml	100 mg/ml de espectinomicina
	100	mM	BisTris 2 M (pH 7,0)
	0,5	mM	Ácido aminolevulínico

Protocolo convencional de extracción de especies de ácidos grasos

Se añadieron, a cada pocillo que se iba a extraer, 80 µl de HCl 1 M, seguidos de 400 µl de acetato de butilo (con 500 mg/l de pentadecanol como patrón interno). Se sellaron las placas de 96 pocillos con calor usando un sellador de placas (calentador ALPS-300; Abgene, ThermoScientific, Rockford, IL), y se agitaron durante 15 minutos a 2000 rpm usando el mezclador MIXMATE (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Después de la agitación, las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 4500 rpm a temperatura ambiente (Allegra X-15R, rotor SX4750A, Beckman Coulter, Brea, CA) para separar las capas acuosa y orgánica. Se transfirieron 100 µl de la capa orgánica a una placa de 96 pocillos (polipropileno, Corning, Ámsterdam, Holanda) y se derivatizaron con 100 µl de BSTFA. La placa se selló posteriormente con calor y se almacenó a -20 °C hasta que se evaluó mediante GC-FID usando el método de FFA ω-OH, que se llevó a cabo de la siguiente manera: Se inyectó 1 µl de muestra en una columna analítica (DB-1, espesor de película de 10 m x 180 µm x 0,2 µm, disponible de JW 121-101A) en un dispositivo Agilent 7890A GC Ultra (Agilent, Santa Clara, CA) con un detector de ionización de llama (FID, *Flame Ionization Detector*) con una división 1-20. El instrumento se configuró para detectar y cuantificar ácidos grasos C₁₀ a C₁₈ y ácidos grasos ω-hidroxiados. El protocolo detallado anteriormente representa las condiciones convencionales, que pueden modificarse según sea necesario para optimizar los resultados analíticos.

Construcción de bibliotecas propensas a errores

Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para preparar bibliotecas propensas a errores. En un ejemplo, se preparó la estructura principal del vector usando endonucleasas de restricción en el vector, mientras que se generó la creación de diversidad en la inserción de ADN mediante amplificación por PCR a partir de un molde de ADN en condiciones que favorecían la incorporación de nucleótidos desapareados. En un enfoque, la clonación de la estructura principal del vector y una inserción de ADN con diversidad se realizó usando el Sistema de Clonación INFUSION (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Construcción de bibliotecas de saturación

Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para preparar bibliotecas de saturación. En un ejemplo, se preparó la estructura principal del vector usando endonucleasas de restricción en el vector, mientras que la creación de diversidad en la inserción de ADN se generó usando cebadores degenerados. En un enfoque, la clonación de la estructura principal del vector y una inserción de ADN con diversidad se realizó usando el Sistema de Clonación INFUSION (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) según el protocolo del fabricante.

Creación de bibliotecas combinadas

Se combinaron las mutaciones identificadas como beneficiosas para proporcionar variantes de polipéptidos de fusión híbrida de CYP153-reductasa (por ejemplo, variantes de proteína híbrida de CYP153A-RedRhF) con mejoras adicionales en la producción de especies derivadas de ácido graso ω -OH. Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para preparar las bibliotecas de combinación. En un ejemplo, se preparó la estructura principal del vector usando endonucleasas de restricción en el vector, mientras que la creación de diversidad en la inserción de ADN se generó usando cebadores para introducir las mutaciones deseadas. Como se ha descrito anteriormente, en un enfoque, la clonación de la estructura principal del vector y una inserción de ADN con diversidad se realizó usando el Sistema de Clonación INFUSION (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las bibliotecas de combinación se pueden generar usando el protocolo de transferencia por PCR (tPCR) (Erijman *et al.* (2011) *J. Structural Bio.* 175:171-177).

Cribado de bibliotecas

Una vez que se generó la diversidad de las bibliotecas en una biblioteca propenso a errores, de saturación y de combinación, se realizó el cribado usando uno de los métodos descritos anteriormente. Se identificaron dos tipos de aciertos: (1) aumento de la cantidad de ácidos grasos ω -hidroxi (título de FFA ω -OH); y/o (2) aumento de la conversión de los ácidos grasos en ácidos grasos ω -hidroxi. Se identificaron las mutaciones en las variantes de proteína híbrida de CYP153A-RedRhF dentro de cada acierto mediante secuenciación, usando técnicas convencionales comúnmente empleadas por los expertos en la materia. Las Tablas 5, 6 y 7 que figuran a continuación enumeran las mutaciones (los aciertos) que se han identificado como beneficiosas en las bibliotecas de saturación.

Ejemplo 1: Construcción de cepas y plásmidos para el cribado de bibliotecas

Este ejemplo describe las cepas y los plásmidos contruidos para la saturación o el cribado de las bibliotecas por mutagénesis combinatoria.

Se creó un gen codificante de una proteína de fusión híbrida hecha de la proteína catalítica P450 CYP153A(G307A) de *Marinobacter aquaeoli* y el dominio reductasa que contiene FMN y Fe/S c-terminal de P450RhF de *Rhodococcus* sp. NCIMB9784 de la siguiente manera: Se amplificó el gen *cyp165A*(G307A)_Maqu a partir de ADN genómico y se fusionó con un dominio reductasa de P450RhF sintético con optimización de codones mediante PCR cruzada. El gen de fusión resultante (SEQ ID NO: 5) se clonó en un derivado de pACYC (es decir, replicón de p15A, marcador de resistencia a la kanamicina) de modo que su transcripción era controlada por el promotor de *P_{trc}* inducible por IPTG. El plásmido se denominó pEP125 (véase la Tabla 4, más adelante).

También se amplificó el gen codificante de la proteína de fusión híbrida de CYP153A(G307A)-Red450RhF a partir de pEP125, y se clonó en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a la espectinomicina), de modo que su transcripción era controlada por el promotor de *P_{trc}* inducible por IPTG, y formó un operón con genes codificantes de una tioesterasa vegetal (*fatB1*), una variante de 3-ceto-acil-ACP sintasa (*fabB*) y un regulador de la transcripción (*fadR*). El plásmido se denominó pLC81 (véase la Tabla 4, más adelante).

Se crearon plásmidos adicionales de la siguiente manera: Se sintetizó el gen codificante de una tioesterasa vegetal (*fatB1*) de *Umbellularia californica* como ADN con optimización de codones, y se clonó en un vector derivado de pCL1920 (replicón de SC101, marcador de resistencia a la espectinomicina), de modo que su transcripción era controlada por el promotor de *P_{trc}* inducible por IPTG, y formó un operón con genes codificantes de la acetil-CoA carboxilasa (*accD*ACB), biotina ligasa (*birA*) y una proteína portadora de acilo. El plásmido se denominó pNH305 (véase la Tabla 4, más adelante). El plásmido pAS033 se creó reemplazando *fatB1* en pNH305 con una tioesterasa vegetal sintética con optimización de codones (*fatA3*) de *Arabidopsis thaliana* (véase Tabla 4, más adelante). El plásmido pEP146 se creó reemplazando *fatB1* en pLC81 con una tioesterasa vegetal sintética con optimización de codones (*fatA3*) de *Arabidopsis thaliana* (véase Tabla 4, más adelante). pEP146 también portaba una mutación en la proteína repA codificada por el plásmido.

Las cepas base usadas para la transformación de plásmidos fueron GLP077 y BZ128. En resumen, el genoma de la cepa base GLPH077 se manipuló de la siguiente manera: se eliminó el gen de acil-CoA deshidrogenasa (*fadE*) y se sobreexpresó un regulador de la transcripción (*fadR*) y un operón de la biosíntesis de ácidos grasos sintético. En resumen, el genoma de la cepa base BZ128 se manipuló de la siguiente manera: se eliminó el gen *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa) y se sobreexpresaron un operón de la biosíntesis de ácidos grasos sintético, una acil-ACP deshidratasa de ácidos grasos β -hidroxi (*fabZ*) y una variante de una tioesterasa (*tesA*). Además, la cepa había sido previamente sometida a transposón, así como a mutagénesis y a cribado de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG).

Tabla 4: Plásmidos usados para el cribado de bibliotecas

Plásmido	Descripción
pAS033	pCL-fatA3 _Atal-accDCBAbirA_Cglu-acp_Ecol
pEP125	pACYC-cyp153A(G307A)_Maqu-RedRhF_Rhod
pNH305	pCL-fatB1_Ucal-accDCBAbirA_Cglu-acp_Ecol
pLC81	pCL-cyp153A(G307A)_Maqu-RedRhF_Rhod-fatB1_Ucal-fadB_Ecol-fadR_Ecol
pEP146	pCL*-cyp153A(G307A)_Maqu-RedRhF_Rhod-fatA3-Atal-fadB_Ecol-fadR_Ecol

La proteína de fusión híbrida de CYP153A(G307A)-Red450RhF se probó para ver si la expresión en las células hospedadoras podría producir derivados de ácidos grasos ω -OP. Un microorganismo que expresaba SEQ ID NO: 5 fue capaz de producir más de 1 g/l de derivados de ácidos grasos ω -OP a partir de glucosa. Por lo tanto, se seleccionó esta enzima diseñada genéticamente para futuros estudios de evolución.

Ejemplo 2: Bibliotecas de saturación del dominio catalítico P450 de la proteína de fusión de cyp153A(G307A)-Red450RhF

Se construyó una biblioteca de saturación total del dominio catalítico P450 de la proteína de fusión de cyp153A-Red450RhF, y se cribó en busca de variantes que mostraran mejoras frente a cyp153A(G307A)-Red450RhF (es decir, el polipéptido molde). G307A (es decir, un resto de alanina que reemplaza a una glicina en la posición 307) es una mutación beneficiosa que mejora la actividad ω -hidroxilasa de cyp153A (véase Honda Malca *et al.* (2012) *Chem. Commun.* 48: 5115). Los criterios de selección para los aciertos fueron (1) aumento de la cantidad de ácidos grasos ω -hidroxi (título de FFA ω OH); y/o (2) aumento de la conversión de los ácidos grasos en ácidos grasos ω -hidroxi.

Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para preparar bibliotecas de saturación. Se usaron los plásmidos pEP125 y pLC81 (véase la Tabla 4, anterior) para crear las bibliotecas de saturación total. Se cribaron tres bibliotecas de saturación: Para la primera biblioteca, pEP125 se transformó junto con pNH305 en la cepa GLPH077, para la segunda biblioteca, pLC81 se transformó en BZ128, y para la tercera biblioteca, pEP125 se transformó junto con pAS.033 en la cepa GLPH077. La primera y segunda biblioteca se cribaron en particular en busca de variantes mejoradas en la formación de ácido dodecanoico ω -hidroxi, y la tercera biblioteca se cribó en particular en busca de variantes mejoradas en la formación de ácido hexadecenoico ω -hidroxi. Las bibliotecas se cribaron usando uno de los protocolos convencionales descritos anteriormente. Las variantes mejoradas se muestran en las Tablas 5 a 7 que figuran a continuación (más adelante). En particular, las variantes de la posición 141 se identificaron múltiples veces, y se descubrió que eran enzimas significativamente mejoradas tanto para la formación de ácido dodecanoico ω -hidroxi como para la formación de ácido hexadecenoico ω -hidroxi.

Tabla 5: Sumario de variantes mejoradas de la primera biblioteca de saturación de sitio del dominio catalítico de cyp153A(G307A)-Red450RhF.

FFA ω -OH	FAS totales	% de FFA ω -OH	FIOC	% de C _{12:0} ω -OH en C _{12:0}	FIOC	Aminoácido	Codones
1346,3	2236,6	60,2	1,33	83,1	1,08	V141Q	GTG/CAG
1201,1	2149,3	55,9	1,23	84,1	1,10	D134G	GAC/GGG
1106,2	2006,9	55,1	1,22	82	1,07	R40H	AGG/CAC
1007,9	1839,7	54,8	1,21	86,1	1,12	V141I	GTG/ATC
962,5	1791,2	53,7	1,19	81,1	1,06	K41V	AAG/GTG
1228,6	2298,6	53,4	1,18	80,2	1,05	M419V	ATG/GTC
1046,8	1958,5	53,4	1,18	80,1	1,05	V154A	GTG/GCC
990,7	1865,4	53,1	1,17	84,9	1,11	D134G	GAC/GGT
1203,1	2313,1	52	1,15	81,6	1,07	D134G	GAC/GGG
908,7	1773,2	51,2	1,13	80,3	1,05	I11C	ATT/TGC
1020,1	2057	49,6	1,09	81,4	1,06	R205L	CGC/TTG
1256	2688,4	46,7	1,03	72,6	0,95	L304W	CTC/TGG
883,2	1960,8	45,3	1,00	76,6	1,00		

FIOC: Mejora frente al control; El control está en negrita

ES 2 803 560 T3

Tabla 6: Sumario de variantes mejoradas de la segunda biblioteca de saturación de sitio del dominio catalítico de cyp153A(G307A)-Red450RhF

<u>Mutación 1</u>	<u>Mutación 2</u>	<u>FFA ω-OH</u> <u>totales</u>	<u>FAS</u> <u>totales</u>	<u>% de</u> <u>FFA ω-OH</u>	<u>FIOC</u>	<u>% de C_{12:0} ω-OH en</u> <u>FAS C_{12:0}</u>	<u>FIOC</u>
V415R	0	928,10	2880,10	32,23	1,85	33,29	1,96
V415R	0	941,13	2980,97	31,58	1,81	32,98	1,94
V154A	0	694,63	2959,63	23,47	1,35	23,06	1,36
V154A	0	716,00	2963,77	24,16	1,39	23,88	1,40
V154A	0	686,93	2926,97	23,47	1,35	23,40	1,38
V141M	E142Q	717,80	2873,73	24,98	1,44	28,51	1,68
V141I	0	749,07	2971,23	25,21	1,45	31,96	1,88
V141I	0	778,87	2886,77	26,98	1,55	34,27	2,02
V141I	0	754,67	2918,90	25,85	1,49	32,85	1,93
V141I	R258Y	672,13	2909,13	23,10	1,33	29,24	1,72
V141I	0	810,23	2912,67	27,83	1,60	35,86	2,11
S233R	0	720,13	2838,00	25,37	1,46	30,82	1,81
S233R	0	746,20	2912,97	25,61	1,47	31,15	1,83
S233N	0	735,57	2905,40	25,33	1,46	25,77	1,52
S233N	0	698,80	2915,17	23,97	1,38	24,40	1,44
S233N	0	732,47	2949,93	24,83	1,43	25,29	1,49
S233N	0	725,97	3018,60	24,05	1,38	24,76	1,46
R82D	E271F	629,03	2914,83	21,58	1,24	20,90	1,23
R6F	R178N	792,33	2845,17	27,85	1,60	28,56	1,68
R6F	V141I	833,13	2871,87	29,01	1,67	36,28	2,13
R27L	0	742,57	2857,53	25,99	1,49	26,10	1,54
R178N	0	701,17	2983,60	23,50	1,35	24,98	1,47
Q129R	0	675,07	2847,37	23,71	1,36	27,97	1,65
Q129R	0	812,23	3044,30	26,68	1,53	31,29	1,84
Q129R	0	660,53	2967,23	22,26	1,28	26,24	1,54
P149R	S157V	684,03	3011,80	22,71	1,31	23,04	1,36
P149R	0	771,40	2959,70	26,06	1,50	26,12	1,54
P149R	0	731,10	2966,13	24,65	1,42	24,75	1,46
P149R	0	757,97	3014,93	25,14	1,45	25,49	1,50
P149R	0	765,90	2963,50	25,84	1,49	26,16	1,54
P149R	0	734,30	2923,70	25,12	1,44	25,50	1,50
P149R	0	745,00	2993,83	24,88	1,43	25,47	1,50
P136T	0	724,53	2980,20	24,31	1,40	24,97	1,47
P136T	0	729,37	3017,67	24,17	1,39	24,90	1,46
P136T	0	678,33	2850,87	23,79	1,37	24,39	1,43
P136C	0	702,27	2947,23	23,83	1,37	25,36	1,49
P136C	0	689,77	3069,63	22,47	1,29	24,01	1,41
N407A	0	731,50	3042,77	24,04	1,38	24,56	1,44
N407A	0	704,47	3015,93	23,36	1,34	23,75	1,40
M228R	0	344,60	2992,27	11,52	0,66	18,33	1,08
L168V	0	793,20	2938,23	27,00	1,55	27,84	1,64
G161P	0	718,33	2938,47	24,45	1,41	24,28	1,43
G161A	0	639,93	2943,40	21,74	1,25	21,65	1,27
G138F	N407A	667,93	2825,43	23,64	1,36	26,09	1,53
F116R	V415R	678,77	2854,97	23,78	1,37	24,14	1,42
E142R	0	663,67	2925,83	22,68	1,30	22,86	1,34

(continuación)

<u>Mutación 1</u>	<u>Mutación 2</u>	<u>FFA ω-OH</u> <u>totales</u>	<u>FAS</u> <u>totales</u>	<u>% de</u> <u>FFA ω-</u> <u>OH</u>	<u>FIOC</u>	<u>% de C_{12:0} ω-OH en</u> <u>FAS C_{12:0}</u>	<u>FIOC</u>
E142R	0	628,03	2930,57	21,43	1,23	21,62	1,27
E142R	0	639,23	2972,03	21,51	1,24	21,86	1,29
D153G	0	787,87	3018,90	26,13	1,50	26,94	1,58
D153G	0	746,20	3039,10	24,55	1,41	25,31	1,49
0	0	543,65	3117,75	17,44	1,00	17,04	1,00

FIOC: Mejora frente al control; El control está en negrita

Tabla 7: Sumario de variantes mejoradas de la tercera biblioteca de saturación de sitio del dominio catalítico de cyp153A(G307A)-Red450RhF

<u>FFA ω-</u> <u>OH</u>	<u>FAS</u> <u>totales</u>	<u>% de</u> <u>FFA ω-</u> <u>OH</u>	<u>FIOC</u>	<u>% de C_{16:0} ω-</u> <u>OH en C_{16:0}</u>	<u>FIOC</u>	<u>% de C_{16:1} ω-</u> <u>OH en C_{16:1}</u>	<u>FIOC</u>	<u>Aminoác</u> <u>idos</u>	<u>Codones</u>
1298,5	2342,5	55,43	1,53	64,61	1,33	49,02	2,00	N309R	AAC/CGG
1095,9	2374,3	46,16	1,28	58,36	1,20	34,41	1,40	V141G	GTG/GGG
1564	3448,1	45,36	1,25	62,78	1,29	32,88	1,34	L132T	CTC/ACT
1092,9	2391,4	45,70	1,26	60,82	1,25	32,96	1,34	F144R	TTC/AGG
1170,5	2529,6	46,27	1,28	62,41	1,28	31,91	1,30	I131L	ATT/TTG
1232,9	2685,8	45,90	1,27	55,17	1,13	37,63	1,53	G308W	GGC/TGG
931,1	2570,1	36,2	1,00	48,70	1,00	24,53	1,00		

FIOC: Mejora frente al control; El control está en negrita

5 Ejemplo 3: Bibliotecas de saturación parcial de sitio del dominio reductasa de la proteína de fusión de cyp153A (G307A)-Red450RhF

Se construyó una biblioteca de saturación parcial (se mutó cada décimo aminoácido) de los dominios reductasa de la proteína de fusión híbrida de cyp153A-Red450RhF, y se cribó en busca de variantes que mostraran mejoras frente a cyp153A (V141I, A231T, G307A)-Red450RhF (SEQ ID NO: 32), y se identificó una variante en la biblioteca de mutagénesis por saturación de sitio del dominio catalítico P450 cyp153A. Los criterios de selección para los aciertos fueron (1) aumento de la cantidad de ácido dodecanoico ω -hidroxi (título de FFA ω OH); y/o (2) aumento de la conversión de ácido dodecanoico en ácido dodecanoico ω -hidroxi.

Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para preparar bibliotecas de saturación. Para la biblioteca, se transformó pLC81 que albergaba cyp153A(V141I, A231T, G307A)-Red450RhF en BZ128. La biblioteca se cribó usando uno de los protocolos convencionales descritos anteriormente. Las variantes mejoradas se muestran en la Tabla 8. En particular, las variantes A796V (SEQ ID: 42) y P666A fueron enzimas significativamente mejores.

Tabla 8: Sumario de variantes mejoradas de la biblioteca de saturación parcial del dominio reductasa de cyp153A(V141I A231T G307A)-Red450RhF

<u>Mutación de</u> <u>RhF</u>	<u>FFA ω-OH</u>	<u>FAS</u>	<u>% de FFA</u> <u>ω-OH</u>	<u>FIOC</u>	<u>C_{12:0} ω-OH en</u> <u>FAS C_{12:0}</u>	<u>FIOC</u>
P666K	1012,1	2945,5	34,36	1,09	44,08	1,07
P666A	1575,9	2918,7	53,99	1,71	68,35	1,66
T516E	1150,4	2966,2	38,78	1,23	49,01	1,19
V696K	983,4	2955,4	33,27	1,05	43,02	1,05
0	950,3	3004,6	31,63	1,00	41,13	1,00

(continuación)

Mutación de RhF	FFA ω-OH	FAS	% de FFA ω-OH	FIOC	C_{12:0} ω-OH en FAS C_{12:0}	FIOC
A796V	2458,0	3884,7	63,27	1,81	76,58	1,70
0	1363,7	3905,2	34,92	1,00	44,96	1,00

FIOC: Mejora frente al control; El control está en negrita

Ejemplo 4: Biblioteca combinatoria del dominio reductasa de la proteína de fusión de cyp153A (G307A)-Red450RhF

Las mutaciones beneficiosas identificadas en la biblioteca de saturación parcial del dominio reductasa (Ejemplo 3) fueron la base de una biblioteca de combinación para mejorar aún más la proteína de fusión de cyp153A(G307A)-Red450RhF. Los criterios de selección fueron (1) aumento de la cantidad de ácido dodecanoico (título de FFA ω OH); y/o (2) aumento de la conversión de ácido dodecanoico en ácido dodecanoico.

Se construyó la biblioteca de combinación en pLC81 que albergaba cyp153A (V141I, A231T, G307A)-Red450RhF (SEQ ID: 32) y se transformó en BZ128. Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para preparar bibliotecas de combinación. La biblioteca se cribó usando uno de los protocolos convencionales descritos anteriormente. Las variantes mejoradas se muestran en la Tabla 9 que figura a continuación.

Tabla 9: Sumario de variantes mejoradas de una biblioteca de combinación del dominio reductasa de cyp153A (V141I, A231T, G307A)-Red450RhF

Mutación de P450	Mutación de RhF	FFA ω-OH	FAS	% de FFA ω-OH	FIOC	% de C_{12:0} ω-OH en FAS C_{12:0}	FIOC
1411, 231T	T516G, P666M, A769V	851	983	86,8	1,29	88,3	1,23
141I, 231T	T516G, P666H, A769V	1557	2214	69,2	1,03	73,1	1,02
1411, 231T	T516V, P666D, A769V	1491	1999	74,5	1,11	76,9	1,07
1411, 231T	P666M, V696T	916,88	1125	81,4	1,21	82,9	1,15
141I, 231T	A769V	1528,33	2280	67,1	1,00	71,8	1,00

FIOC: Mejora frente al control; El control está en negrita

Ejemplo 5: Biblioteca combinatoria del dominio catalítico y dominio reductasa de la proteína de fusión de cyp153A (G307A)-Red450RhF

Las mutaciones beneficiosas identificadas en la biblioteca de saturación (Ejemplo 2 y 3) fueron la base de una biblioteca de combinación para mejorar aún más la proteína de fusión de cyp153A(G307A)-Red450RhF. Los criterios de selección fueron (1) aumento de la cantidad de ácido dodecanoico (título de FFA ω OH); y/o (2) aumento de la conversión de ácido dodecanoico en ácido dodecanoico. Se construyó la biblioteca de combinación en pLC81 y se transformó en BZ128. Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para preparar bibliotecas de combinación. La biblioteca se cribó usando uno de los protocolos convencionales descritos anteriormente. Las dos mejores variantes mejoradas se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Mejores variantes mejoradas de una biblioteca combinatoria de cyp153A(G307A)-Red450RhF

Mutaciones	SEQ ID	FFA ω-OH*	FAS*	FFA ω-OH	C_{12:0} ω-OH en FAS C_{12:0}
R27I, R82D, V141M, R178N, N407A	34	2290,3	3665,1	62,4 %	74,1 %
R27I, R82D, V141M, R178N, N407A, A796V	44	3499,5	4154,9	84,5 %	93,1 %

* Título (mg/l) después de 48 h

Ejemplo 6: Mutagénesis por saturación de sitio de las posiciones 141 y 309 de cyp153A (G307A,A796V)-Red450RhF

Se observó que los cambios en la posición 141 influían en la especificidad del sustrato. Por lo tanto, se llevó a cabo

una mutagénesis por saturación de sitio de estas dos posiciones en *cyp153A*(G307A,A796V)-Red450RhF. Los criterios de selección para los aciertos fueron (1) aumento de la cantidad de ácido hexadecenoico; y/o (2) aumento de la conversión de ácido hexadecenoico en ácido hexadecenoico ω -hidroxi.

Para la biblioteca, se transformó pEP146 que albergaba *cyp153A*(G307A,A796V)-Red450RhF (SEQ ID: 38) en BZ128. Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para preparar bibliotecas de saturación de sitio. La biblioteca se cribó usando uno de los protocolos convencionales descritos anteriormente. Las variantes mejoradas se muestran en la Figura 2. En particular, las variantes con V141T (SEQ ID: 46) mostraron el mayor título de ácido hexadecenoico y la mayor conversión de ácido hexadecenoico.

EJEMPLO 7: Bibliotecas de saturación de proteína de fusión de *cyp153A*(G307A)-Red450RhF A796V)

Se construyó una biblioteca de saturación total de la proteína de fusión de *cyp153A*-Red450RhF, y se cribó en busca de variantes que mostraran mejoras frente a *cyp153A*(G307A)-Red450RhF (es decir, el polipéptido molde). G307A (es decir, un resto de alanina que reemplazaba a una glicina en la posición 307) y A796V (es decir, un resto de valina que reemplazaba a una alanina en la posición 796) son mutaciones beneficiosas que mejoran la actividad ω -hidroxilasa de *cyp153A* (véase lo anterior). Los criterios de selección para los aciertos fueron (1) un aumento de la cantidad de ácidos grasos (título de FFA ω -OH); y/o (2) un aumento de la conversión de ácidos grasos en ácidos grasos.

Se usaron técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para preparar la biblioteca de saturación. Se usó el plásmido pEP302 para crear la biblioteca de saturación total, que era un derivado de pEP146 (véase la Tabla 4), en el que se alteró el orden de los genes (*fatA3-fadB-fadR-cyp153A*(G307A)-Red450RhF(A796V)) y el último gen se expresó desde un promotor separado. La biblioteca se transformó en la cepa stNH1525. En resumen, el genoma de la cepa base stNH1525 se manipuló de la siguiente manera: se eliminó el gen *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa) y se sobreexpresó un operón de la biosíntesis de ácidos grasos sintético. Además, la cepa había sido previamente sometida a transposón, así como a mutagénesis y a cribado de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG).

Las bibliotecas se cribaron usando uno de los protocolos convencionales descritos anteriormente. Las variantes mejoradas se muestran en la Tabla 11 que figura a continuación, en particular, variantes que mejoraron significativamente la formación de ácido hexadecanoico y ácido hexadecenoico.

Tabla 11: Sumario de variantes mejoradas de la biblioteca de saturación de sitio de *cyp153A*(G307A)-Red450RhF(A796V)

FFA ω -OH	FAS totales	% de FFA ω -OH	FOIC	% de C _{16:1} ω -OH en C _{16:0}	FOIC	% de C _{16:0} ω -OH en C _{16:0}	FOIC	Aminoácidos	Codones
1201,0	1751,4	68,6	1,8	59,7	2,1	80,1	1,4	D747N	AAC
1007,7	1733,3	58,1	1,6	50,6	1,9	79,0	1,4	Q12W	TGG
793,2	1366,8	58,0	1,6	54,4	2,0	77,1	1,3	P327D	GAT
955,6	1714,9	55,7	1,5	50,6	1,7	74,9	1,3	R14F	TTC
678,7	1235,6	54,9	1,4	52,6	1,8	73,1	1,3	N61L	TTG
855,8	1629,3	52,5	1,4	44,6	1,6	72,9	1,3	R27L	TTG
911,6	1763,5	51,7	1,4	44,7	1,6	72,3	1,2	Q28M	ATG
858,1	1678,7	51,1	1,3	46,8	1,6	69,9	1,2	S13K	AAG
1247,9	2458,5	50,8	1,3	44,3	1,6	67,8	1,2	V771F	TTC
850,2	1686,3	50,4	1,3	42,1	1,5	71,6	1,2	Q12T	ACG
810,3	1615,4	50,2	1,3	46,8	1,6	65,0	1,1	K119R	CGG
821,1	1639,9	50,1	1,3	43,7	1,6	70,1	1,2	D10Y	TAC
807,4	1676,8	48,2	1,3	40,8	1,4	68,7	1,2	Q12R	AGG
722,5	1519,4	47,6	1,3	39,3	1,4	68,9	1,2	I11L	TTG
748,9	1576,6	47,5	1,2	42,4	1,5	66,3	1,1	Q28T	ACG
733,8	1546,2	47,5	1,3	38,7	1,4	68,9	1,2	A231Y	TAC
1198,9	2528,5	47,4	1,2	39,9	1,4	67,5	1,2	P745R	CGC/CGG
769,8	1647,1	46,7	1,2	38,1	1,4	68,0	1,2	D9N	AAT
1133,4	2469,6	45,9	1,2	38,1	1,4	65,6	1,1	T770G	GGT

ES 2 803 560 T3

(continuación)

FFA ω-OH	FAS totales	% de FFA ω-OH	FOIC	% de C _{16:1} ω-OH en C _{16:1}	FOIC	% de C _{16:0} ω-OH en C _{16:0}	FOIC	Aminoácidos	Codones
763,7	1672,4	45,7	1,2	39,0	1,4	63,2	1,1	Y413R	AGG
1146,2	2514,4	45,6	1,2	37,0	1,3	66,0	1,1	M784I	ATC
729,8	1610,4	45,3	1,2	36,5	1,3	65,8	1,1	D9K	AAG
1078,0	2390,8	45,1	1,2	35,7	1,3	66,7	1,1	E749L	TTG
752,9	1682,8	44,7	1,2	38,1	1,3	63,7	1,1	S233L	TTG
940,3	2111,2	44,5	1,2	35,9	1,3	65,4	1,1	E757A	GCG
1063,1	2405,5	44,2	1,2	35,5	1,3	65,0	1,1	L703G	GGG
632,5	1434,9	44,1	1,2	37,5	1,3	61,5	1,1	N309S	TCT
755,7	1715,3	44,1	1,2	35,0	1,3	64,5	1,1	S140N	AAC
1070,7	2441,3	43,9	1,2	37,6	1,3	60,9	1,0	L706E	GAG
757,3	1753,4	43,2	1,2	33,7	1,2	65,2	1,1	I480G	GGT
880,6	2044,0	43,1	1,2	33,6	1,2	65,3	1,1	G481I	ATT
989,8	2301,4	43,0	1,1	35,0	1,2	62,5	1,1	R719W	TGG
1062,9	2478,7	42,9	1,1	35,7	1,3	61,1	1,0	L706S	TCG
906,2	2116,3	42,8	1,1	34,8	1,3	62,5	1,1	E557W	TGG
734,0	1717,3	42,7	1,1	34,1	1,3	60,6	1,0	S157R	CGG
651,4	1527,0	42,7	1,1	35,9	1,2	61,1	1,1	S233V	GTC
710,4	1667,8	42,6	1,1	35,6	1,2	60,6	1,0	A231V	GTA
663,4	1558,7	42,6	1,1	33,4	1,1	62,1	1,1	A164N	AAC
664,3	1564,2	42,5	1,1	32,3	1,2	64,7	1,1	A244R	CGG
711,2	1675,3	42,5	1,1	38,3	1,3	56,0	1,0	T302M	ATG
1010,3	2381,5	42,4	1,1	34,1	1,2	62,4	1,1	P708S	TCG
1015,6	2394,2	42,4	1,1	32,3	1,1	64,9	1,1	N741G	GGG
690,6	1630,5	42,4	1,1	33,3	1,2	63,0	1,1	P149G	GGG
656,9	1552,9	42,3	1,1	34,8	1,3	60,9	1,0	V154G	GGC
905,2	2139,9	42,3	1,1	33,1	1,2	63,6	1,1	E557R	CGG/AGG
946,6	2247,5	42,1	1,1	32,9	1,2	63,4	1,1	V710Q	CAG
1159,1	2753,7	42,1	1,1	32,6	1,2	65,7	1,1	E567S	TCC
640,8	1522,8	42,1	1,1	34,4	1,3	59,7	1,0	P149R	AGG
665,7	1587,4	41,9	1,1	33,0	1,2	61,8	1,1	N407G	GGG
1026,9	2465,0	41,7	1,1	31,7	1,1	63,9	1,1	D544N	AAC
941,4	2265,1	41,6	1,1	32,5	1,2	62,6	1,1	D709L	CTG
721,3	1747,4	41,3	1,1	35,1	1,2	58,3	1,0	G204V	GTT
985,6	2393,7	41,2	1,1	31,7	1,1	62,7	1,1	V710C	TGT
696,6	1694,0	41,1	1,1	32,3	1,2	61,5	1,1	R254G	GGG
664,3	1616,1	41,1	1,1	32,8	1,1	61,1	1,1	P273M	ATG
739,2	1801,0	41,0	1,1	33,8	1,2	59,9	1,0	F111A	GCG
1042,8	2540,9	41,0	1,1	31,6	1,1	62,5	1,1	E749M	ATG
681,8	1661,6	41,0	1,1	30,0	1,1	64,3	1,1	A231W	TGG
1017,8	2487,3	40,9	1,1	31,1	1,1	63,2	1,1	P546G	GGG
719,6	1760,1	40,9	1,1	32,2	1,2	60,4	1,0	V162C	TGC
950,8	2327,9	40,8	1,1	31,8	1,1	61,8	1,1	A736V	GTC
945,2	2314,2	40,8	1,1	34,2	1,2	58,5	1,0	L706H	CAC
914,2	2241,1	40,8	1,1	31,4	1,1	62,3	1,1	V710R	AGG
1055,3	2587,4	40,8	1,1	32,0	1,1	61,2	1,0	D707E	GAG
883,4	2168,3	40,7	1,1	32,5	1,2	60,7	1,0	D527E	GAG
921,4	2266,5	40,7	1,1	32,9	1,2	60,3	1,0	P745K	AAG

(continuación)

FFA ω -OH	FAS totales	% de FFA ω -OH	FOIC	% de C _{16:1} ω -OH en C _{16:1}	FOIC	% de C _{16:0} ω -OH en C _{16:0}	FOIC	Aminoácidos	Codones
728,9	1804,5	40,4	1,1	32,2	1,1	60,3	1,0	E271D	GAC
1031,5	2558,2	40,3	1,1	30,2	1,1	62,2	1,1	E557R	AGG
974,6	2429,2	40,1	1,1	30,6	1,1	61,8	1,1	D720V	GTG
647,6	1616,5	40,1	1,1	30,2	1,1	61,2	1,1	P56Q	CAG
934,9	2358,1	39,6	1,1	30,6	1,1	61,5	1,1	V648L	TTG
938,8	2376,0	39,5	1,1	32,0	1,1	58,6	1,0	S649I	ATC
672,1	1709,2	39,3	1,1	30,5	1,1	59,7	1,0	P477G	GGG
878,5	2245,0	39,1	1,1	30,2	1,1	60,1	1,1	E591Q	CAG
598,2	1582,9	37,8	1	28,4	1,0	57,8	1,0		

FOIC: Mejora frente al control interno; El control está en negrita

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> LS9, Inc.
	<120> POLIPÉPTIDOS DE FUSIÓN RELACIONADOS CON OMEGA-HIDROXILASA CON PROPIEDADES MEJORADAS
10	<130> LS00054P
	<140>
	<141>
15	<160> 46
	<170> PatentIn versión 3.5
20	<210> 1
	<211> 1413
	<212> ADN
	<213> <i>Marinobacter aquaeolei</i>
	<400> 1

ES 2 803 560 T3

```

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc      60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg      120
aagaccttcg gccacgccc accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt      180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag      240
tggcgcgcct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc      300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt      360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaadc attctcggtg accctccgga ggggctgtcg      420
gtggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgcag ctcggtgcag      480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc      540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag      600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag      660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc      720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg      780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg      840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat      900
ttgacgctgc tcatagtcgg cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tggtagcctg      960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt      1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc      1080
gccaagcagg atgtcgaact gggcgccag accatcaaga agggtagatc agttgtcatg      1140
tggtacgcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt      1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcaccg ttgcatgggc      1260

aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcac cttctgggaag aaataactca gcgttttgac      1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc      1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt taa                                     1413

```

<210> 2
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> *Marinobacter aquaeolei*

<400> 2

ES 2 803 560 T3

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1 5 10 15

Asn Ala Thr Ser Arg Val Val Pro Met Gln Arg Gln Ile Gln Gly Leu
20 25 30

Lys Phe Leu Met Ser Ala Lys Arg Lys Thr Phe Gly Pro Arg Arg Pro
35 40 45

Met Pro Glu Phe Val Glu Thr Pro Ile Pro Asp Val Asn Thr Leu Ala
50 55 60

Leu Glu Asp Ile Asp Val Ser Asn Pro Phe Leu Tyr Arg Gln Gly Gln
65 70 75 80

Trp Arg Ala Tyr Phe Lys Arg Leu Arg Asp Glu Ala Pro Val His Tyr
85 90 95

Gln Lys Asn Ser Pro Phe Gly Pro Phe Trp Ser Val Thr Arg Phe Glu
100 105 110

Asp Ile Leu Phe Val Asp Lys Ser His Asp Leu Phe Ser Ala Glu Pro
115 120 125

Gln Ile Ile Leu Gly Asp Pro Pro Glu Gly Leu Ser Val Glu Met Phe
130 135 140

Ile Ala Met Asp Pro Pro Lys His Asp Val Gln Arg Ser Ser Val Gln
145 150 155 160

Gly Val Val Ala Pro Lys Asn Leu Lys Glu Met Glu Gly Leu Ile Arg
165 170 175

Ser Arg Thr Gly Asp Val Leu Asp Ser Leu Pro Thr Asp Lys Pro Phe
180 185 190

Asn Trp Val Pro Ala Val Ser Lys Glu Leu Thr Gly Arg Met Leu Ala

ES 2 803 560 T3

195					200					205					
Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Glu	Glu	Arg	His	Lys	Leu	Val	Glu	Trp
210						215					220				
Ser	Asp	Arg	Met	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe	Ala
225					230					235					240
Asp	Glu	Asn	Ala	Met	Phe	Asp	Asp	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Arg	Ser	Phe
				245					250					255	
Ser	Arg	Leu	Trp	Arg	Asp	Lys	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Gly	Glu	Glu
			260					265					270		
Pro	Gly	Phe	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu	Gln	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys
		275					280					285			
Asp	Leu	Ile	Asn	Arg	Pro	Met	Glu	Phe	Ile	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu
	290					295					300				
Ile	Val	Gly	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Gly	Leu
305					310					315					320
Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Lys
				325					330					335	
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr
			340					345					350		
Pro	Leu	Ala	Tyr	Met	Arg	Arg	Ile	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Gly
		355					360					365			
Gly	Gln	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Ala	Ser
	370					375					380				
Gly	Asn	Arg	Asp	Glu	Arg	Lys	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Gln	Phe	Ile	Ile
385					390					395					400
Asp	Arg	Lys	Asp	Ala	Arg	Asn	His	Met	Ser	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	His
				405					410					415	
Arg	Cys	Met	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Trp
			420					425					430		
Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg	Phe	Asp	Asn	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Glu	Pro
		435					440					445			

ES 2 803 560 T3

Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
450 455 460

Lys Leu Thr Pro Asn Ser
465 470

<210> 3
<211> 1413
<212> ADN
<213> *Marinobacter aquaeolei*

<400> 3

```

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc      60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg      120
aagaccttcg gcccacgccg accgatgccc gaattcggtg aaacacccat cccggacggt      180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag      240
tggcgcgcct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc      300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt      360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaata attctcgggtg accctccgga ggggctgtcg      420
gtggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag      480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc      540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag      600
gaactcacag gccgcagtgt ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag      660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc      720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg      780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg      840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt taccgtaaat      900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tgggtggcctg      960
gtggccatga acgaattccc cagggaattht gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt     1020
ccgaacatgg tgcggaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc     1080
gccaaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga agggatgatc agttgtcatg     1140
tggtacgcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt     1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcaccg ttgcatgggc     1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcata ctctgggaag aaataactca gcgttttgac     1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc     1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt taa                                     1413

```

<210> 4
<211> 470

ES 2 803 560 T3

<212> PRT

<213> *Marinobacter aquaeolei*

<400> 4

5

```

Met  Pro  Thr  Leu  Pro  Arg  Thr  Phe  Asp  Asp  Ile  Gln  Ser  Arg  Leu  Ile
 1              5              10              15

Asn  Ala  Thr  Ser  Arg  Val  Val  Pro  Met  Gln  Arg  Gln  Ile  Gln  Gly  Leu
      20              25              30

Lys  Phe  Leu  Met  Ser  Ala  Lys  Arg  Lys  Thr  Phe  Gly  Pro  Arg  Arg  Pro
      35              40              45

Met  Pro  Glu  Phe  Val  Glu  Thr  Pro  Ile  Pro  Asp  Val  Asn  Thr  Leu  Ala
 50              55              60

Leu  Glu  Asp  Ile  Asp  Val  Ser  Asn  Pro  Phe  Leu  Tyr  Arg  Gln  Gly  Gln
65              70              75              80

Trp  Arg  Ala  Tyr  Phe  Lys  Arg  Leu  Arg  Asp  Glu  Ala  Pro  Val  His  Tyr
      85              90              95

Gln  Lys  Asn  Ser  Pro  Phe  Gly  Pro  Phe  Trp  Ser  Val  Thr  Arg  Phe  Glu
      100              105              110

Asp  Ile  Leu  Phe  Val  Asp  Lys  Ser  His  Asp  Leu  Phe  Ser  Ala  Glu  Pro
      115              120              125

Gln  Ile  Ile  Leu  Gly  Asp  Pro  Pro  Glu  Gly  Leu  Ser  Val  Glu  Met  Phe
      130              135              140

Ile  Ala  Met  Asp  Pro  Pro  Lys  His  Asp  Val  Gln  Arg  Ser  Ser  Val  Gln
145              150              155              160

Gly  Val  Val  Ala  Pro  Lys  Asn  Leu  Lys  Glu  Met  Glu  Gly  Leu  Ile  Arg
      165              170              175

Ser  Arg  Thr  Gly  Asp  Val  Leu  Asp  Ser  Leu  Pro  Thr  Asp  Lys  Pro  Phe
      180              185              190

Asn  Trp  Val  Pro  Ala  Val  Ser  Lys  Glu  Leu  Thr  Gly  Arg  Met  Leu  Ala
      195              200              205

Thr  Leu  Leu  Asp  Phe  Pro  Tyr  Glu  Glu  Arg  His  Lys  Leu  Val  Glu  Trp
      210              215              220

Ser  Asp  Arg  Met  Ala  Gly  Ala  Ala  Ser  Ala  Thr  Gly  Gly  Glu  Phe  Ala

```

ES 2 803 560 T3

225		230		235		240									
Asp	Glu	Asn	Ala	Met	Phe	Asp	Asp	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Arg	Ser	Phe
				245					250					255	
Ser	Arg	Leu	Trp	Arg	Asp	Lys	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Gly	Glu	Glu
			260					265					270		
Pro	Gly	Phe	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu	Gln	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys
		275					280					285			
Asp	Leu	Ile	Asn	Arg	Pro	Met	Glu	Phe	Ile	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu
	290					295					300				
Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Gly	Leu
305					310					315					320
Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Lys
				325					330					335	
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr
			340					345					350		
Pro	Leu	Ala	Tyr	Met	Arg	Arg	Ile	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Gly
	355						360					365			
Gly	Gln	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Ala	Ser
370						375					380				
Gly	Asn	Arg	Asp	Glu	Arg	Lys	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Gln	Phe	Ile	Ile
385					390					395					400
Asp	Arg	Lys	Asp	Ala	Arg	Asn	His	Met	Ser	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	His
				405					410					415	
Arg	Cys	Met	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Trp
			420					425					430		
Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg	Phe	Asp	Asn	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Glu	Pro
		435					440					445			
Glu	Arg	Val	Gln	Ser	Asn	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr	Ser	Arg	Leu	Met	Val
	450					455					460				
Lys	Leu	Thr	Pro	Asn	Ser										
465					470										

<210> 5
<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 5

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gcccacgccc accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag	240
tggcgcgcct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaadc attctcgggt accctccgga ggggctgtcg	420
gtggaaatgt tcatagcgat ggatccgccc aaacacgatg tgcagcgcag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc	540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtacctgc tgtttccaag	600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag	660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc	720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg	780
cgggacaagg aggcgcgccc cgcagcaggc gaggagcccc gtttcgattt gatcagcctg	840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat	900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tgggtggcctg	960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt	1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc	1080
gccaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga aggggtgatcg agttgtcatg	1140
tggtagcgtg cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt	1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcaccg ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcacg ctctgggaag aaataactcaa gcgttttgac	1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc	1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcaccaacc tgtcaccatc	1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtagacc ttgagcgtct tgatcgcat	1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg	1560
acgcctggcg ctcacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc	1620

ES 2 803 560 T3

```

ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgcact tagatccgga aagccgtggt 1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca 1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc 1800
ggcatcacgc cgtgctggc aatggcgga catgccctg cgctggttg gtcgtacgaa 1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcgt atggcttacc tggaacgcgt cgcgggacat 1920
ggtgaccgcy ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcacc gcattgatct ggcggcatta 1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaata tacgcctgcy gtccggggcg tttattagcy 2040
ggtcttgaag acgcgtctcy taattggccg gatggcgcyg ttcattgtga gcatttcact 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgcy gaacatgcct ttgatttga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacy tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgcy agtagccgtt 2280
ctggatggcy aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcy cgcgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgac gtctggcgct gcgcctctaa 2400

```

<210> 6

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 6

```

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1          5          10          15

Asn Ala Thr Ser Arg Val Val Pro Met Gln Arg Gln Ile Gln Gly Leu
          20          25          30

Lys Phe Leu Met Ser Ala Lys Arg Lys Thr Phe Gly Pro Arg Arg Pro
          35          40          45

Met Pro Glu Phe Val Glu Thr Pro Ile Pro Asp Val Asn Thr Leu Ala
          50          55          60

Leu Glu Asp Ile Asp Val Ser Asn Pro Phe Leu Tyr Arg Gln Gly Gln
65          70          75          80

Trp Arg Ala Tyr Phe Lys Arg Leu Arg Asp Glu Ala Pro Val His Tyr
          85          90          95

Gln Lys Asn Ser Pro Phe Gly Pro Phe Trp Ser Val Thr Arg Phe Glu

```

ES 2 803 560 T3

100					105					110					
Asp	Ile	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Ser	His	Asp	Leu	Phe	Ser	Ala	Glu	Pro
		115					120					125			
Gln	Ile	Ile	Leu	Gly	Asp	Pro	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Val	Glu	Met	Phe
		130					135					140			
Ile	Ala	Met	Asp	Pro	Pro	Lys	His	Asp	Val	Gln	Arg	Ser	Ser	Val	Gln
145							150					155			160
Gly	Val	Val	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Met	Glu	Gly	Leu	Ile	Arg
				165					170					175	
Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Thr	Asp	Lys	Pro	Phe
			180					185					190		
Asn	Trp	Val	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Met	Leu	Ala
		195					200					205			
Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Glu	Glu	Arg	His	Lys	Leu	Val	Glu	Trp
		210					215					220			
Ser	Asp	Arg	Met	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe	Ala
225							230					235			240
Asp	Glu	Asn	Ala	Met	Phe	Asp	Asp	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Arg	Ser	Phe
			245						250					255	
Ser	Arg	Leu	Trp	Arg	Asp	Lys	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Gly	Glu	Glu
		260						265					270		
Pro	Gly	Phe	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu	Gln	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys
		275					280					285			
Asp	Leu	Ile	Asn	Arg	Pro	Met	Glu	Phe	Ile	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu
		290					295					300			
Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Gly	Leu
305							310					315			320
Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Lys
				325					330					335	
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr
			340						345					350	

ES 2 803 560 T3

Pro Leu Ala Tyr Met Arg Arg Ile Ala Lys Gln Asp Val Glu Leu Gly
 355 360 365
 Gly Gln Thr Ile Lys Lys Gly Asp Arg Val Val Met Trp Tyr Ala Ser
 370 375 380
 Gly Asn Arg Asp Glu Arg Lys Phe Asp Asn Pro Asp Gln Phe Ile Ile
 385 390 395 400
 Asp Arg Lys Asp Ala Arg Asn His Met Ser Phe Gly Tyr Gly Val His
 405 410 415
 Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp
 420 425 430
 Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro
 435 440 445
 Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
 450 455 460
 Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495
 Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525
 Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540
 Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575
 Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590
 Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605

ES 2 803 560 T3

Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
610 615 620

Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
625 630 635 640

Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
645 650 655

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
660 665 670

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
675 680 685

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 7

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 7

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc 60

agggtggtgc cgatgcagct gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg 120

ES 2 803 560 T3

aagaccttcg gccacgccg accgatgcc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag	240
tggcgcgcct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgaacctgt ttcccgccga gccgcaaadc attctcggtg accctccgga ggggctgtcg	420
gtggaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc	540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag	600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag	660
ctggttgagt ggtcgacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtgtgcc	720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg	780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg	840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat	900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tggtagcctg	960
gtggccatga acgaattccc caggaattt gaaaaattga aggcaaac ggagttgatt	1020
ccgaacatgg tgtcggaat catccgctgg caaacgccg tggcctatat gcgcgaatc	1080
gccaaacagc atgtcgaact gggcgccag accatcaaga agggtagatc agttgtcatg	1140
tggtagcgt cggttaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt	1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcaccg ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcata ctctgggaag aaataactca gcgttttgac	1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgag gggctattcc	1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcacaaacc tgtcaccatc	1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcat	1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaacct cccgacgtgg	1560
acgcctggcg ctcacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc	1620
ggcgtccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgact tagatccgga aagccgtggt	1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca	1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgag gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc	1800
ggcatcacgc cggtgctggc aatggcgat catgccctg cgctgggtg gtcgtacgaa	1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggc atggcttacc tggaacgcgt cgcgggacat	1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggacccc gcattgatct ggcggcatta	1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaadc tacgcctcgc gtccgggccc tttattagcg	2040

ES 2 803 560 T3

```

ggctcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgcg ttcattgtgga gcatttcact 2100
tcgagtttag ccgcttttga tccggatgtc gaacatgcct ttgatttga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgccgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggcgct gcgcctctaa 2400

```

<210> 8

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 8

```

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1          5          10          15

Asn Ala Thr Ser Arg Val Val Pro Met Gln Leu Gln Ile Gln Gly Leu
20          25          30

Lys Phe Leu Met Ser Ala Lys Arg Lys Thr Phe Gly Pro Arg Arg Pro
35          40          45

Met Pro Glu Phe Val Glu Thr Pro Ile Pro Asp Val Asn Thr Leu Ala
50          55          60

Leu Glu Asp Ile Asp Val Ser Asn Pro Phe Leu Tyr Arg Gln Gly Gln
65          70          75          80

Trp Arg Ala Tyr Phe Lys Arg Leu Arg Asp Glu Ala Pro Val His Tyr
85          90          95

Gln Lys Asn Ser Pro Phe Gly Pro Phe Trp Ser Val Thr Arg Phe Glu
100         105         110

Asp Ile Leu Phe Val Asp Lys Ser His Asp Leu Phe Ser Ala Glu Pro
115         120         125

Gln Ile Ile Leu Gly Asp Pro Pro Glu Gly Leu Ser Val Glu Met Phe
130         135         140

Ile Ala Met Asp Pro Pro Lys His Asp Val Gln Arg Ser Ser Val Gln
145         150         155         160

```

ES 2 803 560 T3

Gly Val Val Ala Pro Lys Asn Leu Lys Glu Met Glu Gly Leu Ile Arg
 165 170 175

Ser Arg Thr Gly Asp Val Leu Asp Ser Leu Pro Thr Asp Lys Pro Phe
 180 185 190

Asn Trp Val Pro Ala Val Ser Lys Glu Leu Thr Gly Arg Met Leu Ala
 195 200 205

Thr Leu Leu Asp Phe Pro Tyr Glu Glu Arg His Lys Leu Val Glu Trp
 210 215 220

Ser Asp Arg Met Ala Gly Ala Ala Ser Ala Thr Gly Gly Glu Phe Ala
 225 230 235 240

Asp Glu Asn Ala Met Phe Asp Asp Ala Ala Asp Met Ala Arg Ser Phe
 245 250 255

Ser Arg Leu Trp Arg Asp Lys Glu Ala Arg Arg Ala Ala Gly Glu Glu
 260 265 270

Pro Gly Phe Asp Leu Ile Ser Leu Leu Gln Ser Asn Lys Glu Thr Lys
 275 280 285

Asp Leu Ile Asn Arg Pro Met Glu Phe Ile Gly Asn Leu Thr Leu Leu
 290 295 300

Ile Val Ala Gly Asn Asp Thr Thr Arg Asn Ser Met Ser Gly Gly Leu
 305 310 315 320

Val Ala Met Asn Glu Phe Pro Arg Glu Phe Glu Lys Leu Lys Ala Lys
 325 330 335

Pro Glu Leu Ile Pro Asn Met Val Ser Glu Ile Ile Arg Trp Gln Thr
 340 345 350

Pro Leu Ala Tyr Met Arg Arg Ile Ala Lys Gln Asp Val Glu Leu Gly
 355 360 365

Gly Gln Thr Ile Lys Lys Gly Asp Arg Val Val Met Trp Tyr Ala Ser
 370 375 380

Gly Asn Arg Asp Glu Arg Lys Phe Asp Asn Pro Asp Gln Phe Ile Ile
 385 390 395 400

Asp Arg Lys Asp Ala Arg Asn His Met Ser Phe Gly Tyr Gly Val His
 405 410 415

ES 2 803 560 T3

Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp
 420 425 430
 Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro
 435 440 445
 Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
 450 455 460
 Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495
 Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525
 Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540
 Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575
 Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590
 Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605
 Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
 610 615 620
 Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
 625 630 635 640
 Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
 645 650 655
 Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala

ES 2 803 560 T3

660	665	670
Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn 675 680 685		
Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala 690 695 700		
Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp 705 710 715 720		
Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala 725 730 735		
Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu 740 745 750		
Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg 755 760 765		
Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met 770 775 780		
Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu 785 790 795		

<210> 9

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 9

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gccacgccc accgatgccc gaattcggtt aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag	240
tgggacgcct atttcaaacg gttgcgtgat gagggcgccg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgacctgt tttccgcca gccgcaaatt attctcggtg accctccgga ggggctgtcg	420
gtggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgcag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc	540

ES 2 803 560 T3

gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag	600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag	660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc	720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg	780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg	840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat	900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tggtagcctg	960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt	1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc	1080
gccaaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga agggtagatc agttgtcatg	1140
tggtagcgtt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt	1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttccggctatg gggttcaccg ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcctc ctctgggaag aaataactcaa gcgttttgac	1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc	1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcacaaacc tgtcaccatc	1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcatc	1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg	1560
acgcctggcg ctcacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc	1620
ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgact tagatccgga aagccgtggt	1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca	1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc	1800
ggcatcacgc cggtagctggc aatggcggat catgccgtg cgcgtggttg gtcgtacgaa	1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcttacc tggaaacggt cgcgggacat	1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcaccg gcattgatct ggcggcatta	1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaatc tacgcctgcg gtccgggccc tttattagcg	2040
ggtcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcattgtgga gcatttcact	2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgtc gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac	2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac	2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt	2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgcgcgaat	2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggcgct gcgcctctaa	2400

<210> 10
<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 10

ES 2 803 560 T3

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

ES 2 803 560 T3

210	215	220
Ser Asp Arg Met Ala Gly 225	Ala Ala Ser Ala Thr 230	Gly Gly Glu Phe Ala 235
Asp Glu Asn Ala Met Phe 245	Asp Asp Ala Ala Asp Met 250	Ala Arg Ser Phe 255
Ser Arg Leu Trp Arg Asp 260	Lys Glu Ala Arg Arg 265	Ala Ala Gly Glu Glu 270
Pro Gly Phe Asp Leu Ile 275	Ser Leu Leu Gln Ser Asn 280	Lys Glu Thr Lys 285
Asp Leu Ile Asn Arg Pro 290	Met Glu Phe Ile Gly Asn 295	Leu Thr Leu Leu 300
Ile Val Ala Gly Asn Asp 305	Thr Thr Arg Asn Ser Met 310	Ser Gly Gly Leu 315
Val Ala Met Asn Glu Phe 325	Pro Arg Glu Phe Glu Lys 330	Leu Lys Ala Lys 335
Pro Glu Leu Ile Pro Asn 340	Met Val Ser Glu Ile Ile 345	Arg Trp Gln Thr 350
Pro Leu Ala Tyr Met Arg 355	Arg Ile Ala Lys Gln Asp 360	Val Glu Leu Gly 365
Gly Gln Thr Ile Lys Lys 370	Gly Asp Arg Val Val Met 375	Trp Tyr Ala Ser 380
Gly Asn Arg Asp Glu Arg 385	Lys Phe Asp Asn Pro Asp 390	Gln Phe Ile Ile 395
Asp Arg Lys Asp Ala Arg 405	Asn His Met Ser Phe Gly 410	Tyr Gly Val His 415
Arg Cys Met Gly Asn Arg 420	Leu Ala Glu Leu Gln Leu 425	Arg Ile Leu Trp 430
Glu Glu Ile Leu Lys Arg 435	Phe Asp Asn Ile Glu Val 440	Val Glu Glu Pro 445
Glu Arg Val Gln Ser Asn 450	Phe Val Arg Gly Tyr Ser 455	Arg Leu Met Val 460

ES 2 803 560 T3

Lys 465	Leu	Thr	Pro	Asn 470	Ser	Val	Leu	His	Arg	His 475	Gln	Pro	Val	Thr	Ile 480
Gly	Glu	Pro	Ala	Ala 485	Arg	Ala	Val	Ser	Arg 490	Thr	Val	Thr	Val	Glu 495	Arg
Leu	Asp	Arg	Ile 500	Ala	Asp	Asp	Val	Leu 505	Arg	Leu	Val	Leu	Arg 510	Asp	Ala
Gly	Gly	Lys 515	Thr	Leu	Pro	Thr	Trp 520	Thr	Pro	Gly	Ala	His 525	Ile	Asp	Leu
Asp 530	Leu	Gly	Ala	Leu	Ser	Arg 535	Gln	Tyr	Ser	Leu	Cys 540	Gly	Ala	Pro	Asp
Ala 545	Pro	Ser	Tyr	Glu	Ile 550	Ala	Val	His	Leu	Asp 555	Pro	Glu	Ser	Arg	Gly 560
Gly	Ser	Arg	Tyr	Ile 565	His	Glu	Gln	Leu	Glu 570	Val	Gly	Ser	Pro	Leu 575	Arg
Met	Arg	Gly	Pro 580	Arg	Asn	His	Phe	Ala 585	Leu	Asp	Pro	Gly	Ala 590	Glu	His
Tyr	Val	Phe 595	Val	Ala	Gly	Gly	Ile 600	Gly	Ile	Thr	Pro	Val 605	Leu	Ala	Met
Ala 610	Asp	His	Ala	Arg	Ala	Arg 615	Gly	Trp	Ser	Tyr	Glu 620	Leu	His	Tyr	Cys
Gly 625	Arg	Asn	Arg	Ser	Gly	Met 630	Ala	Tyr	Leu	Glu 635	Arg	Val	Ala	Gly	His 640
Gly	Asp	Arg	Ala	Ala 645	Leu	His	Val	Ser	Glu 650	Glu	Gly	Thr	Arg	Ile 655	Asp
Leu	Ala	Ala	Leu 660	Leu	Ala	Glu	Pro	Ala 665	Pro	Gly	Val	Gln	Ile 670	Tyr	Ala
Cys	Gly	Pro 675	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala 680	Gly	Leu	Glu	Asp 685	Ala	Ser	Arg	Asn
Trp 690	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	His 695	Val	Glu	His	Phe	Thr 700	Ser	Ser	Leu	Ala
Ala 705	Leu	Asp	Pro	Asp	Val 710	Glu	His	Ala	Phe	Asp 715	Leu	Glu	Leu	Arg	Asp 720

ES 2 803 560 T3

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 11

5 <211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 11

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gccacgccc accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag	240
tggcgcgcct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgacctgt tttccgcga gccgcaaata attctcgggtg accctccgga ggggctgtcg	420
atcgaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc	540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag	600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag	660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc	720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg	780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg	840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat	900
ttgacgctgc tcatagtgc cggcaacgat acgacgcga actcgatgag tgggtggcctg	960

ES 2 803 560 T3

```

gtggccatga acgaattccc caggggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt 1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc 1080
gccaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga agggatgatcg agttgtcatg 1140
tggtacgcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt 1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttccggtatg gggttcaccg ttgcatgggc 1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcata ctctgggaag aaataactca gcgttttgac 1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc 1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcacaaacc tgtcaccatc 1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcatc 1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg 1560
acgcctggcg ctacacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc 1620
ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgact tagatccgga aagccgtggt 1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca 1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc 1800
ggcatcacgc cgggtcgtggc aatggcggat catgcccggt cgcggtggtg gtcgtacgaa 1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcttacc tggaacgcgt cgccggacat 1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcacc gcattgatct ggcggcatta 1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaata tacgcctgcg gtccggggcg tttattagcg 2040
ggtcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcattgtga gcatttcact 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgtc gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgctg cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggcgagcg cgccgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggcgct gcgcctctaa 2400

```

<210> 12
 <211> 799
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 12

Met	Pro	Thr	Leu	Pro	Arg	Thr	Phe	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	Arg	Leu	Ile
1				5				10						15	

ES 2 803 560 T3

Asn	Ala	Thr	Ser	Arg	Val	Val	Pro	Met	Gln	Arg	Gln	Ile	Gln	Gly	Leu	20	25	30
Lys	Phe	Leu	Met	Ser	Ala	Lys	Arg	Lys	Thr	Phe	Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	35	40	45
Met	Pro	Glu	Phe	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Leu	Ala	50	55	60
Leu	Glu	Asp	Ile	Asp	Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Gln	65	70	75
Trp	Arg	Ala	Tyr	Phe	Lys	Arg	Leu	Arg	Asp	Glu	Ala	Pro	Val	His	Tyr	85	90	95
Gln	Lys	Asn	Ser	Pro	Phe	Gly	Pro	Phe	Trp	Ser	Val	Thr	Arg	Phe	Glu	100	105	110
Asp	Ile	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Ser	His	Asp	Leu	Phe	Ser	Ala	Glu	Pro	115	120	125
Gln	Ile	Ile	Leu	Gly	Asp	Pro	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Ile	Glu	Met	Phe	130	135	140
Ile	Ala	Met	Asp	Pro	Pro	Lys	His	Asp	Val	Gln	Arg	Ser	Ser	Val	Gln	145	150	155
Gly	Val	Val	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Met	Glu	Gly	Leu	Ile	Arg	165	170	175
Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Thr	Asp	Lys	Pro	Phe	180	185	190
Asn	Trp	Val	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Met	Leu	Ala	195	200	205
Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Glu	Glu	Arg	His	Lys	Leu	Val	Glu	Trp	210	215	220
Ser	Asp	Arg	Met	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe	Ala	225	230	235
Asp	Glu	Asn	Ala	Met	Phe	Asp	Asp	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Arg	Ser	Phe	245	250	255
Ser	Arg	Leu	Trp	Arg	Asp	Lys	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Gly	Glu	Glu	260	265	270

ES 2 803 560 T3

Pro	Gly	Phe	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu	Gln	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys	275	280	285
Asp	Leu	Ile	Asn	Arg	Pro	Met	Glu	Phe	Ile	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu	290	295	300
Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Gly	Leu	305	310	315
Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Lys	325	330	335
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr	340	345	350
Pro	Leu	Ala	Tyr	Met	Arg	Arg	Ile	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Gly	355	360	365
Gly	Gln	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Ala	Ser	370	375	380
Gly	Asn	Arg	Asp	Glu	Arg	Lys	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Gln	Phe	Ile	Ile	385	390	395
Asp	Arg	Lys	Asp	Ala	Arg	Asn	His	Met	Ser	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	His	405	410	415
Arg	Cys	Met	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Trp	420	425	430
Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg	Phe	Asp	Asn	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Glu	Pro	435	440	445
Glu	Arg	Val	Gln	Ser	Asn	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr	Ser	Arg	Leu	Met	Val	450	455	460
Lys	Leu	Thr	Pro	Asn	Ser	Val	Leu	His	Arg	His	Gln	Pro	Val	Thr	Ile	465	470	475
Gly	Glu	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Arg	485	490	495
Leu	Asp	Arg	Ile	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Leu	Arg	Asp	Ala	500	505	510
Gly	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Thr	Trp	Thr	Pro	Gly	Ala	His	Ile	Asp	Leu	515	520	525

ES 2 803 560 T3

Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540

Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560

Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575

Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590

Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605

Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
 610 615 620

Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
 625 630 635 640

Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
 645 650 655

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
 660 665 670

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
 675 680 685

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
 690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
 705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
 725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
 740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
 755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met

ES 2 803 560 T3

770

775

780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 13
<211> 2400
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 13

```

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtcct gactgattaa cgccacctcc      60
agggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg      120
aagaccttcg gccacgcccg accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacggt      180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcaggggtcag      240
tggtcgccct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc      300
cctttcggcc ccttctgggt ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt      360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaata attctcgggt accctccgga ggggctgtcg      420
caggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgcag ctcggtgcag      480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgata acgcaccggc      540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtacctgc tgtttccaag      600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag      660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc      720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg      780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg      840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat      900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tgggtggcctg      960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt     1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc     1080
gccaaagcag atgtcgaact gggcgccagc accatcaaga aggggtgatc agttgtcatg     1140
tggtacgcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt     1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttccgctatg gggttcaccg ttgcatgggc     1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcata ctctgggaag aaataactca gcgttttgac     1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc     1380

```

ES 2 803 560 T3

```

aggttgatgg tcaaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcacccaacc tgccaccatc 1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcatt 1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg 1560
acgcctggcg ctcacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc 1620
ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgacct tagatccgga aagccgtggt 1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca 1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc 1800
ggcatcacgc cgggtgctggc aatggcggtat catgcccgtg cgcgtggttg gtcgtacgaa 1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcttacc tggaacgcgt cgcgggacat 1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcaccg gcattgatct ggcggcatta 1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaata tacgcctgcg gtccggggccg tttattagcg 2040
ggtcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcattgtga gcatttcact 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgtc gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgccgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggcgct gcgcctctaa 2400

```

<210> 14

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 14

ES 2 803 560 T3

Met	Pro	Thr	Leu	Pro	Arg	Thr	Phe	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	Arg	Leu	Ile
1				5					10					15	
Asn	Ala	Thr	Ser	Arg	Val	Val	Pro	Met	Gln	Arg	Gln	Ile	Gln	Gly	Leu
			20					25					30		
Lys	Phe	Leu	Met	Ser	Ala	Lys	Arg	Lys	Thr	Phe	Gly	Pro	Arg	Arg	Pro
		35					40					45			
Met	Pro	Glu	Phe	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Leu	Ala
	50					55					60				
Leu	Glu	Asp	Ile	Asp	Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Gln
65					70					75					80

ES 2 803 560 T3

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

ES 2 803 560 T3

				325						330					335				
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr				
			340					345					350						
Pro	Leu	Ala	Tyr	Met	Arg	Arg	Ile	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Gly				
		355					360					365							
Gly	Gln	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Ala	Ser				
		370				375					380								
Gly	Asn	Arg	Asp	Glu	Arg	Lys	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Gln	Phe	Ile	Ile				
	385					390				395					400				
Asp	Arg	Lys	Asp	Ala	Arg	Asn	His	Met	Ser	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	His				
				405					410					415					
Arg	Cys	Met	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Trp				
			420					425					430						
Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg	Phe	Asp	Asn	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Glu	Pro				
		435					440					445							
Glu	Arg	Val	Gln	Ser	Asn	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr	Ser	Arg	Leu	Met	Val				
	450					455					460								
Lys	Leu	Thr	Pro	Asn	Ser	Val	Leu	His	Arg	His	Gln	Pro	Val	Thr	Ile				
	465				470					475					480				
Gly	Glu	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Arg				
			485					490						495					
Leu	Asp	Arg	Ile	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Leu	Arg	Asp	Ala				
			500					505					510						
Gly	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Thr	Trp	Thr	Pro	Gly	Ala	His	Ile	Asp	Leu				
		515					520					525							
Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Ser	Arg	Gln	Tyr	Ser	Leu	Cys	Gly	Ala	Pro	Asp				
	530					535					540								
Ala	Pro	Ser	Tyr	Glu	Ile	Ala	Val	His	Leu	Asp	Pro	Glu	Ser	Arg	Gly				
	545				550					555					560				
Gly	Ser	Arg	Tyr	Ile	His	Glu	Gln	Leu	Glu	Val	Gly	Ser	Pro	Leu	Arg				
				565					570					575					

ES 2 803 560 T3

Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
580 585 590

Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
595 600 605

Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
610 615 620

Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
625 630 635 640

Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
645 650 655

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
660 665 670

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
675 680 685

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 15
<211> 2400
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 803 560 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 15

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagttccc gactgattaa cgccacctcc	60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gcccacgccg accgatgccc gaattcggtt aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataaccg gcaggggtcag	240
tggcgcgccct atttcaaacg gttgctgtat gaggcgcggg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaattc attctcggtg accctccgga ggggctgtcg	420
ggggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggagggggc tgatccgatc acgcaccggc	540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag	600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag	660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtgtgcc	720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg	780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccc gtttcgattt gatcagcctg	840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat	900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tgggtggcctg	960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagtgtgatt	1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc	1080
gccaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga agggtagatc agttgtcatg	1140
tggtagcgt cggttaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt	1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcaccg ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcac cttcgggaag aaataactca gcgttttgac	1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc	1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcaccaacc tgtcaccatc	1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcat	1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg	1560
acgcctggcg ctcacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc	1620
ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgcaat tagatccgga aagccgtgg	1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca	1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc	1800

ggcatcacgc cgggtgctggc aatggcggat catgccctg cgcgtggttg gtcgtacgaa 1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcttacc tggaacgcgt cgcgggacat 1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcaccg gcattgatct ggcggcatta 1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaatac tacgcctgcg gtccggggccg tttattagcg 2040
ggtcttgaaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcattgtgga gcatttact 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgac gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgcgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggcgct gcgcctctaa 2400

<210> 16

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 16

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1 5 10 15

Asn Ala Thr Ser Arg Val Val Pro Met Gln Arg Gln Ile Gln Gly Leu
20 25 30

Lys Phe Leu Met Ser Ala Lys Arg Lys Thr Phe Gly Pro Arg Arg Pro
35 40 45

Met Pro Glu Phe Val Glu Thr Pro Ile Pro Asp Val Asn Thr Leu Ala
50 55 60

Leu Glu Asp Ile Asp Val Ser Asn Pro Phe Leu Tyr Arg Gln Gly Gln
65 70 75 80

Trp Arg Ala Tyr Phe Lys Arg Leu Arg Asp Glu Ala Pro Val His Tyr
85 90 95

Gln Lys Asn Ser Pro Phe Gly Pro Phe Trp Ser Val Thr Arg Phe Glu
100 105 110

Asp Ile Leu Phe Val Asp Lys Ser His Asp Leu Phe Ser Ala Glu Pro
115 120 125

ES 2 803 560 T3

Gln Ile Ile Leu Gly Asp Pro Pro Glu Gly Leu Ser Gly Glu Met Phe
 130 135 140

Ile Ala Met Asp Pro Pro Lys His Asp Val Gln Arg Ser Ser Val Gln
 145 150 155 160

Gly Val Val Ala Pro Lys Asn Leu Lys Glu Met Glu Gly Leu Ile Arg
 165 170 175

Ser Arg Thr Gly Asp Val Leu Asp Ser Leu Pro Thr Asp Lys Pro Phe
 180 185 190

Asn Trp Val Pro Ala Val Ser Lys Glu Leu Thr Gly Arg Met Leu Ala
 195 200 205

Thr Leu Leu Asp Phe Pro Tyr Glu Glu Arg His Lys Leu Val Glu Trp
 210 215 220

Ser Asp Arg Met Ala Gly Ala Ala Ser Ala Thr Gly Gly Glu Phe Ala
 225 230 235 240

Asp Glu Asn Ala Met Phe Asp Asp Ala Ala Asp Met Ala Arg Ser Phe
 245 250 255

Ser Arg Leu Trp Arg Asp Lys Glu Ala Arg Arg Ala Ala Gly Glu Glu
 260 265 270

Pro Gly Phe Asp Leu Ile Ser Leu Leu Gln Ser Asn Lys Glu Thr Lys
 275 280 285

Asp Leu Ile Asn Arg Pro Met Glu Phe Ile Gly Asn Leu Thr Leu Leu
 290 295 300

Ile Val Ala Gly Asn Asp Thr Thr Arg Asn Ser Met Ser Gly Gly Leu
 305 310 315 320

Val Ala Met Asn Glu Phe Pro Arg Glu Phe Glu Lys Leu Lys Ala Lys
 325 330 335

Pro Glu Leu Ile Pro Asn Met Val Ser Glu Ile Ile Arg Trp Gln Thr
 340 345 350

Pro Leu Ala Tyr Met Arg Arg Ile Ala Lys Gln Asp Val Glu Leu Gly
 355 360 365

Gly Gln Thr Ile Lys Lys Gly Asp Arg Val Val Met Trp Tyr Ala Ser
 370 375 380

ES 2 803 560 T3

Gly Asn Arg Asp Glu Arg Lys Phe Asp Asn Pro Asp Gln Phe Ile Ile
 385 390 395 400
 Asp Arg Lys Asp Ala Arg Asn His Met Ser Phe Gly Tyr Gly Val His
 405 410 415
 Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp
 420 425 430
 Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro
 435 440 445
 Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
 450 455 460
 Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495
 Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525
 Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540
 Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575
 Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590
 Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605
 Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
 610 615 620
 Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
 625 630 635 640

ES 2 803 560 T3

Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
645 650 655

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
660 665 670

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
675 680 685

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 17

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 17

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gcccacgccg accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataaccg gcagggtcag	240
tggcgcgccct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360

ES 2 803 560 T3

cacgacctgt	tttccgccga	gccgcaaata	attctcgggtg	accctccgga	ggggctgtcg	420
atggaaatgt	tcatagcgat	ggatccgccg	aaacacgatg	tgacgcgcag	ctcgggtgcag	480
ggagtagtgg	caccgaaaaa	cctgaaggag	atggaggggc	tgatccgatc	acgcaccggc	540
gatgtgcttg	acagcctgcc	tacagacaaa	ccctttaact	gggtacctgc	tgtttccaag	600
gaactcacag	gccgcatgct	ggcgacgctt	ctggattttc	cttacgagga	acgccacaag	660
ctgggtgagt	ggtcggacag	aatggcaggt	gcagcatcgg	ccaccggcgg	ggagtttgcc	720
gatgaaaatg	ccatgtttga	cgacgcggca	gacatggccc	ggcttttctc	caggctttgg	780
cgggacaagg	aggcgcgccg	cgcagcaggc	gaggagcccg	gtttcgattt	gatcagcctg	840
ttgcagagca	aaaagaaac	gaaagacctg	atcaatcggc	cgatggagtt	tatcggtaat	900
ttgacgctgc	tcatagtgcg	cggcaacgat	acgacgcgca	actcgatgag	tggtggcctg	960
gtggccatga	acgaattccc	cagggaattt	gaaaaattga	aggcaaaacc	ggagttgatt	1020
ccgaacatgg	tgctggaaat	catccgctgg	caaacgccgc	tggcctatat	gcgccgaatc	1080
gccaaagcag	atgtcgaact	ggcgggccag	accatcaaga	agggtgatcg	agttgtcatg	1140
tggtacgcgt	cgggtaaccg	ggacgagcgc	aaatttgaca	accccgatca	gttcattcatt	1200
gatcgcaagg	acgcacgaaa	ccacatgtcg	ttcggctatg	gggttcaccg	ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg	ctgaactgca	actgcgcctc	ctctgggaag	aaataactca	gcgttttgac	1320
aacatcgaag	tcgtcgaaga	gcccgcgcgg	gtgcagtcca	acttcgtgcg	gggctattcc	1380
aggttgatgg	tcaaactgac	accgaacagt	gtactccatc	gtcatcaacc	tgtcaccatc	1440
ggcgagccgg	ccgctcgtgc	tgtgagccgc	acggtgaccg	ttgagcgtct	tgatcgcatc	1500
gccgacgatg	tccttcgcct	ggtccttcgc	gatgctggag	gtaaaaccct	cccgcgtggg	1560
acgcctggcg	ctcacatcga	cctggatctg	ggtgctctga	gccgtcagta	ttcgcctcgc	1620
ggcgtcccg	atgctccgtc	gtacgaaatc	gccgtgcact	tagatccgga	aagccgtggg	1680
ggaagccgct	atattcatga	acagctggaa	gttggaagtc	cgctgcgtat	gcgtggccca	1740
cgcaaccatt	tcgccctgga	tcggggtgcg	gaacattacg	tgtttggtgc	cgggggtatc	1800
ggcatcacgc	cgggtgctggc	aatggcggat	catgcccggt	cgctgggttg	gtcgtacgaa	1860
ctgcattatt	gtggctgtaa	tcgtagcggt	atggcttacc	tggaacgcgt	cgcgggacat	1920
ggtgaccgcg	ctgccttgca	cgtatctgaa	gaaggcacc	gcattgatct	ggcggcatta	1980
cttgctgaac	cggcgccggg	cgtgcaaata	tacgcctgcg	gtccgggccc	tttattagcg	2040
ggtcttgaag	acgcgtctcg	taattggccg	gatggcgcgc	ttcatgtgga	gcatttcact	2100
tcgagtttag	cgcctttgga	tccggatgtc	gaacatgcct	ttgatttgga	gctgcgtgac	2160
tctggcctta	ccgttcgcgt	cgagccaact	cagaccgttt	tagacgcttt	gcgtgcgaac	2220

ES 2 803 560 T3

aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt	2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggcgagcg cgccgcgaat	2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggcgct gcgcctctaa	2400

<210> 18

<211> 799

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 18

ES 2 803 560 T3

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

ES 2 803 560 T3

Asn	Trp	Val	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Met	Leu	Ala	195	200	205	
Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Glu	Glu	Arg	His	Lys	Leu	Val	Glu	Trp	210	215	220	
Ser	Asp	Arg	Met	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe	Ala	225	230	235	240
Asp	Glu	Asn	Ala	Met	Phe	Asp	Asp	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Arg	Ser	Phe	245	250	255	
Ser	Arg	Leu	Trp	Arg	Asp	Lys	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Gly	Glu	Glu	260	265	270	
Pro	Gly	Phe	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu	Gln	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys	275	280	285	
Asp	Leu	Ile	Asn	Arg	Pro	Met	Glu	Phe	Ile	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu	290	295	300	
Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Gly	Leu	305	310	315	320
Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Lys	325	330	335	
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr	340	345	350	
Pro	Leu	Ala	Tyr	Met	Arg	Arg	Ile	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Gly	355	360	365	
Gly	Gln	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Ala	Ser	370	375	380	
Gly	Asn	Arg	Asp	Glu	Arg	Lys	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Gln	Phe	Ile	Ile	385	390	395	400
Asp	Arg	Lys	Asp	Ala	Arg	Asn	His	Met	Ser	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	His	405	410	415	
Arg	Cys	Met	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Trp	420	425	430	
Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg	Phe	Asp	Asn	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Glu	Pro				

ES 2 803 560 T3

435	440	445
Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val 450 455 460		
Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile 465 470 475 480		
Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg 485 490 495		
Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala 500 505 510		
Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu 515 520 525		
Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp 530 535 540		
Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly 545 550 555 560		
Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg 565 570 575		
Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His 580 585 590		
Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met 595 600 605		
Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys 610 615 620		
Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His 625 630 635 640		
Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp 645 650 655		
Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala 660 665 670		
Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn 675 680 685		

ES 2 803 560 T3

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 19

<211> 2400

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 19

ES 2 803 560 T3

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gcccacgccg accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag	240
tggcgcgcct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaate attctcgggtg accctccgga ggggctgtcg	420
ctggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc	540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag	600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag	660
ctgggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc	720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg	780

ES 2 803 560 T3

cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccc gtttcgattt gatcagcctg	840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat	900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tgggtggcctg	960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt	1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc	1080
gccaaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga agggatgatc agttgtcatg	1140
tggtagcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt	1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttccggctatg ggggttcaccg ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcctc ctctgggaag aaataactca gcgttttgac	1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc	1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcacaaacc tgtcaccatc	1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtagaccg ttgagcgtct tgatcgcatt	1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg	1560
acgcctggcg ctcacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttccgtctgc	1620
ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgcact tagatccgga aagccgtggt	1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca	1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc	1800
ggcatcacgc cgggtgctggc aatggcggat catgcccggt cgcggtggtg gtcgtacgaa	1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcttacc tggaacgcgt cgcgggacat	1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcacc gcattgatct ggcggcatta	1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaatc tacgcctgcg gtccgggccg tttattagcg	2040
ggtcttgaa acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcattgtga gcatttcact	2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgtc gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac	2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac	2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt	2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgccgcgaat	2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggcgct gcgcctctaa	2400

<210> 20

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 803 560 T3

<400> 20

```

Met  Pro  Thr  Leu  Pro  Arg  Thr  Phe  Asp  Asp  Ile  Gln  Ser  Arg  Leu  Ile
1      5      10      15

Asn  Ala  Thr  Ser  Arg  Val  Val  Pro  Met  Gln  Arg  Gln  Ile  Gln  Gly  Leu
20      25      30

Lys  Phe  Leu  Met  Ser  Ala  Lys  Arg  Lys  Thr  Phe  Gly  Pro  Arg  Arg  Pro
35      40      45

Met  Pro  Glu  Phe  Val  Glu  Thr  Pro  Ile  Pro  Asp  Val  Asn  Thr  Leu  Ala
50      55      60

Leu  Glu  Asp  Ile  Asp  Val  Ser  Asn  Pro  Phe  Leu  Tyr  Arg  Gln  Gly  Gln
65      70      75      80

Trp  Arg  Ala  Tyr  Phe  Lys  Arg  Leu  Arg  Asp  Glu  Ala  Pro  Val  His  Tyr
85      90      95

Gln  Lys  Asn  Ser  Pro  Phe  Gly  Pro  Phe  Trp  Ser  Val  Thr  Arg  Phe  Glu
100     105     110

Asp  Ile  Leu  Phe  Val  Asp  Lys  Ser  His  Asp  Leu  Phe  Ser  Ala  Glu  Pro
115     120     125

Gln  Ile  Ile  Leu  Gly  Asp  Pro  Pro  Glu  Gly  Leu  Ser  Leu  Glu  Met  Phe
130     135     140

Ile  Ala  Met  Asp  Pro  Pro  Lys  His  Asp  Val  Gln  Arg  Ser  Ser  Val  Gln
145     150     155     160

Gly  Val  Val  Ala  Pro  Lys  Asn  Leu  Lys  Glu  Met  Glu  Gly  Leu  Ile  Arg
165     170     175

Ser  Arg  Thr  Gly  Asp  Val  Leu  Asp  Ser  Leu  Pro  Thr  Asp  Lys  Pro  Phe
180     185     190

Asn  Trp  Val  Pro  Ala  Val  Ser  Lys  Glu  Leu  Thr  Gly  Arg  Met  Leu  Ala
195     200     205

Thr  Leu  Leu  Asp  Phe  Pro  Tyr  Glu  Glu  Arg  His  Lys  Leu  Val  Glu  Trp
210     215     220

Ser  Asp  Arg  Met  Ala  Gly  Ala  Ala  Ser  Ala  Thr  Gly  Gly  Glu  Phe  Ala
225     230     235     240

```

ES 2 803 560 T3

Asp Glu Asn Ala Met Phe Asp Asp Ala Ala Asp Met Ala Arg Ser Phe
 245 250 255
 Ser Arg Leu Trp Arg Asp Lys Glu Ala Arg Arg Ala Ala Gly Glu Glu
 260 265 270
 Pro Gly Phe Asp Leu Ile Ser Leu Leu Gln Ser Asn Lys Glu Thr Lys
 275 280 285
 Asp Leu Ile Asn Arg Pro Met Glu Phe Ile Gly Asn Leu Thr Leu Leu
 290 295 300
 Ile Val Ala Gly Asn Asp Thr Thr Arg Asn Ser Met Ser Gly Gly Leu
 305 310 315 320
 Val Ala Met Asn Glu Phe Pro Arg Glu Phe Glu Lys Leu Lys Ala Lys
 325 330 335
 Pro Glu Leu Ile Pro Asn Met Val Ser Glu Ile Ile Arg Trp Gln Thr
 340 345 350
 Pro Leu Ala Tyr Met Arg Arg Ile Ala Lys Gln Asp Val Glu Leu Gly
 355 360 365
 Gly Gln Thr Ile Lys Lys Gly Asp Arg Val Val Met Trp Tyr Ala Ser
 370 375 380
 Gly Asn Arg Asp Glu Arg Lys Phe Asp Asn Pro Asp Gln Phe Ile Ile
 385 390 395 400
 Asp Arg Lys Asp Ala Arg Asn His Met Ser Phe Gly Tyr Gly Val His
 405 410 415
 Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp
 420 425 430
 Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro
 435 440 445
 Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
 450 455 460
 Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495

ES 2 803 560 T3

Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510

Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525

Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540

Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560

Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575

Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590

Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605

Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
 610 615 620

Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
 625 630 635 640

Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
 645 650 655

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
 660 665 670

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
 675 680 685

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
 690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
 705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
 725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
 740 745 750

ES 2 803 560 T3

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 21

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 21

```

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc      60
agggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg      120
aagaccttcg gcccacgccg accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt      180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag      240
tggcgcgccct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgcggg tccattacca gaagaacagc      300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt      360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaadc attctcggtg accctccgga ggggctgtcg      420
acggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag      480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc      540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag      600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag      660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc      720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg      780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg      840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat      900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tggtagcctg      960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcacaaacc ggagttgatt     1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgcgcg tggcctatat gcgccgaatc     1080
gccaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga agggatgatc agttgtcatg     1140
tggtacgcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt     1200

```

ES 2 803 560 T3

gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcaccg ttgcatgggc 1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcata ctctgggaag aaataactcaa gcgttttgac 1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccagacgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc 1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccata gtcatacaacc tgtcaccata 1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcat 1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg 1560
acgcctggcg ctacacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc 1620
ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgcaact tagatccgga aagccgtgg 1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca 1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc 1800
ggcatcacgc cgggtcgtggc aatggcggat catgcccggt cgcggtggtg gtcgtacgaa 1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcttacc tggaacgcgt cgcgggacat 1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcaccg gcattgatct ggcggcatta 1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaata tacgcctgcg gtccgggccc tttattagcg 2040
ggtcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcattgtga gcatttcact 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgtc gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgcgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggcgct gcgcctctaa 2400

<210> 22

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 22

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1 5 10 15

Asn Ala Thr Ser Arg Val Val Pro Met Gln Arg Gln Ile Gln Gly Leu
20 25 30

Lys Phe Leu Met Ser Ala Lys Arg Lys Thr Phe Gly Pro Arg Arg Pro
35 40 45

ES 2 803 560 T3

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

ES 2 803 560 T3

Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Gly	Leu	305	310	315	320
Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Lys	325	330	335	
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr	340	345	350	
Pro	Leu	Ala	Tyr	Met	Arg	Arg	Ile	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Gly	355	360	365	
Gly	Gln	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Ala	Ser	370	375	380	
Gly	Asn	Arg	Asp	Glu	Arg	Lys	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Gln	Phe	Ile	Ile	385	390	395	400
Asp	Arg	Lys	Asp	Ala	Arg	Asn	His	Met	Ser	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	His	405	410	415	
Arg	Cys	Met	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Trp	420	425	430	
Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg	Phe	Asp	Asn	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Glu	Pro	435	440	445	
Glu	Arg	Val	Gln	Ser	Asn	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr	Ser	Arg	Leu	Met	Val	450	455	460	
Lys	Leu	Thr	Pro	Asn	Ser	Val	Leu	His	Arg	His	Gln	Pro	Val	Thr	Ile	465	470	475	480
Gly	Glu	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Arg	485	490	495	
Leu	Asp	Arg	Ile	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Leu	Arg	Asp	Ala	500	505	510	
Gly	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Thr	Trp	Thr	Pro	Gly	Ala	His	Ile	Asp	Leu	515	520	525	
Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Ser	Arg	Gln	Tyr	Ser	Leu	Cys	Gly	Ala	Pro	Asp	530	535	540	
Ala	Pro	Ser	Tyr	Glu	Ile	Ala	Val	His	Leu	Asp	Pro	Glu	Ser	Arg	Gly				

ES 2 803 560 T3

545		550		555		560										
Gly	Ser	Arg	Tyr	Ile	His	Arg	Glu	Gln	Leu	Glu	Val	Gly	Ser	Pro	Leu	Arg
				565						570					575	
Met	Arg	Gly	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Ala	Leu	Asp	Pro	Gly	Ala	Glu	His	
			580					585					590			
Tyr	Val	Phe	Val	Ala	Gly	Gly	Ile	Gly	Ile	Thr	Pro	Val	Leu	Ala	Met	
		595					600					605				
Ala	Asp	His	Ala	Arg	Ala	Arg	Gly	Trp	Ser	Tyr	Glu	Leu	His	Tyr	Cys	
	610					615					620					
Gly	Arg	Asn	Arg	Ser	Gly	Met	Ala	Tyr	Leu	Glu	Arg	Val	Ala	Gly	His	
625					630					635					640	
Gly	Asp	Arg	Ala	Ala	Leu	His	Val	Ser	Glu	Glu	Gly	Thr	Arg	Ile	Asp	
			645						650					655		
Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Glu	Pro	Ala	Pro	Gly	Val	Gln	Ile	Tyr	Ala	
			660					665					670			
Cys	Gly	Pro	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Glu	Asp	Ala	Ser	Arg	Asn	
		675					680					685				
Trp	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	His	Val	Glu	His	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	Ala	
	690					695					700					
Ala	Leu	Asp	Pro	Asp	Val	Glu	His	Ala	Phe	Asp	Leu	Glu	Leu	Arg	Asp	
705					710					715					720	
Ser	Gly	Leu	Thr	Val	Arg	Val	Glu	Pro	Thr	Gln	Thr	Val	Leu	Asp	Ala	
				725					730					735		
Leu	Arg	Ala	Asn	Asn	Ile	Asp	Val	Pro	Ser	Asp	Cys	Glu	Glu	Gly	Leu	
			740				745					750				
Cys	Gly	Ser	Cys	Glu	Val	Ala	Val	Leu	Asp	Gly	Glu	Val	Asp	His	Arg	
		755					760					765				
Asp	Thr	Val	Leu	Thr	Lys	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Asn	Arg	Gln	Met	Met	
	770					775					780					
Thr	Cys	Cys	Ser	Arg	Ala	Cys	Gly	Asp	Arg	Leu	Ala	Leu	Arg	Leu		
785					790					795						

<210> 23
 <211> 2400
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

5

<400> 23

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gcccacgccg accgatgccc gaattcggtg aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag	240
tggcgcgccct atttcaaacg gttgctgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaatt attctcgggt accctccgga ggggctgtcg	420
gtggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc aaacaccggc	540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact ggggtacctg tgtttccaag	600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag	660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc	720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg	780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg	840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat	900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tgggtggcctg	960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt	1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgcgcg tggcctatat gcgccgaatc	1080
gccaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga aggtgatcg agttgtcatg	1140
tggtagcgt cggttaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt	1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcaccg ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcatc ctctgggaag aaataactca gcgttttgac	1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc	1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcacatcaacc tgtcaccatc	1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcat	1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg	1560
acgcctggcg ctcacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc	1620

ES 2 803 560 T3

```

ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgcact tagatccgga aagccgtggt 1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca 1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cggggggtatc 1800
ggcatcacgc cgggtgctggc aatggcggat catgcccggtg cgctggttg gtcgtacgaa 1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcttacc tggaacgcgt cgcgggacat 1920
ggtgaccgcy ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcacc gcattgatct ggcggcatta 1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaata tacgcctgcy gtccggggccg tttattagcy 2040
ggtcttgaag acgcgtctcy taattggccg gatggcgcgc ttcattgtga gcatttcact 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgcy gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac 2160
tctggcetta ccgttcgcy cgagccaact cagaccgtt tagacgctt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacy tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgcy agtagccgtt 2280
ctggatggcy aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcy cgccgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgac gtctggcgct gcgcctctaa 2400

```

<210> 24

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 24

```

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1           5           10           15

```

```

Asn Ala Thr Ser Arg Val Val Pro Met Gln Arg Gln Ile Gln Gly Leu
20           25           30

```

```

Lys Phe Leu Met Ser Ala Lys Arg Lys Thr Phe Gly Pro Arg Arg Pro
35           40           45

```

```

Met Pro Glu Phe Val Glu Thr Pro Ile Pro Asp Val Asn Thr Leu Ala
50           55           60

```

```

Leu Glu Asp Ile Asp Val Ser Asn Pro Phe Leu Tyr Arg Gln Gly Gln
65           70           75           80

```

```

Trp Arg Ala Tyr Phe Lys Arg Leu Arg Asp Glu Ala Pro Val His Tyr
85           90           95

```

```

Gln Lys Asn Ser Pro Phe Gly Pro Phe Trp Ser Val Thr Arg Phe Glu

```

ES 2 803 560 T3

100										105					110				
Asp	Ile	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Ser	His	Asp	Leu	Phe	Ser	Ala	Glu	Pro				
		115					120					125							
Gln	Ile	Ile	Leu	Gly	Asp	Pro	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Val	Glu	Met	Phe				
	130					135					140								
Ile	Ala	Met	Asp	Pro	Pro	Lys	His	Asp	Val	Gln	Arg	Ser	Ser	Val	Gln				
145					150					155					160				
Gly	Val	Val	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Met	Glu	Gly	Leu	Ile	Arg				
				165					170					175					
Ser	Asn	Thr	Gly	Asp	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Thr	Asp	Lys	Pro	Phe				
			180					185					190						
Asn	Trp	Val	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Met	Leu	Ala				
	195						200					205							
Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Glu	Glu	Arg	His	Lys	Leu	Val	Glu	Trp				
	210					215					220								
Ser	Asp	Arg	Met	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe	Ala				
225					230					235					240				
Asp	Glu	Asn	Ala	Met	Phe	Asp	Asp	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Arg	Ser	Phe				
				245					250					255					
Ser	Arg	Leu	Trp	Arg	Asp	Lys	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Gly	Glu	Glu				
		260						265					270						
Pro	Gly	Phe	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu	Gln	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys				
		275					280					285							
Asp	Leu	Ile	Asn	Arg	Pro	Met	Glu	Phe	Ile	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu				
	290					295					300								
Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Gly	Leu				
305				310						315					320				
Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Lys				
				325					330					335					
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr				
		340						345					350						

ES 2 803 560 T3

Pro Leu Ala Tyr Met Arg Arg Ile Ala Lys Gln Asp Val Glu Leu Gly
 355 360 365
 Gly Gln Thr Ile Lys Lys Gly Asp Arg Val Val Met Trp Tyr Ala Ser
 370 375 380
 Gly Asn Arg Asp Glu Arg Lys Phe Asp Asn Pro Asp Gln Phe Ile Ile
 385 390 395 400
 Asp Arg Lys Asp Ala Arg Asn His Met Ser Phe Gly Tyr Gly Val His
 405 410 415
 Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp
 420 425 430
 Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro
 435 440 445
 Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
 450 455 460
 Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495
 Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525
 Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540
 Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575
 Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590
 Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605

ES 2 803 560 T3

Ala	Asp	His	Ala	Arg	Ala	Arg	Gly	Trp	Ser	Tyr	Glu	Leu	His	Tyr	Cys
610							615					620			
Gly	Arg	Asn	Arg	Ser	Gly	Met	Ala	Tyr	Leu	Glu	Arg	Val	Ala	Gly	His
625						630					635				640
Gly	Asp	Arg	Ala	Ala	Leu	His	Val	Ser	Glu	Glu	Gly	Thr	Arg	Ile	Asp
					645					650					655
Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Glu	Pro	Ala	Pro	Gly	Val	Gln	Ile	Tyr	Ala
			660						665					670	
Cys	Gly	Pro	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Glu	Asp	Ala	Ser	Arg	Asn
		675						680					685		
Trp	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	His	Val	Glu	His	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	Ala
	690						695					700			
Ala	Leu	Asp	Pro	Asp	Val	Glu	His	Ala	Phe	Asp	Leu	Glu	Leu	Arg	Asp
705						710				715					720
Ser	Gly	Leu	Thr	Val	Arg	Val	Glu	Pro	Thr	Gln	Thr	Val	Leu	Asp	Ala
				725					730					735	
Leu	Arg	Ala	Asn	Asn	Ile	Asp	Val	Pro	Ser	Asp	Cys	Glu	Glu	Gly	Leu
			740					745					750		
Cys	Gly	Ser	Cys	Glu	Val	Ala	Val	Leu	Asp	Gly	Glu	Val	Asp	His	Arg
		755						760					765		
Asp	Thr	Val	Leu	Thr	Lys	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Asn	Arg	Gln	Met	Met
	770						775					780			
Thr	Cys	Cys	Ser	Arg	Ala	Cys	Gly	Asp	Arg	Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	
785						790					795				

<210> 25

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 25

atgccaaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc 60

agggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg 120

ES 2 803 560 T3

aagaccttcg	gcccacgccg	accgatgccc	gaattcggtg	aaacacccat	cccggacgtt	180
aacacgctgg	cccttgagga	catcgatgtc	agcaatccgt	ttttataccg	gcagggtcag	240
tggcgcgcct	atttcaaacg	gttgcgatgat	gaggcgccgg	tccattacca	gaagaacagc	300
cctttcggcc	ccttctggtc	ggtaactcgg	tttgaagaca	tcctgttcgt	ggataagagt	360
cacgacctgt	tttccgccga	gccgcaaadc	attctcgggtg	accctccgga	ggggctgtcg	420
gtggaaatgt	tcatagcgat	ggatccgccg	aaacacgatg	tgcagcgcag	ctcgggtgcag	480
ggagtagtgg	caccgaaaaa	cctgaaggag	atggaggggc	tgatccgatc	acgcaccggc	540
gatgtgcttg	acagcctgcc	tacagacaaa	ccctttaact	gggtacctgc	tgtttccaag	600
gaactcacag	gccgcatgct	ggcgacgctt	ctggattttc	cttacgagga	acgccacaag	660
ctggttgagt	ggtcggacag	aatggcaggt	gcagcatcgg	ccaccggcgg	ggagtttgcc	720
gatgaaaatg	ccatgtttga	cgacgcggca	gacatggccc	ggtctttctc	caggctttgg	780
cgggacaagg	agggcgcccg	cgcagcaggc	gaggagcccg	gtttcgattt	gatcagcctg	840
ttgcagagca	acaaagaaac	gaaagacctg	atcaatccgg	cgatggagtt	tatcggtaat	900
ttgacgctgc	tcatagtcgc	cggccgggat	acgacgcgca	actcgatgag	tgggtggcctg	960
gtggccatga	acgaattccc	cagggaattt	gaaaaattga	aggcaaaacc	ggagttgatt	1020
ccgaacatgg	tgtcggaaat	catccgctgg	caaacgccgc	tggcctatat	gcgccgaatc	1080
gccaagcagg	atgtcgaact	gggcggccag	accatcaaga	agggtgatcg	agttgtcatg	1140
tggtagcgtg	cgggtaaccg	ggacgagcgc	aaatttgaca	accccgatca	gttcatcatt	1200
gatcgcaagg	acgcacgaaa	ccacatgtcg	ttcggctatg	gggttcaccg	ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg	ctgaactgca	actgcgcata	ctctgggaag	aaataactcaa	gcgttttgac	1320
aacatcgaag	tcgtcgaaga	gcccagagcg	gtgcagtcca	acttcgtgcg	gggctattcc	1380
aggttgatgg	tcaaactgac	accgaacagt	gtactccata	gtcatcaacc	tgtcaccata	1440
ggcgagccgg	ccgctcgtgc	tgtgagccgc	acggtgaccg	ttgagcgtct	tgatcgcatt	1500
gccgacgatg	tccttcgcct	ggtccttcgc	gatgctggag	gtaaaaccct	cccgacgtgg	1560
acgcctggcg	ctcacatcga	cctggatctg	ggtgctctga	gccgtcagta	ttcgtctcgc	1620
ggcgctccgg	atgctccgtc	gtacgaaadc	gccgtgcact	tagatccgga	aagccgtggg	1680
ggaagccgct	atattcatga	acagctggaa	gttggaaagtc	cgctgcgtat	gcgtggccca	1740
cgaaccattt	tcgccctgga	tccgggtgcg	gaacattacg	tgtttgttgc	cgggggatct	1800
ggcatcacgc	cgggtgctgg	aatggcggat	catgcccggt	cgcgtggttg	gtcgtacgaa	1860
ctgcattatt	gtggtcgtaa	tcgtagcggg	atggcttacc	tggaaacgct	cgcgggacat	1920
ggtgaccgcg	ctgccttgca	cgtatctgaa	gaaggcaccc	gcattgatct	ggcggcatta	1980
cttgctgaac	cggcgccggg	cgtgcaaadc	tacgcctgcg	gtccgggccg	tttattagcg	2040

ES 2 803 560 T3

```

gggtcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcatgtgga gcatttcact      2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgtc gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac      2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac      2220
aatatcgacg tcccgtcggg ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgcca agtagccgtt      2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgccgcgaat      2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggcgct gcgcctctaa      2400

```

<210> 26

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 26

```

Met  Pro  Thr  Leu  Pro  Arg  Thr  Phe  Asp  Asp  Ile  Gln  Ser  Arg  Leu  Ile
 1              5              10              15

Asn  Ala  Thr  Ser  Arg  Val  Val  Pro  Met  Gln  Arg  Gln  Ile  Gln  Gly  Leu
          20              25              30

Lys  Phe  Leu  Met  Ser  Ala  Lys  Arg  Lys  Thr  Phe  Gly  Pro  Arg  Arg  Pro
          35              40              45

Met  Pro  Glu  Phe  Val  Glu  Thr  Pro  Ile  Pro  Asp  Val  Asn  Thr  Leu  Ala
 50              55              60

Leu  Glu  Asp  Ile  Asp  Val  Ser  Asn  Pro  Phe  Leu  Tyr  Arg  Gln  Gly  Gln
65              70              75              80

Trp  Arg  Ala  Tyr  Phe  Lys  Arg  Leu  Arg  Asp  Glu  Ala  Pro  Val  His  Tyr
          85              90              95

Gln  Lys  Asn  Ser  Pro  Phe  Gly  Pro  Phe  Trp  Ser  Val  Thr  Arg  Phe  Glu
          100              105              110

Asp  Ile  Leu  Phe  Val  Asp  Lys  Ser  His  Asp  Leu  Phe  Ser  Ala  Glu  Pro
          115              120              125

Gln  Ile  Ile  Leu  Gly  Asp  Pro  Pro  Glu  Gly  Leu  Ser  Val  Glu  Met  Phe
130              135              140

Ile  Ala  Met  Asp  Pro  Pro  Lys  His  Asp  Val  Gln  Arg  Ser  Ser  Val  Gln
145              150              155              160

```

ES 2 803 560 T3

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

ES 2 803 560 T3

Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp
 420 425 430
 Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro
 435 440 445
 Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
 450 455 460
 Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495
 Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525
 Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540
 Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575
 Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590
 Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605
 Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
 610 615 620
 Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
 625 630 635 640
 Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
 645 650 655
 Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala

ES 2 803 560 T3

660	665	670
Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu	Ala Gly Leu Glu Asp	Ala Ser Arg Asn
675	680	685
Trp Pro Asp Gly Ala Leu His	Val Glu His Phe Thr	Ser Ser Leu Ala
690	695	700
Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His	Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg	Asp
705	710	715
Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro	Thr Gln Thr Val Leu Asp	Ala
	725	730
Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val	Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu	
	740	745
Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val	Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg	
	755	760
Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg	Ala Ala Asn Arg Gln Met Met	
	770	775
Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg	Leu Ala Leu Arg Leu	
	785	790

<210> 27

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 27

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
agggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gcccacgccc accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt tttataaccg gcagggtcag	240
tggcgcgcct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ctttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaata attctcggtg accctccgga ggggctgtcg	420
gtggaaatgt tcatagcgat ggatccgccc aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc	540

ES 2 803 560 T3

gatgtgcttg	acagcctgcc	tacagacaaa	ccctttaact	gggtacctgc	tgtttccaag	600
gaactcacag	gccgcatgct	ggcgacgctt	ctggattttc	cttacgagga	acgccacaag	660
ctggttgagt	ggtcggacag	aatggcaggt	gcggcatcgg	ccaccggcgg	ggagtttgcc	720
gatgaaaatg	ccatgtttga	cgacgcggca	gacatggccc	ggcttttctc	caggctttgg	780
cgggacaagg	aggcgcgccg	cgcagcaggc	gaggagcccc	gtttcgattt	gatcagcctg	840
ttgcagagca	acaaagaaac	gaaagacctg	atcaatcggc	cgatggagtt	tatcggtaat	900
ttgacgctgc	tcatagtcgc	cggcaacgat	acgacgcgca	actcgatgag	tggtaggcctg	960
gtggccatga	acgaattccc	cagggaattt	gaaaaattga	aggcaaaacc	ggagttgatt	1020
ccgaacatgg	tgtcggaaat	catccgctgg	caaacgcgcg	tggcctatat	gcgccgaatc	1080
gccaagcagg	atgtcgaact	ggcgggccag	accatcaaga	agggtgatcg	agttgtcatg	1140
tggtagcgct	cgggtaaccg	ggacgagcgc	aaatttgaca	accccgatca	gttcatcatt	1200
gatcgcaagg	acgcacgaaa	ccacatgtcg	ttcggtatag	gggttcaccg	ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg	ctgaactgca	actgcgcata	ctctgggaag	aaataactca	gcgttttgac	1320
aacatcgaag	tcgtcgaaga	gcccagcgcg	gtgcagtcca	acttcgtgcg	gggctattcc	1380
aggttgatgg	tcaaactgac	accgaacagt	gtactccata	gtcatcaacc	tgtcaccata	1440
ggcgagccgg	ccgctcgtgc	tgtgagccgc	acggtgaccg	ttgagcgtct	tgatcgcatc	1500
gccgacgatg	tccttcgcct	gttccttcgc	gatgctggag	gtaaaaccct	cccgacgtgg	1560
acgcctggcg	ctcacatcga	cctggatctg	ggtgctctga	gccgtcagta	ttcgctctgc	1620
ggcgctccgg	atgctccgtc	gtacgaaata	gccgtgcact	tagatccgga	aagccgtggt	1680
ggaagccgct	atattcatga	acagctggaa	gttggaaagtc	cgctgcgtat	gcgtggccca	1740
cgaaccatt	tcgccctgga	tccgggtgcg	gaacattacg	tgtttgttgc	cgggggtatc	1800
ggcatcacgc	cgggtgctggc	aatggcggat	catgcccgtg	cgcgtggttg	gtcgtacgaa	1860
ctgcattatt	gtggtcgtaa	tcgtagcggg	atggcttacc	tggaaacgct	cgcgggacat	1920
ggtgaccgcg	ctgccttgca	cgtatctgaa	gaaggcacc	gcattgatct	ggcggcatta	1980
cttgctgaac	cggcgccggg	cgtgcaaata	tacgcctgcg	gtccgggccg	tttattagcg	2040
ggctctgaag	acgcgtctcg	taattggccg	gatggcgcg	ttcatgtgga	gcatttcact	2100
tcgagtttag	ccgctttgga	tccggatgtc	gaacatgcct	ttgatttgga	gctgcgtgac	2160
tctggcctta	ccgttcgcgt	cgagccaact	cagaccgttt	tagacgcttt	gcgtgcgaac	2220
aatatcgacg	tcccgtcgga	ttgcgaagag	gggctgtgtg	gttcttgcca	agtagccgtt	2280
ctggatggcg	aggttgatca	ccgtgatacc	gttctgacta	aggccgagcg	cgcgcggaat	2340
cgtcagatga	tgacttgctg	cagtcgtgca	tgcggtgata	gtctggcgct	gcgcctctaa	2400

<210> 28

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 803 560 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5 <400> 28

```

Met  Pro  Thr  Leu  Pro  Arg  Thr  Phe  Asp  Asp  Ile  Gln  Ser  Arg  Leu  Ile
 1              5              10              15

Asn  Ala  Thr  Ser  Arg  Val  Val  Pro  Met  Gln  Arg  Gln  Ile  Gln  Gly  Leu
      20              25              30

Lys  Phe  Leu  Met  Ser  Ala  Lys  Arg  Lys  Thr  Phe  Gly  Pro  Arg  Arg  Pro
      35              40              45

Met  Pro  Glu  Phe  Val  Glu  Thr  Pro  Ile  Pro  Asp  Val  Asn  Thr  Leu  Ala
      50              55              60

Leu  Glu  Asp  Ile  Asp  Val  Ser  Asn  Pro  Phe  Leu  Tyr  Arg  Gln  Gly  Gln
65              70              75              80

Trp  Arg  Ala  Tyr  Phe  Lys  Arg  Leu  Arg  Asp  Glu  Ala  Pro  Val  His  Tyr
      85              90              95

Gln  Lys  Asn  Ser  Pro  Phe  Gly  Pro  Phe  Trp  Ser  Val  Thr  Arg  Phe  Glu
      100              105              110

Asp  Ile  Leu  Phe  Val  Asp  Lys  Ser  His  Asp  Leu  Phe  Ser  Ala  Glu  Pro
      115              120              125

Gln  Ile  Ile  Leu  Gly  Asp  Pro  Pro  Glu  Gly  Leu  Ser  Val  Glu  Met  Phe
      130              135              140

Ile  Ala  Met  Asp  Pro  Pro  Lys  His  Asp  Val  Gln  Arg  Ser  Ser  Val  Gln
145              150              155              160

Gly  Val  Val  Ala  Pro  Lys  Asn  Leu  Lys  Glu  Met  Glu  Gly  Leu  Ile  Arg
      165              170              175

Ser  Arg  Thr  Gly  Asp  Val  Leu  Asp  Ser  Leu  Pro  Thr  Asp  Lys  Pro  Phe
      180              185              190

Asn  Trp  Val  Pro  Ala  Val  Ser  Lys  Glu  Leu  Thr  Gly  Arg  Met  Leu  Ala
      195              200              205

Thr  Leu  Leu  Asp  Phe  Pro  Tyr  Glu  Glu  Arg  His  Lys  Leu  Val  Glu  Trp

```

ES 2 803 560 T3

210	215	220
Ser Asp Arg Met Ala Gly Ala Ala Ser Ala Thr Gly Gly Glu Phe Ala		
225	230	235 240
Asp Glu Asn Ala Met Phe Asp Asp Ala Ala Asp Met Ala Arg Ser Phe		
	245 250	255
Ser Arg Leu Trp Arg Asp Lys Glu Ala Arg Arg Ala Ala Gly Glu Glu		
	260 265	270
Pro Gly Phe Asp Leu Ile Ser Leu Leu Gln Ser Asn Lys Glu Thr Lys		
	275 280	285
Asp Leu Ile Asn Arg Pro Met Glu Phe Ile Gly Asn Leu Thr Leu Leu		
	290 295	300
Ile Val Ala Gly Asn Asp Thr Thr Arg Asn Ser Met Ser Gly Gly Leu		
305	310 315	320
Val Ala Met Asn Glu Phe Pro Arg Glu Phe Glu Lys Leu Lys Ala Lys		
	325 330	335
Pro Glu Leu Ile Pro Asn Met Val Ser Glu Ile Ile Arg Trp Gln Thr		
	340 345	350
Pro Leu Ala Tyr Met Arg Arg Ile Ala Lys Gln Asp Val Glu Leu Gly		
	355 360	365
Gly Gln Thr Ile Lys Lys Gly Asp Arg Val Val Met Trp Tyr Ala Ser		
	370 375	380
Gly Asn Arg Asp Glu Arg Lys Phe Asp Asn Pro Asp Gln Phe Ile Ile		
385	390 395	400
Asp Arg Lys Asp Ala Arg Asn His Met Ser Phe Gly Tyr Gly Val His		
	405 410	415
Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp		
	420 425	430
Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro		
	435 440	445
Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val		
	450 455	460

ES 2 803 560 T3

Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495
 Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525
 Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540
 Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575
 Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590
 Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605
 Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
 610 615 620
 Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
 625 630 635 640
 Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
 645 650 655
 Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
 660 665 670
 Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
 675 680 685
 Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
 690 695 700
 Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
 705 710 715 720

ES 2 803 560 T3

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 29

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 29

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
agggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gccacgccg accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacggt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag	240
tggcgcgcct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaatc attctcgttg accctccgga ggggctgtcg	420
gtggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgcag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc	540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag	600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag	660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc	720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg	780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg	840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat	900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tgggtgcctg	960

ES 2 803 560 T3

```

gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt 1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc 1080
gccaaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga aggggtgatcg agttgtcatg 1140
tggtacgcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt 1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg ggcgtcaccg ttgcatgggc 1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcata ctctgggaag aaataactca gcgttttgac 1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc 1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcatacaacc tgtcaccatc 1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acgggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcatt 1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg 1560
acgcctggcg ctacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc 1620
ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgcact tagatccgga aagccgtggt 1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca 1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc 1800
ggcatcacgc cgggtcgtgc aatggcggat catgcccggt cgcggtggtg gtcgtacgaa 1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcttacc tggaacgcgt cgcgggacat 1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcaccg gcattgatct ggcggcatta 1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaata tacgcctgcg gtccggggccg tttattagcg 2040
ggtcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcattgtga gcatttcact 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgtc gaacatgcct ttgatttga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgcgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggcgct gcgcctctaa 2400

```

<210> 30

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 30

```

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1           5           10           15

```

ES 2 803 560 T3

Asn	Ala	Thr	Ser	Arg	Val	Val	Pro	Met	Gln	Arg	Gln	Ile	Gln	Gly	Leu	20	25	30	
Lys	Phe	Leu	Met	Ser	Ala	Lys	Arg	Lys	Thr	Phe	Gly	Pro	Arg	Arg	Pro	35	40	45	
Met	Pro	Glu	Phe	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Leu	Ala	50	55	60	
Leu	Glu	Asp	Ile	Asp	Val	Ser	Asn	Pro	Phe	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly	Gln	65	70	75	80
Trp	Arg	Ala	Tyr	Phe	Lys	Arg	Leu	Arg	Asp	Glu	Ala	Pro	Val	His	Tyr	85	90	95	
Gln	Lys	Asn	Ser	Pro	Phe	Gly	Pro	Phe	Trp	Ser	Val	Thr	Arg	Phe	Glu	100	105	110	
Asp	Ile	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Ser	His	Asp	Leu	Phe	Ser	Ala	Glu	Pro	115	120	125	
Gln	Ile	Ile	Leu	Gly	Asp	Pro	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Val	Glu	Met	Phe	130	135	140	
Ile	Ala	Met	Asp	Pro	Pro	Lys	His	Asp	Val	Gln	Arg	Ser	Ser	Val	Gln	145	150	155	160
Gly	Val	Val	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Met	Glu	Gly	Leu	Ile	Arg	165	170	175	
Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Thr	Asp	Lys	Pro	Phe	180	185	190	
Asn	Trp	Val	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Met	Leu	Ala	195	200	205	
Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Glu	Glu	Arg	His	Lys	Leu	Val	Glu	Trp	210	215	220	
Ser	Asp	Arg	Met	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe	Ala	225	230	235	240
Asp	Glu	Asn	Ala	Met	Phe	Asp	Asp	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Arg	Ser	Phe	245	250	255	
Ser	Arg	Leu	Trp	Arg	Asp	Lys	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Gly	Glu	Glu	260	265	270	

ES 2 803 560 T3

Pro Gly Phe Asp Leu Ile Ser Leu Leu Gln Ser Asn Lys Glu Thr Lys
 275 280 285

Asp Leu Ile Asn Arg Pro Met Glu Phe Ile Gly Asn Leu Thr Leu Leu
 290 295 300

Ile Val Ala Gly Asn Asp Thr Thr Arg Asn Ser Met Ser Gly Gly Leu
 305 310 315 320

Val Ala Met Asn Glu Phe Pro Arg Glu Phe Glu Lys Leu Lys Ala Lys
 325 330 335

Pro Glu Leu Ile Pro Asn Met Val Ser Glu Ile Ile Arg Trp Gln Thr
 340 345 350

Pro Leu Ala Tyr Met Arg Arg Ile Ala Lys Gln Asp Val Glu Leu Gly
 355 360 365

Gly Gln Thr Ile Lys Lys Gly Asp Arg Val Val Met Trp Tyr Ala Ser
 370 375 380

Gly Asn Arg Asp Glu Arg Lys Phe Asp Asn Pro Asp Gln Phe Ile Ile
 385 390 395 400

Asp Arg Lys Asp Ala Arg Asn His Met Ser Phe Gly Tyr Gly Arg His
 405 410 415

Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp
 420 425 430

Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro
 435 440 445

Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
 450 455 460

Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480

Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495

Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510

Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525

ES 2 803 560 T3

Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540

Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560

Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575

Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590

Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605

Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
 610 615 620

Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
 625 630 635 640

Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
 645 650 655

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
 660 665 670

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
 675 680 685

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
 690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
 705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
 725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
 740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
 755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met

ES 2 803 560 T3

770

775

780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 31

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 31

```

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc      60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg      120
aagaccttcg gcccacgccg accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt      180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag      240
tgggcgcgctt atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc      300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt      360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaata attctcgttg accctccgga ggggctgtcg      420
atcgaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag      480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgata acgcaccggc      540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag      600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag      660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt acagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc      720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg      780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg      840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat      900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tgggtggcctg      960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt     1020
ccgaacatgg tgtcggaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc     1080
gccaaagcagg atgtcgaact gggcgccag accatcaaga agggatgatc agttgtcatg     1140
tggtacgcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt     1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcaccg ttgcatgggc     1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcata ctctgggaag aaataactcaa gcgttttgac     1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccagagcg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc     1380

```

ES 2 803 560 T3

```

aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcacccaacc tgtcaccatc 1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcatc 1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg 1560
acgcctggcg ctcacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc 1620
ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgcaat tagatccgga aagccgtggt 1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca 1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc 1800
ggcatcacgc cggtgctggc aatggcggat catgcccgct cgcggtggtg gtcgtacgaa 1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcctacc tggaacgcgt cgcgggacat 1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcacc gcattgatct ggcggcatta 1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaate tacgcctgcg gtccgggccc tttattagcg 2040
ggtcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcatgtgga gcatttcaat 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgac gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgcca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgccgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgata gtctggcgct gcgcctctaa 2400

```

<210> 32

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 32

ES 2 803 560 T3

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1 5 10 15

Asn Ala Thr Ser Arg Val Val Pro Met Gln Arg Gln Ile Gln Gly Leu
20 25 30

Lys Phe Leu Met Ser Ala Lys Arg Lys Thr Phe Gly Pro Arg Arg Pro
35 40 45

Met Pro Glu Phe Val Glu Thr Pro Ile Pro Asp Val Asn Thr Leu Ala
50 55 60

Leu Glu Asp Ile Asp Val Ser Asn Pro Phe Leu Tyr Arg Gln Gly Gln
65 70 75 80

ES 2 803 560 T3

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

ES 2 803 560 T3

				325				330				335			
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr
340								345					350		
Pro	Leu	Ala	Tyr	Met	Arg	Arg	Ile	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Gly
355				360				365							
Gly	Gln	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Ala	Ser
370				375				380							
Gly	Asn	Arg	Asp	Glu	Arg	Lys	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Gln	Phe	Ile	Ile
385				390				395				400			
Asp	Arg	Lys	Asp	Ala	Arg	Asn	His	Met	Ser	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	His
				405				410				415			
Arg	Cys	Met	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Trp
420				425				430							
Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg	Phe	Asp	Asn	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Glu	Pro
435				440				445							
Glu	Arg	Val	Gln	Ser	Asn	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr	Ser	Arg	Leu	Met	Val
450				455				460							
Lys	Leu	Thr	Pro	Asn	Ser	Val	Leu	His	Arg	His	Gln	Pro	Val	Thr	Ile
465				470				475				480			
Gly	Glu	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Arg
485				490				495							
Leu	Asp	Arg	Ile	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Leu	Arg	Asp	Ala
500				505				510							
Gly	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Thr	Trp	Thr	Pro	Gly	Ala	His	Ile	Asp	Leu
515				520				525							
Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Ser	Arg	Gln	Tyr	Ser	Leu	Cys	Gly	Ala	Pro	Asp
530				535				540							
Ala	Pro	Ser	Tyr	Glu	Ile	Ala	Val	His	Leu	Asp	Pro	Glu	Ser	Arg	Gly
545				550				555				560			
Gly	Ser	Arg	Tyr	Ile	His	Glu	Gln	Leu	Glu	Val	Gly	Ser	Pro	Leu	Arg
565				570				575							

ES 2 803 560 T3

Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
580 585 590

Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
595 600 605

Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
610 615 620

Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
625 630 635 640

Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
645 650 655

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
660 665 670

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
675 680 685

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 33

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

ES 2 803 560 T3

<400> 33

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
aggggtggtgc cgatgcagct gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gcccacgccg accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag	240
tgggacgcct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaatac attctcgttg accctccgga ggggctgtcg	420
atggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgac aaacaccggc	540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag	600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag	660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc	720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg	780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg	840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat	900
ttgacgctgc tcatagtgcg cggcgcggtat acgacgcgca actcgatgag tggtagcctg	960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt	1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc	1080
gccaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga agggatgatc agttgtcatg	1140
tggtagcgt cggttaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt	1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcaccg ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcatac ctctgggaag aaataactca gcgttttgac	1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc	1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccatac gtcatacaacc tgtcaccatac	1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcat	1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg	1560
acgcctggcg ctcacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc	1620
ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatac gccgtgcact tagatccgga aagccgtggt	1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca	1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc	1800

ggcatcacgc cgggtgctggc aatggcggat catgcccgtg cgcgtggttg gtcgtacgaa 1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcttacc tggaacgcgt cgcgggacat 1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcaccg gcattgatct ggcggcatta 1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaata tacgcctgcg gtccggggccg tttattagcg 2040
ggtcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcg cttcatgtgga gcatttcact 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgtc gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgccgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgata gtctggcgct gcgcctctaa 2400

<210> 34

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 34

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1 5 10 15

Asn Ala Thr Ser Arg Val Val Pro Met Gln Leu Gln Ile Gln Gly Leu
20 25 30

Lys Phe Leu Met Ser Ala Lys Arg Lys Thr Phe Gly Pro Arg Arg Pro
35 40 45

Met Pro Glu Phe Val Glu Thr Pro Ile Pro Asp Val Asn Thr Leu Ala
50 55 60

Leu Glu Asp Ile Asp Val Ser Asn Pro Phe Leu Tyr Arg Gln Gly Gln
65 70 75 80

Trp Asp Ala Tyr Phe Lys Arg Leu Arg Asp Glu Ala Pro Val His Tyr
85 90 95

Gln Lys Asn Ser Pro Phe Gly Pro Phe Trp Ser Val Thr Arg Phe Glu
100 105 110

Asp Ile Leu Phe Val Asp Lys Ser His Asp Leu Phe Ser Ala Glu Pro
115 120 125

ES 2 803 560 T3

Gln	Ile	Ile	Leu	Gly	Asp	Pro	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Met	Glu	Met	Phe	130	135	140
Ile	Ala	Met	Asp	Pro	Pro	Lys	His	Asp	Val	Gln	Arg	Ser	Ser	Val	Gln	145	150	155
Gly	Val	Val	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Met	Glu	Gly	Leu	Ile	Arg	165	170	175
Ser	Asn	Thr	Gly	Asp	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Thr	Asp	Lys	Pro	Phe	180	185	190
Asn	Trp	Val	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Met	Leu	Ala	195	200	205
Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Glu	Glu	Arg	His	Lys	Leu	Val	Glu	Trp	210	215	220
Ser	Asp	Arg	Met	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe	Ala	225	230	235
Asp	Glu	Asn	Ala	Met	Phe	Asp	Asp	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Arg	Ser	Phe	245	250	255
Ser	Arg	Leu	Trp	Arg	Asp	Lys	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Gly	Glu	Glu	260	265	270
Pro	Gly	Phe	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu	Gln	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys	275	280	285
Asp	Leu	Ile	Asn	Arg	Pro	Met	Glu	Phe	Ile	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu	290	295	300
Ile	Val	Ala	Gly	Ala	Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Gly	Leu	305	310	315
Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Lys	325	330	335
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr	340	345	350
Pro	Leu	Ala	Tyr	Met	Arg	Arg	Ile	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Gly	355	360	365
Gly	Gln	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Ala	Ser	370	375	380

ES 2 803 560 T3

Gly Asn Arg Asp Glu Arg Lys Phe Asp Asn Pro Asp Gln Phe Ile Ile
 385 390 395 400
 Asp Arg Lys Asp Ala Arg Asn His Met Ser Phe Gly Tyr Gly Val His
 405 410 415
 Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp
 420 425 430
 Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro
 435 440 445
 Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
 450 455 460
 Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495
 Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525
 Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540
 Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575
 Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590
 Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605
 Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
 610 615 620
 Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
 625 630 635 640

ES 2 803 560 T3

Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
645 650 655

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
660 665 670

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
675 680 685

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 35

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 35

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
agggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gccacgccc accgatgccc gaattcggtt aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt tttataaccg gcagggtcag	240
tggcgcgcct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360

ES 2 803 560 T3

cacgacctgt	tttccgccga	gcgcgaaatc	attctcgggtg	accctccgga	ggggctgtcg	420
gtggaaatgt	tcatagcgat	ggatccgccg	aaacacgatg	tgcagcgag	ctcgggtgcag	480
ggagtagtgg	caccgaaaaa	cctgaaggag	atggaggggc	tgatccgac	acgcaccggc	540
gatgtgcttg	acagcctgcc	tacagacaaa	ccctttaact	gggtacctgc	tgtttccaag	600
gaactcacag	gccgcatgct	ggcgacgctt	ctggattttc	cttacgagga	acgccacaag	660
ctggttgagt	ggtcggacag	aatggcaggt	gcagcatcgg	ccaccggcgg	ggagtttgcc	720
gatgaaaatg	ccatgtttga	cgacgcggca	gacatggccc	ggtctttctc	caggctttgg	780
cgggacaagg	aggcgcgccg	cgcagcaggc	gaggagcccg	gtttcgattt	gatcagcctg	840
ttgcagagca	acaaagaaac	gaaagacctg	atcaatcggc	cgatggagtt	tatcggtaat	900
ttgacgctgc	tcatagtgcg	cggcaacgat	acgacgcgca	actcgatgag	tggtagcctg	960
gtggccatga	acgaattccc	caggggaattt	gaaaaattga	aggcaaaacc	ggagttgatt	1020
ccgaacatgg	tgtcggaaat	catccgctgg	caaacgccgc	tggcctatat	gcgccgaatc	1080
gccaaagcag	atgtcgaact	ggcgggccag	accatcaaga	agggtgatcg	agttgtcatg	1140
tggtagcggt	cgggtaaccg	ggacgagcgc	aaatttgaca	accccgatca	gttcatcatt	1200
gatcgcaagg	acgcacgaaa	ccacatgtcg	ttcggctatg	gggttcaccg	ttgatggggc	1260
aaccgtctgg	ctgaactgca	actgcgcac	ctctgggaag	aaataactca	gcgttttgac	1320
aacatcgaag	tcgtcgaaga	gcccagagcg	gtgcagtcca	acttcgtgcg	gggctattcc	1380
aggttgatgg	tcaaactgac	accgaacagt	gtactccatc	gtcatcaacc	tgtcaccatc	1440
ggcgagccgg	ccgctcgtgc	tgtgagccgc	acggtgaccg	ttgagcgtct	tgatcgcat	1500
gccgacgatg	tccttcgcct	ggtccttcgc	gatgctggag	gtaaaaccct	cccgaactgg	1560
acgcctggcg	ctcacatcga	cctggatctg	ggtgctctga	gccgtcagta	ttcgctctgc	1620
ggcgctccgg	atgctccgtc	gtacgaaatc	gccgtgcact	tagatccgga	aagccgtgg	1680
ggaagccgct	atattcatga	acagctggaa	gttggaaagtc	cgtgcgtat	gcgtggccca	1740
cgaaccatt	tcgccctgga	tccgggtgcg	gaacattacg	tgtttgttgc	cgggggtatc	1800
ggcatcacgc	cgggtgctgg	aatggcggat	catgcccggt	cgcgtgggtg	gtcgtacgaa	1860
ctgcattatt	gtggtcgtaa	tcgtagcgg	atggcttacc	tggaaacggt	cgcgggacat	1920
ggtgaccgcg	ctgccttgca	cgtatctgaa	gaaggcacc	gcattgatct	ggcggcatta	1980
cttgctgaac	cggcgggcgg	cgtgcaaatc	tacgcctgcg	gtccggggcc	tttattagcg	2040
ggtcttgaag	acgcgtctcg	taattggccg	gatggcgcg	ttcatgtgga	gcatttcaact	2100
tcgagtttag	ccgctttgga	tccggatgtc	gaacatgcct	ttgatttgga	gctgcgtgac	2160
tctggcctta	ccgttcgcgt	cgaagccaa	cagaccgttt	tagacgcttt	gcgtgcgaac	2220

ES 2 803 560 T3

```

aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgccgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggcgct gcgcctctaa 2400

```

<210> 36

<211> 799

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 36

ES 2 803 560 T3

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

ES 2 803 560 T3

Asn	Trp	Val	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Met	Leu	Ala	195	200	205	
Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Glu	Glu	Arg	His	Lys	Leu	Val	Glu	Trp	210	215	220	
Ser	Asp	Arg	Met	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe	Ala	225	230	235	240
Asp	Glu	Asn	Ala	Met	Phe	Asp	Asp	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Arg	Ser	Phe	245	250	255	
Ser	Arg	Leu	Trp	Arg	Asp	Lys	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Gly	Glu	Glu	260	265	270	
Pro	Gly	Phe	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu	Gln	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys	275	280	285	
Asp	Leu	Ile	Asn	Arg	Pro	Met	Glu	Phe	Ile	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu	290	295	300	
Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Gly	Leu	305	310	315	320
Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Lys	325	330	335	
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr	340	345	350	
Pro	Leu	Ala	Tyr	Met	Arg	Arg	Ile	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Gly	355	360	365	
Gly	Gln	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Ala	Ser	370	375	380	
Gly	Asn	Arg	Asp	Glu	Arg	Lys	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Gln	Phe	Ile	Ile	385	390	395	400
Asp	Arg	Lys	Asp	Ala	Arg	Asn	His	Met	Ser	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	His	405	410	415	
Arg	Cys	Met	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Trp	420	425	430	
Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg	Phe	Asp	Asn	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Glu	Pro				

ES 2 803 560 T3

435		440		445
Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val				
450		455		460
Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile				
465		470		475
				480
Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg				
		485		490
				495
Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala				
		500		505
				510
Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu				
		515		520
				525
Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp				
		530		535
				540
Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly				
		545		550
				555
				560
Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg				
		565		570
				575
Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His				
		580		585
				590
Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met				
		595		600
				605
Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys				
		610		615
				620
Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His				
		625		630
				635
				640
Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp				
		645		650
				655
Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Ala Gly Val Gln Ile Tyr Ala				
		660		665
				670
Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn				
		675		680
				685

ES 2 803 560 T3

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Ala Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 37

<211> 2400

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

<400> 37

ES 2 803 560 T3

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gcccacgccc accgatgccc gaattcggtg aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataaccg gcagggtcag	240
tggcgcgctt atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaatac attctcggtg accctccgga ggggctgtcg	420
gtggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgcag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc	540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtacctgc tgtttccaag	600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag	660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc	720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg	780

ES 2 803 560 T3

cgggacaagg aggcgcgcgc cgcagcaggc gaggagcccc gtttcgattt gatcagcctg	840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat	900
ttgacgctgc tcatagtgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tggcggcctg	960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcataacc ggagttgatt	1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgcgcg tggcctatat gcgccgaatc	1080
gccaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga agggatgatc agttgtcatg	1140
tggtagcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca acccagatca gttcatcatt	1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcaccg ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcac cttctgggaag aaataactca gcgttttgac	1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc	1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcacaaacc tgtcaccatc	1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagcgc acggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcatc	1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg	1560
acgcctggcg ctacacatga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc	1620
ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgcact tagatccgga aagccgtggt	1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca	1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc	1800
ggcatcacgc cgggtgctggc aatggcggat catgcccggt cgcggtggtg gtcgtacgaa	1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcttacc tggaaacgcgt cgcgggacat	1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcacc gcattgatct ggcggcatta	1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaata tacgcctgcg gtccgggccc tttattagcg	2040
ggtcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcattgtgga gcatttcact	2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgtc gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac	2160
tctggcctta ccgttcgcgt cgagccaaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac	2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt	2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgccgcgaat	2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtctgca tgcggtgatc gtctggtcct gcgcctctaa	2400

<210> 38

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 803 560 T3

<400> 38

```

Met  Pro  Thr  Leu  Pro  Arg  Thr  Phe  Asp  Asp  Ile  Gln  Ser  Arg  Leu  Ile
1      5      10      15

Asn  Ala  Thr  Ser  Arg  Val  Val  Pro  Met  Gln  Arg  Gln  Ile  Gln  Gly  Leu
20      25      30

Lys  Phe  Leu  Met  Ser  Ala  Lys  Arg  Lys  Thr  Phe  Gly  Pro  Arg  Arg  Pro
35      40      45

Met  Pro  Glu  Phe  Val  Glu  Thr  Pro  Ile  Pro  Asp  Val  Asn  Thr  Leu  Ala
50      55      60

Leu  Glu  Asp  Ile  Asp  Val  Ser  Asn  Pro  Phe  Leu  Tyr  Arg  Gln  Gly  Gln
65      70      75      80

Trp  Arg  Ala  Tyr  Phe  Lys  Arg  Leu  Arg  Asp  Glu  Ala  Pro  Val  His  Tyr
85      90      95

Gln  Lys  Asn  Ser  Pro  Phe  Gly  Pro  Phe  Trp  Ser  Val  Thr  Arg  Phe  Glu
100     105     110

Asp  Ile  Leu  Phe  Val  Asp  Lys  Ser  His  Asp  Leu  Phe  Ser  Ala  Glu  Pro
115     120     125

Gln  Ile  Ile  Leu  Gly  Asp  Pro  Pro  Glu  Gly  Leu  Ser  Val  Glu  Met  Phe
130     135     140

Ile  Ala  Met  Asp  Pro  Pro  Lys  His  Asp  Val  Gln  Arg  Ser  Ser  Val  Gln
145     150     155     160

Gly  Val  Val  Ala  Pro  Lys  Asn  Leu  Lys  Glu  Met  Glu  Gly  Leu  Ile  Arg
165     170     175

Ser  Arg  Thr  Gly  Asp  Val  Leu  Asp  Ser  Leu  Pro  Thr  Asp  Lys  Pro  Phe
180     185     190

Asn  Trp  Val  Pro  Ala  Val  Ser  Lys  Glu  Leu  Thr  Gly  Arg  Met  Leu  Ala
195     200     205

Thr  Leu  Leu  Asp  Phe  Pro  Tyr  Glu  Glu  Arg  His  Lys  Leu  Val  Glu  Trp
210     215     220

Ser  Asp  Arg  Met  Ala  Gly  Ala  Ala  Ser  Ala  Thr  Gly  Gly  Glu  Phe  Ala
225     230     235     240

```

ES 2 803 560 T3

Asp Glu Asn Ala Met Phe Asp Asp Ala Ala Asp Met Ala Arg Ser Phe
 245 250 255
 Ser Arg Leu Trp Arg Asp Lys Glu Ala Arg Arg Ala Ala Gly Glu Glu
 260 265 270
 Pro Gly Phe Asp Leu Ile Ser Leu Leu Gln Ser Asn Lys Glu Thr Lys
 275 280 285
 Asp Leu Ile Asn Arg Pro Met Glu Phe Ile Gly Asn Leu Thr Leu Leu
 290 295 300
 Ile Val Ala Gly Asn Asp Thr Thr Arg Asn Ser Met Ser Gly Gly Leu
 305 310 315 320
 Val Ala Met Asn Glu Phe Pro Arg Glu Phe Glu Lys Leu Lys Ala Lys
 325 330 335
 Pro Glu Leu Ile Pro Asn Met Val Ser Glu Ile Ile Arg Trp Gln Thr
 340 345 350
 Pro Leu Ala Tyr Met Arg Arg Ile Ala Lys Gln Asp Val Glu Leu Gly
 355 360 365
 Gly Gln Thr Ile Lys Lys Gly Asp Arg Val Val Met Trp Tyr Ala Ser
 370 375 380
 Gly Asn Arg Asp Glu Arg Lys Phe Asp Asn Pro Asp Gln Phe Ile Ile
 385 390 395 400
 Asp Arg Lys Asp Ala Arg Asn His Met Ser Phe Gly Tyr Gly Val His
 405 410 415
 Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp
 420 425 430
 Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro
 435 440 445
 Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
 450 455 460
 Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495

ES 2 803 560 T3

Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510

Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525

Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540

Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560

Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575

Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590

Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605

Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
 610 615 620

Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
 625 630 635 640

Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
 645 650 655

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
 660 665 670

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
 675 680 685

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
 690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
 705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
 725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
 740 745 750

ES 2 803 560 T3

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Val Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 39

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 39

```

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc      60
aggggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg      120
aagaccttcg gcccacgccg accgatgccc gaattcggtg aaacacccat cccggacgtt      180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcaggggtcag      240
tggcgcgctt atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc      300
cctttcgggc cttctgggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt      360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaadc attctcgggt accctccgga ggggctgtcg      420
gtggaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag      480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggg tgatccgatc acgcaccggc      540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag      600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag      660
ctgggttgagt ggtcggacag aatggcaggt gcagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc      720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg      780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg      840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat      900
ttgacgctgc tcatagtgcg cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tggtagcctg      960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt     1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc     1080
gccaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga aggggtgatcg agttgtcatg     1140
tggtacgcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca accccgatca gttcatcatt     1200

```

ES 2 803 560 T3

gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttccggctatg ggggttcaccg ttgcatgggc 1260
aaccgtcttg ctgaactgca actgcgcata ctctgggaag aaataactcaa gcgttttgac 1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccagagcg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc 1380
aggttgatgg tcaaactgac accgaacagt gtactccata gtcatacaacc tgtcaccata 1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtgaccg ttgagcgtct tgatcgcat 1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaagtcct cccgacgtgg 1560
acgcctggcg ctacacatga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttcgctctgc 1620
ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgact tagatccgga aagccgtgg 1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca 1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggtatc 1800
ggcatcacgc cgggtgctggc aatggcggat catgcccggt cgctgggtg gtcgtacgaa 1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcgg atggcttacc tggaacgcgt cgcgggacat 1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcacc gcattgatct ggcggcatta 1980
cttgcgtgaa cggcgagcgg cgtgcaaata tacgcctgcg gtccggggcg tttattagcg 2040
ggtcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcg ttcatgtgga gcatttact 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgta gaacatgcct ttgatttga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgct cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgcgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggtcct gcgcctctaa 2400

<210> 40

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 40

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1 5 10 15

Asn Ala Thr Ser Arg Val Val Pro Met Gln Arg Gln Ile Gln Gly Leu
20 25 30

Lys Phe Leu Met Ser Ala Lys Arg Lys Thr Phe Gly Pro Arg Arg Pro
35 40 45

ES 2 803 560 T3

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

ES 2 803 560 T3

Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Gly	Leu	305	310	315	320
Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Lys	325	330	335	
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr	340	345	350	
Pro	Leu	Ala	Tyr	Met	Arg	Arg	Ile	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Gly	355	360	365	
Gly	Gln	Thr	Ile	Lys	Lys	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Met	Trp	Tyr	Ala	Ser	370	375	380	
Gly	Asn	Arg	Asp	Glu	Arg	Lys	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Gln	Phe	Ile	Ile	385	390	395	400
Asp	Arg	Lys	Asp	Ala	Arg	Asn	His	Met	Ser	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	His	405	410	415	
Arg	Cys	Met	Gly	Asn	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Trp	420	425	430	
Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg	Phe	Asp	Asn	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Glu	Pro	435	440	445	
Glu	Arg	Val	Gln	Ser	Asn	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr	Ser	Arg	Leu	Met	Val	450	455	460	
Lys	Leu	Thr	Pro	Asn	Ser	Val	Leu	His	Arg	His	Gln	Pro	Val	Thr	Ile	465	470	475	480
Gly	Glu	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Arg	485	490	495	
Leu	Asp	Arg	Ile	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Leu	Arg	Asp	Ala	500	505	510	
Gly	Gly	Lys	Val	Leu	Pro	Thr	Trp	Thr	Pro	Gly	Ala	His	Ile	Asp	Leu	515	520	525	
Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Ser	Arg	Gln	Tyr	Ser	Leu	Cys	Gly	Ala	Pro	Asp	530	535	540	
Ala	Pro	Ser	Tyr	Glu	Ile	Ala	Val	His	Leu	Asp	Pro	Glu	Ser	Arg	Gly				

ES 2 803 560 T3

545					550											555				560
Gly	Ser	Arg	Tyr	Ile	His	Glu	Gln	Leu	Glu	Val	Gly	Ser	Pro	Leu	Arg					
				565					570					575						
Met	Arg	Gly	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Ala	Leu	Asp	Pro	Gly	Ala	Glu	His					
			580					585					590							
Tyr	Val	Phe	Val	Ala	Gly	Gly	Ile	Gly	Ile	Thr	Pro	Val	Leu	Ala	Met					
		595					600					605								
Ala	Asp	His	Ala	Arg	Ala	Arg	Gly	Trp	Ser	Tyr	Glu	Leu	His	Tyr	Cys					
	610					615					620									
Gly	Arg	Asn	Arg	Ser	Gly	Met	Ala	Tyr	Leu	Glu	Arg	Val	Ala	Gly	His					
625					630					635					640					
Gly	Asp	Arg	Ala	Ala	Leu	His	Val	Ser	Glu	Glu	Gly	Thr	Arg	Ile	Asp					
				645					650					655						
Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Glu	Pro	Ala	Asp	Gly	Val	Gln	Ile	Tyr	Ala					
			660					665					670							
Cys	Gly	Pro	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Glu	Asp	Ala	Ser	Arg	Asn					
		675					680					685								
Trp	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	His	Val	Glu	His	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	Ala					
	690					695					700									
Ala	Leu	Asp	Pro	Asp	Val	Glu	His	Ala	Phe	Asp	Leu	Glu	Leu	Arg	Asp					
705					710					715					720					
Ser	Gly	Leu	Thr	Val	Arg	Val	Glu	Pro	Thr	Gln	Thr	Val	Leu	Asp	Ala					
				725					730					735						
Leu	Arg	Ala	Asn	Asn	Ile	Asp	Val	Pro	Ser	Asp	Cys	Glu	Glu	Gly	Leu					
			740				745					750								
Cys	Gly	Ser	Cys	Glu	Val	Ala	Val	Leu	Asp	Gly	Glu	Val	Asp	His	Arg					
		755					760					765								
Asp	Thr	Val	Leu	Thr	Lys	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Asn	Arg	Gln	Met	Met					
	770					775					780									
Thr	Cys	Cys	Ser	Arg	Ala	Cys	Gly	Asp	Arg	Leu	Val	Leu	Arg	Leu						
785					790					795										

<210> 41
<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 41

```

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc      60
agggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg      120
aagaccttcg gccacgccc accgatcccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt      180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt tttataaccg gcagggtcag      240
tggcgcgcct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc      300
cctttcggcc cttctgtgtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt      360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaatac attctcggtg accctccgga ggggctgtcg      420
atcgaaatgt tcatagcgat ggatccgccg aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag      480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgac acgcaccggc      540
gatgtgcttg acagcctgcc tacagacaaa ccctttaact gggtagctgc tgtttccaag      600
gaactcacag gccgcatgct ggcgacgctt ctggattttc cttacgagga acgccacaag      660
ctggttgagt ggtcggacag aatggcaggt acagcatcgg ccaccggcgg ggagtttgcc      720
gatgaaaatg ccatgtttga cgacgcggca gacatggccc ggtctttctc caggctttgg      780
cgggacaagg aggcgcgccg cgcagcaggc gaggagcccg gtttcgattt gatcagcctg      840
ttgcagagca acaaagaaac gaaagacctg atcaatcggc cgatggagtt tatcggtaat      900
ttgacgctgc tcatagtcgc cggcaacgat acgacgcgca actcgatgag tggtagcctg      960
gtggccatga acgaattccc cagggaattt gaaaaattga aggcaaaacc ggagttgatt     1020
ccgaacatgg tgtcggaaat catccgctgg caaacgccgc tggcctatat gcgccgaatc     1080
gccaagcagg atgtcgaact gggcggccag accatcaaga agggatgatc agttgtcatg     1140
tggtacgcgt cgggtaaccg ggacgagcgc aaatttgaca acccgcgatc gttcatcatt     1200
gatcgcaagg acgcacgaaa ccacatgtcg ttcggctatg gggttcaccg ttgcatgggc     1260
aaccgtctgg ctgaactgca actgcgcata ctctgggaag aaataactca gcgttttgac     1320
aacatcgaag tcgtcgaaga gcccgagcgg gtgcagtcca acttcgtgcg gggctattcc     1380
aggttgatgg tcaaaactgac accgaacagt gtactccatc gtcacaaacc tgtcaccatc     1440
ggcgagccgg ccgctcgtgc tgtgagccgc acggtagacc ttgagcgtct tgatcgcatt     1500
gccgacgatg tccttcgcct ggtccttcgc gatgctggag gtaaaaccct cccgacgtgg     1560
acgcctggcg ctcacatcga cctggatctg ggtgctctga gccgtcagta ttgcgtctgc     1620

```

ggcgctccgg atgctccgtc gtacgaaatc gccgtgcact tagatccgga aagccgtggt 1680
ggaagccgct atattcatga acagctggaa gttggaagtc cgctgcgtat gcgtggccca 1740
cgcaaccatt tcgccctgga tccgggtgcg gaacattacg tgtttgttgc cgggggatc 1800
ggcatcacgc cgggtgctggc aatggcggat catgccctg cgctgggtg gtcgtacgaa 1860
ctgcattatt gtggtcgtaa tcgtagcggg atggcttacc tggaacgcgt cgcgggacat 1920
ggtgaccgcg ctgccttgca cgtatctgaa gaaggcaccg gcattgatct ggcggcatta 1980
cttgctgaac cggcgccggg cgtgcaaatc tacgcctgcg gtccggggccg tttattagcg 2040
ggtcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcattgtga gcatttcaact 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgct gaacatgcct ttgatttga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgct cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgccgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggtcct gcgcctctaa 2400

<210> 42

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 42

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1 5 10 15

Asn Ala Thr Ser Arg Val Val Pro Met Gln Arg Gln Ile Gln Gly Leu
20 25 30

Lys Phe Leu Met Ser Ala Lys Arg Lys Thr Phe Gly Pro Arg Arg Pro
35 40 45

Met Pro Glu Phe Val Glu Thr Pro Ile Pro Asp Val Asn Thr Leu Ala
50 55 60

Leu Glu Asp Ile Asp Val Ser Asn Pro Phe Leu Tyr Arg Gln Gly Gln
65 70 75 80

Trp Arg Ala Tyr Phe Lys Arg Leu Arg Asp Glu Ala Pro Val His Tyr
85 90 95

Gln Lys Asn Ser Pro Phe Gly Pro Phe Trp Ser Val Thr Arg Phe Glu

ES 2 803 560 T3

	100					105					110				
Asp	Ile	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Ser	His	Asp	Leu	Phe	Ser	Ala	Glu	Pro
		115					120					125			
Gln	Ile	Ile	Leu	Gly	Asp	Pro	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Ile	Glu	Met	Phe
	130					135					140				
Ile	Ala	Met	Asp	Pro	Pro	Lys	His	Asp	Val	Gln	Arg	Ser	Ser	Val	Gln
145					150					155					160
Gly	Val	Val	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Met	Glu	Gly	Leu	Ile	Arg
				165					170					175	
Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Thr	Asp	Lys	Pro	Phe
			180					185					190		
Asn	Trp	Val	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Met	Leu	Ala
		195					200					205			
Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Pro	Tyr	Glu	Glu	Arg	His	Lys	Leu	Val	Glu	Trp
	210					215					220				
Ser	Asp	Arg	Met	Ala	Gly	Thr	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe	Ala
225					230					235					240
Asp	Glu	Asn	Ala	Met	Phe	Asp	Asp	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Arg	Ser	Phe
				245					250					255	
Ser	Arg	Leu	Trp	Arg	Asp	Lys	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Gly	Glu	Glu
			260					265					270		
Pro	Gly	Phe	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu	Gln	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys
		275					280					285			
Asp	Leu	Ile	Asn	Arg	Pro	Met	Glu	Phe	Ile	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu
	290					295					300				
Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Arg	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Gly	Leu
305					310					315					320
Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Lys
				325					330					335	
Pro	Glu	Leu	Ile	Pro	Asn	Met	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Arg	Trp	Gln	Thr
			340					345					350		

ES 2 803 560 T3

Pro Leu Ala Tyr Met Arg Arg Ile Ala Lys Gln Asp Val Glu Leu Gly
 355 360 365
 Gly Gln Thr Ile Lys Lys Gly Asp Arg Val Val Met Trp Tyr Ala Ser
 370 375 380
 Gly Asn Arg Asp Glu Arg Lys Phe Asp Asn Pro Asp Gln Phe Ile Ile
 385 390 395 400
 Asp Arg Lys Asp Ala Arg Asn His Met Ser Phe Gly Tyr Gly Val His
 405 410 415
 Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp
 420 425 430
 Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro
 435 440 445
 Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
 450 455 460
 Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495
 Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525
 Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540
 Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575
 Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590
 Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605

ES 2 803 560 T3

Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
610 615 620

Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
625 630 635 640

Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
645 650 655

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
660 665 670

Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
675 680 685

Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
690 695 700

Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
705 710 715 720

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Val Leu Arg Leu
785 790 795

<210> 43

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 43

atgccaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc 60

agggtggtgc cgatgcagct gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg 120

ES 2 803 560 T3

aagaccttcg	gccacgcgcg	accgatgccc	gaattcgttg	aaacacccat	cccggacgtt	180
aacacgctgg	cccttgagga	catcgatgtc	agcaatccgt	ttttataccg	gcagggtcag	240
tgggacgcct	atttcaaacg	gttgcgatgat	gaggcgcccg	tccattacca	gaagaacagc	300
cctttcggcc	ccttctggtc	ggtaactcgg	tttgaagaca	tcctgttcgt	ggataagagt	360
cacgacctgt	tttccgcccga	gcccgaatc	attctcgggtg	accctccgga	ggggctgtcg	420
atggaaatgt	tcatagcgat	ggatccgccg	aaacacgatg	tgcagcgag	ctcgggtgcag	480
ggagtagtgg	caccgaaaaa	cctgaaggag	atggaggggc	tgatccgatc	aaacaccggc	540
gatgtgcttg	acagcctgcc	tacagacaaa	ccctttaact	gggtacctgc	tgtttccaag	600
gaactcacag	gccgcatgct	ggcgacgctt	ctggattttc	cttacgagga	acgccacaag	660
ctggttgagt	ggtcggacag	aatggcaggt	gcagcatcgg	ccaccggcgg	ggagtttgcc	720
gatgaaaatg	ccatgtttga	cgacgcggca	gacatggccc	ggtctttctc	caggctttgg	780
cgggacaagg	aggcgcgccg	cgcagcaggc	gaggagcccg	gtttcgattt	gatcagcctg	840
ttgcagagca	acaaagaaac	gaaagacctg	atcaatcggc	cgatggagtt	tatcggtaat	900
ttgacgctgc	tcatagtgcg	cggcgcggat	acgacgcgca	actcgatgag	tgggtggcctg	960
gtggccatga	acgaattccc	cagggaattt	gaaaaattga	aggcaaaacc	ggagttgatt	1020
ccgaacatgg	tgtcggaaat	catccgctgg	caaacgccgc	tggcctatat	gcgccgaatc	1080
gccaaagcagg	atgtcgaact	ggcgggccag	accatcaaga	agggtgatcg	agttgtcatg	1140
tggtagcggt	cgggtaaccg	ggacgagcgc	aaatttgaca	accccgatca	gttcatcatt	1200
gatcgcaagg	acgcacgaaa	ccacatgtcg	ttcggctatg	gggttcaccg	ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg	ctgaactgca	actgcgcata	ctctgggaag	aaataactca	gcgttttgac	1320
aacatcgaag	tcgtcgaaga	gcccgagcgg	gtgcagtcca	acttcgtgcg	gggctattcc	1380
aggttgatgg	tcaaactgac	accgaacagt	gtactccatc	gtcatcaacc	tgtcaccatc	1440
ggcgagccgg	ccgctcgtgc	tgtgagccgc	acggtgaccg	ttgagcgtct	tgatcgcatc	1500
gccgacgatg	tccttcgcct	ggtccttcgc	gatgctggag	gtaaaaccct	cccgaacgtg	1560
acgcctggcg	ctcacatcga	cctggatctg	ggtgctctga	gccgtcagta	ttcgctctgc	1620
ggcgctccgg	atgctccgtc	gtacgaaatc	gccgtgcaact	tagatccgga	aagccgtggg	1680
ggaagccgct	atattcatga	acagctggaa	gttggaagtc	cgtgcgtat	gcgtggccca	1740
cgaaccatt	tcgccctgga	tccgggtgcg	gaacattacg	tgtttgttgc	cgggggtatc	1800
ggcatcacgc	cgggtgctggc	aatggcggat	catgcccggt	cgcgtgggtg	gtcgtacgaa	1860
ctgcattatt	gtggctgtaa	tcgtagcggg	atggcttacc	tggaaacggt	cgcgggacat	1920
ggtgaccgcg	ctgccttgca	cgtatctgaa	gaaggcacc	gcattgatct	ggcggcatta	1980
cttgctgaac	cggcgccggg	cgtgcaaata	tacgcctgcg	gtccgggccc	tttattagcg	2040

ES 2 803 560 T3

```

ggctcttgaag acgcgtctcg taattggccg gatggcgcgc ttcattgtga gcatttcact 2100
tcgagtttag ccgctttgga tccggatgtc gaacatgcct ttgatttgga gctgcgtgac 2160
tctggcctta ccgttcgctg cgagccaact cagaccgttt tagacgcttt gcgtgcgaac 2220
aatatcgacg tcccgtcgga ttgcgaagag gggctgtgtg gttcttgca agtagccgtt 2280
ctggatggcg aggttgatca ccgtgatacc gttctgacta aggccgagcg cgccgcgaat 2340
cgtcagatga tgacttgctg cagtcgtgca tgcggtgatc gtctggtcct gcgcctctaa 2400

```

<210> 44

<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 44

```

Met Pro Thr Leu Pro Arg Thr Phe Asp Asp Ile Gln Ser Arg Leu Ile
1          5          10          15

Asn Ala Thr Ser Arg Val Val Pro Met Gln Leu Gln Ile Gln Gly Leu
20        25        30

Lys Phe Leu Met Ser Ala Lys Arg Lys Thr Phe Gly Pro Arg Arg Pro
35        40        45

Met Pro Glu Phe Val Glu Thr Pro Ile Pro Asp Val Asn Thr Leu Ala
50        55        60

Leu Glu Asp Ile Asp Val Ser Asn Pro Phe Leu Tyr Arg Gln Gly Gln
65        70        75        80

Trp Asp Ala Tyr Phe Lys Arg Leu Arg Asp Glu Ala Pro Val His Tyr
85        90        95

Gln Lys Asn Ser Pro Phe Gly Pro Phe Trp Ser Val Thr Arg Phe Glu
100       105       110

Asp Ile Leu Phe Val Asp Lys Ser His Asp Leu Phe Ser Ala Glu Pro
115      120      125

Gln Ile Ile Leu Gly Asp Pro Pro Glu Gly Leu Ser Met Glu Met Phe
130      135      140

Ile Ala Met Asp Pro Pro Lys His Asp Val Gln Arg Ser Ser Val Gln
145      150      155      160

```

ES 2 803 560 T3

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

ES 2 803 560 T3

Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp
 420 425 430
 Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro
 435 440 445
 Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val
 450 455 460
 Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495
 Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525
 Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540
 Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575
 Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590
 Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605
 Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
 610 615 620
 Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
 625 630 635 640
 Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
 645 650 655
 Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala

ES 2 803 560 T3

	660		665		670
Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn					
	675		680		685
Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala					
	690		695		700
Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp					
	705		710		715
Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala					
		725		730	735
Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu					
		740		745	750
Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg					
	755		760		765
Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met					
	770		775		780
Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Val Leu Arg Leu					
	785		790		795

<210> 45

<211> 2400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 45

atgccaaacac tgcccagaac atttgacgac attcagtccc gactgattaa cgccacctcc	60
agggtggtgc cgatgcagag gcaaattcag ggactgaaat tcttaatgag cgccaagagg	120
aagaccttcg gccacgccc accgatgccc gaattcgttg aaacacccat cccggacgtt	180
aacacgctgg cccttgagga catcgatgtc agcaatccgt ttttataccg gcagggtcag	240
tggcgcgccct atttcaaacg gttgcgtgat gaggcgccgg tccattacca gaagaacagc	300
cctttcggcc ccttctggtc ggtaactcgg tttgaagaca tcctgttcgt ggataagagt	360
cacgacctgt tttccgccga gccgcaaadc attctcgggtg accctccgga ggggctgtcg	420
acggaaatgt tcatagcgat ggatccgccc aaacacgatg tgcagcgag ctcggtgcag	480
ggagtagtgg caccgaaaaa cctgaaggag atggaggggc tgatccgatc acgcaccggc	540

ES 2 803 560 T3

gatgtgcttg	acagcctgcc	tacagacaaa	ccctttaact	gggtacctgc	tgtttccaag	600
gaactcacag	gccgcatgct	ggcgacgctt	ctggattttc	cttacgagga	acgccacaag	660
ctggttgagt	ggtcggacag	aatggcaggt	acagcatcgg	ccaccggcgg	ggagtttgcc	720
gatgaaaatg	ccatgtttga	cgacgcggca	gacatggccc	ggctctttctc	caggcctttgg	780
cgggacaag	agggcgcccg	cgcagcaggc	gaggagcccc	gtttcgattt	gatcagcctg	840
ttgcagagca	acaaagaaac	gaaagacctg	atcaatcggc	cgatggagtt	tatcggtaat	900
ttgacgctgc	tcatagtcgc	cggcaacgat	acgacgcgca	actcgatgag	tgggtggcctg	960
gtggccatga	acgaattccc	cagggaatth	gaaaaattga	aggcaaaacc	ggagttgatt	1020
ccgaacatgg	tgtcggaaat	catccgctgg	caaacgccgc	tggcctatat	gcgccgaatc	1080
gccaagcagg	atgtcgaact	ggcgggccag	accatcaaga	agggtgatcg	agttgtcatg	1140
tgggtacgct	cgggtaaccg	ggacgagcgc	aaatttgaca	accccgatca	gttcatcatt	1200
gatcgcaagg	acgcacgaaa	ccacatgtcg	ttcggctatg	gggttcaccg	ttgcatgggc	1260
aaccgtctgg	ctgaactgca	actgcgcata	ctctgggaag	aaataactcaa	gcgttttgac	1320
aacatcgaag	tcgctcgaaga	gcccgagcgg	gtgcagtcca	acttcgtgcg	gggctattcc	1380
aggttgatgg	tcaaactgac	accgaacagt	gtactccatc	gtcatcaacc	tgtcaccatc	1440
ggcgagccgg	ccgctcgtgc	tgtgagccgc	acggtgaccg	ttgagcgtct	tgatcgcat	1500
gccgacgatg	tccttcgcct	ggtccttcgc	gatgctggag	gtaaaaccct	cccgaactgg	1560
acgcctggcg	ctcacatcga	cctggatctg	ggtgctctga	gccgtcagta	ttcgctctgc	1620
ggcgctccgg	atgctccgtc	gtacgaaatc	gccgtgcact	tagatccgga	aagccgtggt	1680
ggaagccgct	atattcatga	acagctggaa	gttggaagtc	cgctgcgtat	gcgtggccca	1740
cgcaaccatt	tgcgcctgga	tccgggtgcg	gaacattacg	tgtttgttgc	cgggggtatc	1800
ggcatcacgc	cgggtgctgg	aatggcggat	catgcccgtg	cgcgtgggtg	gtcgtacgaa	1860
ctgcattatt	gtggtcgtaa	tcgtagcggg	atggcttacc	tggaaacgct	cgcgggacat	1920
ggtgaccgcg	ctgccttgca	cgtatctgaa	gaaggcacc	gcattgatct	ggcggcatta	1980
cttgctgaac	cggcgccggg	cgtgcaaata	tacgcctgcg	gtccggggccg	tttattagcg	2040
ggtcttgaag	acgcgtctcg	taattggccg	gatggcgcg	ttcatgtgga	gcatttcaact	2100
tcgagtttag	ccgctttgga	tccggatgtc	gaacatgcct	ttgatttgga	gctgcgtgac	2160
tctggcctta	ccgttcgcgt	cgaagcaact	cagaccgttt	tagacgcttt	gcgtgcgaac	2220
aatatcgacg	tcccgtcgga	ttgcgaagag	gggctgtgtg	gttcttgcca	agtagccgtt	2280
ctggatggcg	aggttgatca	ccgtgatacc	gttctgacta	aggccgagcg	cgcgcggaat	2340
cgtcagatga	tgacttgctg	cagtcgtgca	tgcggtgatc	gtctggctct	gcgcctctaa	2400

<210> 46
<211> 799

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 46

```

Met  Pro  Thr  Leu  Pro  Arg  Thr  Phe  Asp  Asp  Ile  Gln  Ser  Arg  Leu  Ile
 1          5          10          15

Asn  Ala  Thr  Ser  Arg  Val  Val  Pro  Met  Gln  Arg  Gln  Ile  Gln  Gly  Leu
          20          25          30

Lys  Phe  Leu  Met  Ser  Ala  Lys  Arg  Lys  Thr  Phe  Gly  Pro  Arg  Arg  Pro
          35          40          45

Met  Pro  Glu  Phe  Val  Glu  Thr  Pro  Ile  Pro  Asp  Val  Asn  Thr  Leu  Ala
 50          55          60

Leu  Glu  Asp  Ile  Asp  Val  Ser  Asn  Pro  Phe  Leu  Tyr  Arg  Gln  Gly  Gln
65          70          75          80

Trp  Arg  Ala  Tyr  Phe  Lys  Arg  Leu  Arg  Asp  Glu  Ala  Pro  Val  His  Tyr
          85          90          95

Gln  Lys  Asn  Ser  Pro  Phe  Gly  Pro  Phe  Trp  Ser  Val  Thr  Arg  Phe  Glu
          100          105          110

Asp  Ile  Leu  Phe  Val  Asp  Lys  Ser  His  Asp  Leu  Phe  Ser  Ala  Glu  Pro
          115          120          125

Gln  Ile  Ile  Leu  Gly  Asp  Pro  Pro  Glu  Gly  Leu  Ser  Thr  Glu  Met  Phe
130          135          140

Ile  Ala  Met  Asp  Pro  Pro  Lys  His  Asp  Val  Gln  Arg  Ser  Ser  Val  Gln
145          150          155          160

Gly  Val  Val  Ala  Pro  Lys  Asn  Leu  Lys  Glu  Met  Glu  Gly  Leu  Ile  Arg
          165          170          175

Ser  Arg  Thr  Gly  Asp  Val  Leu  Asp  Ser  Leu  Pro  Thr  Asp  Lys  Pro  Phe
          180          185          190

Asn  Trp  Val  Pro  Ala  Val  Ser  Lys  Glu  Leu  Thr  Gly  Arg  Met  Leu  Ala
          195          200          205

Thr  Leu  Leu  Asp  Phe  Pro  Tyr  Glu  Glu  Arg  His  Lys  Leu  Val  Glu  Trp

```

ES 2 803 560 T3

210	215	220
Ser Asp Arg Met Ala Gly Thr Ala Ser Ala Thr Gly Gly Glu Phe Ala 225 230 235 240		
Asp Glu Asn Ala Met Phe Asp Asp Ala Ala Asp Met Ala Arg Ser Phe 245 250 255		
Ser Arg Leu Trp Arg Asp Lys Glu Ala Arg Arg Ala Ala Gly Glu Glu 260 265 270		
Pro Gly Phe Asp Leu Ile Ser Leu Leu Gln Ser Asn Lys Glu Thr Lys 275 280 285		
Asp Leu Ile Asn Arg Pro Met Glu Phe Ile Gly Asn Leu Thr Leu Leu 290 295 300		
Ile Val Ala Gly Asn Asp Thr Thr Arg Asn Ser Met Ser Gly Gly Leu 305 310 315 320		
Val Ala Met Asn Glu Phe Pro Arg Glu Phe Glu Lys Leu Lys Ala Lys 325 330 335		
Pro Glu Leu Ile Pro Asn Met Val Ser Glu Ile Ile Arg Trp Gln Thr 340 345 350		
Pro Leu Ala Tyr Met Arg Arg Ile Ala Lys Gln Asp Val Glu Leu Gly 355 360 365		
Gly Gln Thr Ile Lys Lys Gly Asp Arg Val Val Met Trp Tyr Ala Ser 370 375 380		
Gly Asn Arg Asp Glu Arg Lys Phe Asp Asn Pro Asp Gln Phe Ile Ile 385 390 395 400		
Asp Arg Lys Asp Ala Arg Asn His Met Ser Phe Gly Tyr Gly Val His 405 410 415		
Arg Cys Met Gly Asn Arg Leu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Ile Leu Trp 420 425 430		
Glu Glu Ile Leu Lys Arg Phe Asp Asn Ile Glu Val Val Glu Glu Pro 435 440 445		
Glu Arg Val Gln Ser Asn Phe Val Arg Gly Tyr Ser Arg Leu Met Val 450 455 460		

ES 2 803 560 T3

Lys Leu Thr Pro Asn Ser Val Leu His Arg His Gln Pro Val Thr Ile
 465 470 475 480
 Gly Glu Pro Ala Ala Arg Ala Val Ser Arg Thr Val Thr Val Glu Arg
 485 490 495
 Leu Asp Arg Ile Ala Asp Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Gly Lys Thr Leu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Ala His Ile Asp Leu
 515 520 525
 Asp Leu Gly Ala Leu Ser Arg Gln Tyr Ser Leu Cys Gly Ala Pro Asp
 530 535 540
 Ala Pro Ser Tyr Glu Ile Ala Val His Leu Asp Pro Glu Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Arg Tyr Ile His Glu Gln Leu Glu Val Gly Ser Pro Leu Arg
 565 570 575
 Met Arg Gly Pro Arg Asn His Phe Ala Leu Asp Pro Gly Ala Glu His
 580 585 590
 Tyr Val Phe Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Pro Val Leu Ala Met
 595 600 605
 Ala Asp His Ala Arg Ala Arg Gly Trp Ser Tyr Glu Leu His Tyr Cys
 610 615 620
 Gly Arg Asn Arg Ser Gly Met Ala Tyr Leu Glu Arg Val Ala Gly His
 625 630 635 640
 Gly Asp Arg Ala Ala Leu His Val Ser Glu Glu Gly Thr Arg Ile Asp
 645 650 655
 Leu Ala Ala Leu Leu Ala Glu Pro Ala Pro Gly Val Gln Ile Tyr Ala
 660 665 670
 Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Ala Gly Leu Glu Asp Ala Ser Arg Asn
 675 680 685
 Trp Pro Asp Gly Ala Leu His Val Glu His Phe Thr Ser Ser Leu Ala
 690 695 700
 Ala Leu Asp Pro Asp Val Glu His Ala Phe Asp Leu Glu Leu Arg Asp
 705 710 715 720

ES 2 803 560 T3

Ser Gly Leu Thr Val Arg Val Glu Pro Thr Gln Thr Val Leu Asp Ala
725 730 735

Leu Arg Ala Asn Asn Ile Asp Val Pro Ser Asp Cys Glu Glu Gly Leu
740 745 750

Cys Gly Ser Cys Glu Val Ala Val Leu Asp Gly Glu Val Asp His Arg
755 760 765

Asp Thr Val Leu Thr Lys Ala Glu Arg Ala Ala Asn Arg Gln Met Met
770 775 780

Thr Cys Cys Ser Arg Ala Cys Gly Asp Arg Leu Val Leu Arg Leu
785 790 795

REIVINDICACIONES

1. Una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa que comprende al menos el 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 38 y que tiene al menos una mutación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 9, 10, 11, 12, 13, 14, 28, 61, 119, 231, 233, 327, 413, 703, 745, 747, 749, 757, 770, 771 y 784, en donde dicha variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa cataliza la conversión de un ácido graso en un ácido graso omega-hidroxilado.
2. La variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa de la reivindicación 1, en donde la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión híbrida de CYP153A-RedRhF.
3. La variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa de la reivindicación 1, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en D9N, D9K, D10Y, I11L, Q12W, Q12R, Q12T, S13K, R14F, Q28M, Q28T, N61L, K119R, A231Y, S233L, P327D, Y413R, L703G, P745R, D747N, E749L, E757A, T770G, V771F y M784I.
4. La variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa de la reivindicación 3, en donde la expresión de dicha variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa en una célula hospedadora recombinante produce un título más alto de un ácido graso omega-hidroxilado en comparación con un título de un ácido graso omega-hidroxilado producido por la expresión de un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa de SEQ ID NO: 38.
5. La variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa de la reivindicación 3, que comprende una cualquiera de SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94 y SEQ ID NO: 96.
6. Una célula hospedadora recombinante que expresa la variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que preferentemente expresa adicionalmente un polipéptido de tioesterasa de CE 3.1.2.-, CE 3.1.1.5 o CE 3.1.2.14.
7. La célula hospedadora recombinante de la reivindicación 6, en donde la célula hospedadora recombinante produce una composición de ácido graso omega-hidroxilado con un título que es al menos un 10 % superior, al menos un 15 % superior, al menos un 20 % superior, al menos un 25 % superior o al menos un 30 % superior al título de una composición de ácido graso omega-hidroxilado producida por una célula hospedadora que expresa un polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa correspondiente, cuando se cultiva en medio que contiene una fuente de carbono.
8. La célula hospedadora recombinante de la reivindicación 7, en donde el ácido graso omega-hidroxilado se produce intracelular o extracelularmente.
9. Un cultivo celular que comprende la célula hospedadora recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.
10. El cultivo celular de la reivindicación 9, en donde el ácido graso omega-hidroxilado comprende uno o más de un ácido graso C₁₂, C₁₆ y C_{16:1} omega-hidroxilado.
11. El cultivo celular de la reivindicación 10, en donde el ácido graso omega-hidroxilado comprende
 - (a) un ácido graso C_{16:1} omega-hidroxilado insaturado; o
 - (b) un ácido graso C₁₂ omega-hidroxilado saturado.(a)
12. Un método para producir un ácido graso omega-hidroxilado que tiene un aumento en el título, que comprende:
 - i. cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 6 con una fuente de carbono; e
 - ii) recoger un ácido graso omega-hidroxilado.
13. El método de la reivindicación 12, en donde dicho ácido graso omega-hidroxilado es un ácido graso omega-hidroxilado saturado o un ácido graso omega-hidroxilado insaturado.
14. Un microorganismo recombinante para producir un derivado de ácido graso omega-hidroxilado *in vivo* cuando se cultiva en un caldo de fermentación en presencia de una fuente de carbono a partir de una materia prima renovable, comprendiendo dicho microorganismo una vía diseñada para expresar al menos dos secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende:
 - (i) una tioesterasa de CE 3.1.2.-, CE 3.1.1.5 o CE 3.1.2.14; e

(ii) una variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

5 15. El microorganismo recombinante de la reivindicación 14, en donde dicha variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa es una variante de proteína de fusión híbrida de CYP153A-RedRhF autosuficiente.

10 16. El microorganismo recombinante de la reivindicación 14, en donde dicha variante de polipéptido de fusión híbrida de CYP153A-reductasa tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94 y SEQ ID NO: 96.

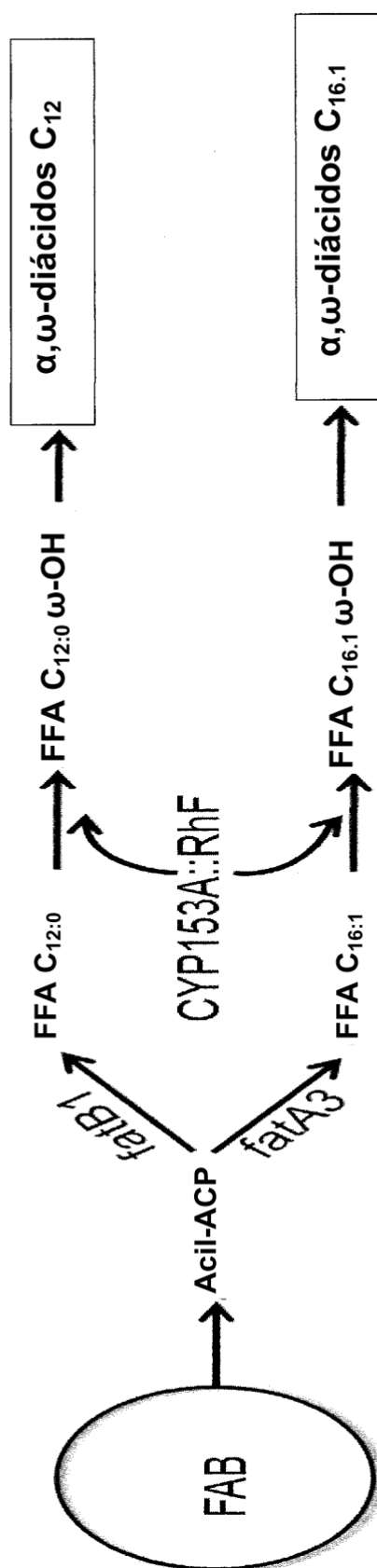


Figura 1

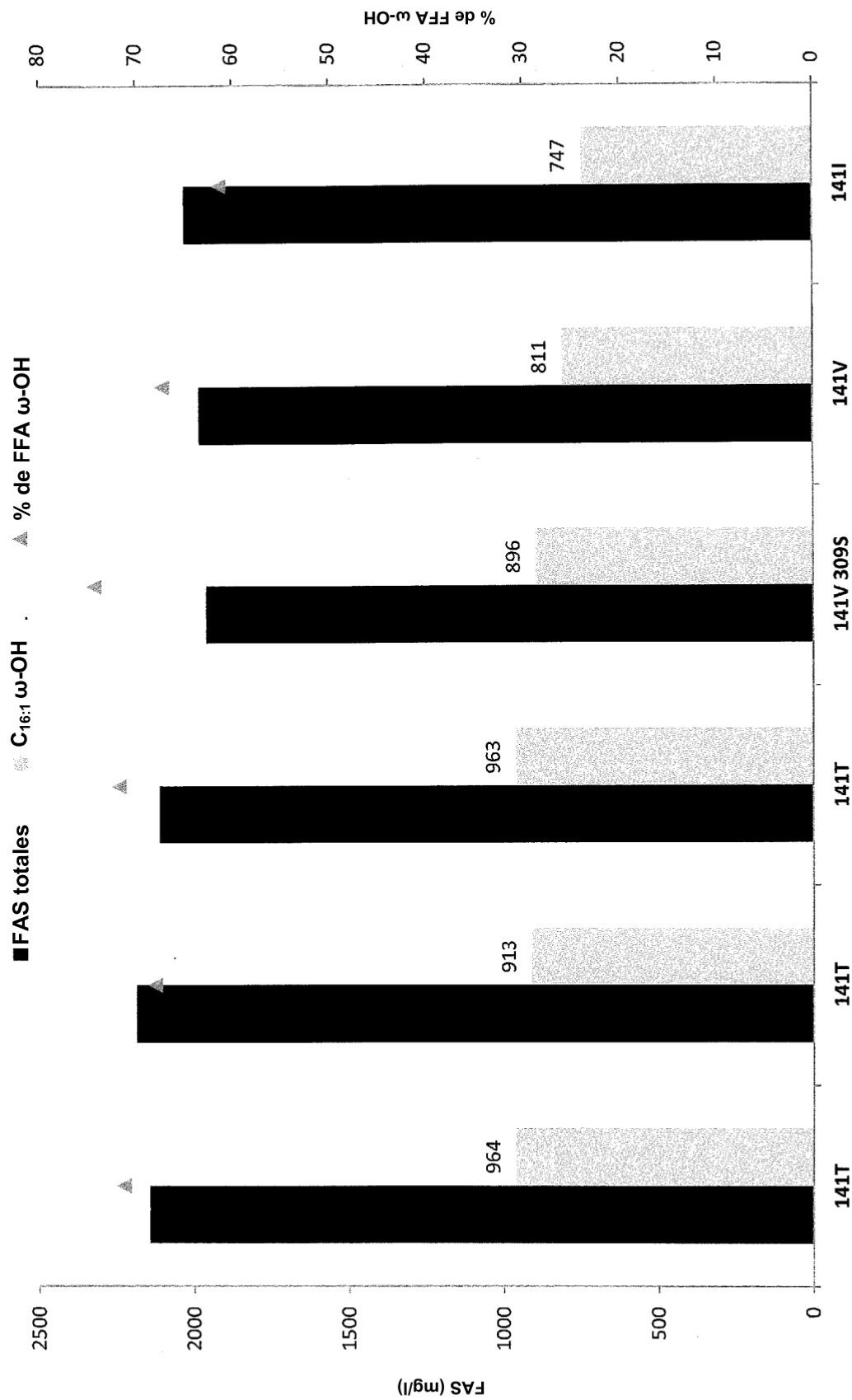


Figura 2