

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 724**

51 Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2007 E 16162913 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3103874**

54 Título: **Construcción de nuevas variantes de dextransacarasa DSR-S por ingeniería genética**

30 Prioridad:

08.02.2006 FR 0601117

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

04.01.2021

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)**

3, rue Michel Ange

75794 Paris Cedex 16, FR;

**INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (33.3%) y**

**INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES
APPLIQUÉES DE TOULOUSE (33.3%)**

72 Inventor/es:

MONSAN, PIERRE;

REMAUD-SIMEON, MAGALI;

POTOCKI-VERONESE, GABRIELLE y

MOULIS, CLAIRE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 800 724 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

Construcción de nuevas variantes de dextranasa DSR-S por ingeniería genética

5 La divulgación describe un proceso recombinante para la producción de dextranosas truncadas y/o mutadas mientras conserva su actividad enzimática y/o conserva su especificidad para sintetizar enlaces α -1,6. De manera más precisa, la divulgación describe secuencias de ácido nucleico de dextranosas truncadas o mutadas, vectores que contienen dichas secuencias de ácido nucleico y células hospedadoras transformadas mediante secuencias que codifican dextranosas truncadas o mutadas. La divulgación también describe un método para producir, de una
10 manera recombinante, dextranosas truncadas y/o mutadas que conservan su actividad enzimática y/o conservan su especificidad para sintetizar enlaces α -1,6 en el producto final y métodos para producir dextranos o isomaltoligosacáridos, en una sola etapa, con una masa molar controlada y dextranos con propiedades reológicas modificadas, especialmente en comparación con las propiedades de los dextranos obtenidos con la enzima nativa. La presente invención se refiere a una dextranasa que consiste en una secuencia que tiene el 90 %, el 95 % o el
15 98 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25 o 26, en donde la actividad enzimática de los dextranos que se forman se mantiene y en donde la dextranasa conserva su especificidad para sintetizar enlaces alfa-1,6. La presente invención también se refiere a proteínas de fusión que comprenden una etiqueta de proteína fusionada a dicha dextranasa.

20 Campo de la invención

Los dextranos son α -D-glucanos con diversas estructuras, que comprende unidades de glucosilo contiguas de las cuales más del 50 % tienen enlaces α -1,6 en la cadena principal y ramificaciones α -1,2, α -1,3 y/o α -1,4 [1]. Las enzimas que producen tales dextranos a partir de sacarosa se denominan dextranosas y pertenecen a la familia de las
25 glucosidohidrolasas 70 [2]. Durante la reacción, la fructosa derivada de la sacarosa se libera y puede actualizarse en otro lugar. Las dextranosas se producen por bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* [1].

La dextranasa (DSR-S) de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F contiene 1.527 aminoácidos [3]. Esta enzima cataliza la síntesis de homopolímeros de glucosa con más del 95 % de enlaces α -1,6. La producción de dextrano puede redirigirse hacia la de oligosacáridos o conjugados glucosilados mediante la adición de un aceptor
30 adecuado a la mezcla de reacción [4].

El número de aplicaciones industriales para dextranos y derivados de dextrano está aumentando, en particular para dextranos con un tamaño específico. Los dextranos con un tamaño en el intervalo de 70.000 a 100.000 Da se usan, por ejemplo, como sustituto de plasma [5, 31]. Además, el dextrano de 40.000 Da se usa para mejorar el flujo
35 sanguíneo, lo más probablemente reduciendo la viscosidad de la sangre e inhibiendo la agregación eritrocitaria [6,8]. Después de la sulfatación, los dextranos más pequeños de aproximadamente 10.000 Dalton, por ejemplo, se usan como transportadores de hierro [7] o anticoagulantes [8]. Esos compuestos pueden tener propiedades antiviricas [9, 10].

Además, los derivados de dextrano reticulados se han usado durante mucho tiempo en el campo de la separación molecular; los soportes de cromatografía con el nombre comercial Sephadex® se han vendido desde 1961 [6].

45 Por otra parte, la Unión Europea ha aprobado recientemente el uso de dextrano como ingrediente alimentario en productos de panadería cuando contienen más del 95 % de enlaces α -1,6 y tienen una masa molar de más de 2×10^6 Da [15].

La dextranasa también puede producir isomalto-oligosacáridos (IMO) a través de una reacción aceptora. Las reaccionesceptoras llevadas a cabo por las glucanosas consisten en una transferencia de restos glucosilo desde la sacarosa a otras moléculas añadidas al medio de reacción. Es de creciente interés comercial, particularmente
50 en Japón, donde la demanda de isomalto-oligosacáridos representa aproximadamente quince mil toneladas por año [11]. Tales IMO pequeños (DP 2 a 6) se usan en artículos de panadería, para bebidas, en el sake, en condimentos, en confitería y como edulcorantes anticariogénicos. También se ha demostrado que dichos IMO tienen propiedades prebióticas que son útiles con respecto a la flora intestinal y/o vaginal [12,13]. Estas propiedades parecen variar con el tamaño de las IMO y se ven favorecidas por los altos grados de polimerización [14].

La única fuente comercial y habitual de dextranos consiste en cultivar *L. mesenteroides* NRRL B-512F con sacarosa, conduciendo a la formación de polímeros de alta masa molar de aproximadamente 10^8 Da. La síntesis directa de dextranos más pequeños de 10000 a 100000 Da es actualmente imposible. Los dextranos se producen actualmente
60 de forma convencional por hidrólisis ácida de polímeros nativos de alta masa molar, seguido de fraccionamiento usando disolventes orgánicos. Esta segunda etapa, sin embargo, es famosa por sus bajos rendimientos [19].

Desde un punto de vista comercial, los IMO de DP 2 a 6 no se producen por una reacción aceptora con dextranasa DSR-S y glucosa debido a los bajos rendimientos de reacción, sino a partir de hidrolizados de almidón y una mezcla de α -amilasas y glucosidasas [11].

Monchois et al [16] describen deleciones carboxi-terminales de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F y concluyen que el papel del dominio C-terminal es facilitar la transferencia de dextrano y oligosacáridos más allá del sitio activo.

5 La patente de Estados Unidos US-A-5.229.277 describe un proceso para producir polímeros de dextrano que tienen una masa molar baja homogénea usando *Leuconostoc mesenteroides* y un microorganismo mutante de *Lipomyces starkeyi* ATCC 74054, que es una levadura que tiene actividad dextransasa, una enzima específica para la hidrólisis de enlaces α -1,6 de dextrano. Ese método requiere condiciones de cultivo particulares y una duración y temperatura reguladas con precisión de tal manera que la actividad de dextransasa reduzca la masa molar de los dextranos. Los polímeros de dextrano producidos por ese método tienen una masa molar en el intervalo de 40.000 y 150.000 Da.

10 Argüello-Morales et al., Antonie Van Leeuwenhoek, vol 87 n.º 2 (febrero de 2005), 131-141 desvela dos formas activas de dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512 que tienen pesos moleculares de 155 y 129 kDa. Estas dextransacarassas surgen de la escisión proteolítica de un precursor de 170 kDa y se comportan en soluciones como fluidos newtonianos.

15 Lo anterior muestra que existe la necesidad de la producción de dextranos con una masa molar de aproximadamente 10.000 a 100.000 Da usando un método más rápido con un mejor rendimiento, que en particular no requiere hidrólisis ácida ni fraccionamiento.

20 La divulgación describe dextransacarassas producidas de manera recombinante, que están truncadas y/o mutadas, mientras conservan su actividad enzimática y/o conservan su especificidad para sintetizar enlaces α -1,6. La presente invención se refiere a variantes truncadas de dextransacarasa que producen dextranos con una masa molar controlada. De manera más precisa, conservan la especificidad de unión de DSR-S nativo y/o conservan su especificidad para sintetizar enlaces α -1,6 y, empezando a partir de sacarosa, produce dextranos de alta masa molar con propiedades de textura interesantes y/o dextranos e IMO con una masa molar controlada.

25 La divulgación también describe proporcionar secuencias de ácido nucleico de dextransacarasa truncada y/o mutada, vectores y células hospedadoras transformadas por dichos vectores y secuencias de aminoácidos de dextransacarassas truncadas y/o mutadas.

30 En particular, como se hará evidente a partir de los Ejemplos, determinadas dextransacarassas producen polímeros con propiedades de textura interesantes, es decir, sustancialmente superiores a las del polímero producido por la enzima nativa; otras producen dextranos e isomalto-oligosacáridos con una masa molar controlada. La isomaltosa se produce por al menos una dextransacarasa truncada y mutada.

35 Otros aspectos de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y Ejemplos o implementaciones preferidos.

40 Sumario de la invención

45 La divulgación describe una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en o que consiste en una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la Figura 1 (SEQ ID NO: 1), una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la Figura 3 (SEQ ID NO: 3), una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la Figura 4 (SEQ ID NO: 4), una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la Figura 5 (SEQ ID NO: 5), una secuencia complementaria de una de las secuencias con SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 o una secuencia que hibrida con una secuencia con SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 en condiciones de hibridación rigurosas, con la condición de que conserve la actividad enzimática de dextransacarasa.

50 La divulgación también describe secuencias de nucleótidos de dextransacarasa que consisten esencialmente en o que consisten en una secuencia de nucleótidos seleccionada del fragmento de SEQ ID NO: 1 de la posición 373 a la posición 4269 (SEQ ID NO: 17), el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 2 de la posición 373 a la posición 4005 (SEQ ID NO: 18), el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 3 desde la posición 373 a la posición 3408 (SEQ ID NO: 19), el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 4 desde la posición 373 a la posición 3018 (SEQ ID NO: 20) y el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 5 desde la posición 373 a la posición 4269 (SEQ ID NO: 21).

55 También describe secuencias de nucleótidos que consisten esencialmente en una secuencia de nucleótidos seleccionada de una secuencia de nucleótidos complementaria del fragmento de SEQ ID NO: 1 del nucleótido en la posición 373 a aquel en la posición 4269, una secuencia de nucleótidos complementaria del fragmento de SEQ ID NO: 2 del nucleótido en la posición 373 a aquel en la posición 4005, una secuencia de nucleótidos complementaria del fragmento de SEQ ID NO: 3 del nucleótido en la posición 373 a aquel en la posición 3408, una secuencia de nucleótidos complementaria del fragmento de SEQ ID NO: 4 del nucleótido en la posición 373 a aquel en la posición 3018 y una secuencia de nucleótidos complementaria al fragmento de SEQ ID NO: 5 del nucleótido en la posición 373 a aquel en la posición 4269.

También describe secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos seleccionada del fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 1 desde la posición 373 a la posición 4269, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 2 desde la posición 373 a la posición 4005, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 3 desde la posición 373 a la posición 3408, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 4 desde la posición 373 a la posición 3018 y el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 5 desde la posición 373 a la posición 4269, con la condición de que conserve la actividad enzimática de dextranasa y dichas secuencias de nucleótidos que se hibridan con ellas tienen el mismo número de nucleótidos e hibridan sobre la longitud completa del fragmento.

La divulgación también describe secuencias de nucleótidos que codifican una proteína que consiste esencialmente en o que consiste en aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 6 a 10 o 22 a 26.

La divulgación también describe vectores, por ejemplo plásmidos, y células hospedadoras transformadas por dichos vectores y que contienen dicha secuencia de ácidos nucleicos de dextranasa troncada y/o mutada, en particular las variantes de los Ejemplos.

La divulgación describe una proteína codificada por dicha secuencia de nucleótidos de dextranasa troncada y/o mutada seleccionada del fragmento de SEQ ID NO: 6 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1423 (SEQ ID NO: 22), el fragmento de SEQ ID NO: 7 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1335 (SEQ ID NO: 23), el fragmento de SEQ ID NO: 8 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1136 (SEQ ID NO: 24), el fragmento de SEQ ID NO: 9 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1006 (SEQ ID NO: 25) y el fragmento de SEQ ID NO: 10 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1423 (SEQ ID NO: 26).

Además, la presente invención se refiere a una dextranasa troncada y/o mutada que consiste en una secuencia que tiene el 90 %, el 95 % o el 98 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del fragmento de SEQ ID NO: 6 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1423 (SEQ ID NO: 22), el fragmento de SEQ ID NO: 7 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1335 (SEQ ID NO: 23), el fragmento de SEQ ID NO: 8 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1136 (SEQ ID NO: 24), el fragmento de SEQ ID NO: 9 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1006 (SEQ ID NO: 25) y el fragmento de SEQ ID NO: 10 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1423 (SEQ ID NO: 26).

La divulgación describe la preparación de una dextranasa mutada y/o troncada mediante el cultivo de células hospedadoras que contienen una dextranasa troncada y/o mutada en condiciones que permiten la expresión de una dextranasa, y aislar dicha dextranasa del medio de cultivo.

La divulgación también describe un método para producir dextranos y/o isomalto-oligosacáridos (IMO) con una masa molar controlada controlada haciendo reaccionar una dextranasa mutada y/o troncada descrita en el presente documento con sacarosa y opcionalmente un aceptor, para obtener dichos dextranos o IMO con una masa molar controlada, incluyendo isomaltosa.

También se describe en el presente documento un método para la producción directa de IMO esencialmente a partir de sacarosa. El término "esencialmente" como se usa en el presente documento significa que no es necesario que el aceptor se emplee en la reacción.

Los dextranos de alta masa molar de la invención tienen propiedades reológicas modificadas en comparación con aquellas del dextrano sintetizado por una enzima nativa, en particular de naturaleza no newtoniana, fibrosa y/o gelificante.

Finalmente, la divulgación describe composiciones que comprenden dextranos obtenidos usando dichas dextranasas y el uso de dichas dextranasas para la producción de dextranos e isomalto-oligosacáridos con una masa molar controlada en el intervalo de 342 y 10^9 Da. De manera más precisa, puede producir (i) isomaltosa (342 Da), (ii) isomalto-oligosacáridos de 342 a 5.000 Da, (iii) dextranos con un tamaño controlado de 1.300 a 52.000 Da, más precisamente de 5.000 a 22.000 Da y centrado alrededor de 10.000 Da, (iv) dextranos con un tamaño controlado de 7.000 a $1,7 \times 10^5$ Da, más precisamente entre 22.000 y 70.000 Da, centrado alrededor de 40.000 Da.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de una dextranasa DSR-S vardel $\Delta 4N$ troncada con una etiqueta de tiorredoxina en la posición terminal 5' de la secuencia y 6 etiquetas histidina en la posición terminal 3' de la secuencia, así como brazos espaciadores entre las etiquetas de proteína y la secuencia que codifica dextranasa.

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos para una dextranasa DSR-S vardel $\Delta 3$ troncada con una etiqueta de tiorredoxina en la posición terminal 5' de la secuencia y 6 etiquetas histidina en la posición terminal 3' de la secuencia y brazos espaciadores entre las etiquetas de proteína y la secuencia que codifica dextranasa.

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos para una DSR-S vardel Core truncada con una etiqueta de tiorredoxina en la posición terminal 5' de la secuencia y 6 etiquetas histidina en la posición terminal 3' de la secuencia y brazos espaciadores entre las etiquetas de proteína y la secuencia que codifica dextranosa.

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos y nucleótidos para una DSR-S Core ΔA truncada con una etiqueta de tiorredoxina en la posición terminal 5' de la secuencia y 6 etiquetas histidina en la posición terminal 3' de la secuencia y brazos espaciadores entre las etiquetas de proteína y la secuencia que codifica para dextranosa.

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos y nucleótidos para una DSR-S vardel $\Delta 4N$ SEV663YDA mutante con una etiqueta de tiorredoxina en la posición terminal 5' de la secuencia y 6 etiquetas histidina en la posición terminal 3' de la secuencia y brazos espaciadores entre las etiquetas de proteína y la secuencia que codifica dextranosa.

La Figura 6 es una representación en diagrama de las variantes truncadas de DSR-S y su actividad relativa. Los cuatro dominios diferentes (i) a (iv) de DSR-S corresponden a: (i) péptido señal, (ii) región variable; (iii) dominio catalítico y (iv) dominio C-terminal, así como las unidades de repetición A, C y N (en las cajas sombreadas) ubicadas de acuerdo con Monchois et al., 1998 [16].

La Figura 7 (A, B) muestra transferencias Western anti-tiorredoxina (A) y anti-6xHis (B) llevadas a cabo en una DSR-S vardel $\Delta 4N$ producida por *E. coli* TOP10 a 23 °C.

La Figura 8 muestra un gel de electroforesis después de teñir las proteínas con azul coloidal en extractos de DSR-S vardel $\Delta 4N$ durante la purificación de afinidad en resina de níquel (Probond, Invitrogen). El carril 1 corresponde al sobrenadante del sometimiento a ultrasonidos de *E. coli* TOP10 al final del cultivo; el carril 2 corresponde al efluente obtenido después de unir las proteínas etiquetadas 6xHis en la resina, el carril 3 corresponde a la fracción de elución y el carril 4 corresponde a la fracción de elución después de eliminar los agregados.

La Figura 9 muestra los perfiles de elución obtenidos por HPSEC de dextranos producidos por la preparación de a) DSR-S nativo a partir de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, b) DSR-S recombinante completa, c) DSR-S vardel $\Delta 4N$ antes de la purificación y d) DSR-S vardel $\Delta 4N$ purificada. El pico 1 corresponde al polímero de alta masa molar (HMW), el pico 2 a fructosa, glucosa y oligosacáridos con un DP de menos de 7, no separados por el sistema. Entre esos dos picos, las perturbaciones de la línea base reflejan la presencia de dextranos con un tamaño intermedio (entre 10^3 y 10^7 Da) en una concentración muy baja.

La Figura 10A-E muestra los espectros obtenidos por RMN de protón en dextranos sintetizados por A) DSR-S nativa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, B) la DSR-S recombinante completa, C) DSR-S vardel $\Delta 4N$ antes de la purificación y D) DSR-S vardel $\Delta 4N$ después de la purificación. El espectro E) es un espectro de carbono 13 del dextrano sintetizado por DSR-S vardel $\Delta 4N$ purificada.

La Figura 11 corresponde al cromatograma HPAEC-PAD de los productos de digestión usando endodextranasa (dasa) de los cuatro dextranos sintetizados por DSR-S nativa, DSR-S recombinante completa y DSR-S vardel $\Delta 4N$, antes y después de la purificación.

La Figura 12 muestra el comportamiento reológico de cuatro dextranos sintetizados por DSR-S nativa (1) antes y (2) después del cizallamiento, DSR-S recombinante completa (3) antes y (4) después de la aplicación de una segunda serie de esfuerzos de cizalla, DSR-S vardel $\Delta 4N$ (6) antes y (7) después de la aplicación de una segunda serie de esfuerzos de cizalla, DSR-S vardel $\Delta 4N$ purificada (5) donde A) representa la medición del flujo de viscosidad, B) mediciones de viscosidad en modo dinámico (oscilaciones entre 0 y 10 Pa), antes de determinar los módulos de conservación G' y de disipación de energía G'' para los dextranos sintetizados por las preparaciones de DSR-S vardel $\Delta 4N$ no purificadas (\circ y \bullet ; comportamiento de tipo de solución, $G' < G''$; al 5 % de deformación) y preparación purificada (\square y \blacksquare ; comportamiento tipo gel $G' > G''$; 0,4 % de deformación).

La Figura 13 muestra un cromatograma HPAEC-PAD de productos sintetizados por el mutante DSR-S vardel $\Delta 4N$ SEV663YDA con 100 g/l de sacarosa sola (A) o por reacción aceptora con 100 g/l de sacarosa y 50 g/l de glucosa (B). El símbolo G significa glucosa, F: fructosa, I₂: isomaltosa, I₃: isomaltotriosa, N/M: nigerosa o maltosa (no separados por el sistema HPAEC-pad) y el símbolo "?" corresponde a productos con una estructura desconocida.

La Figura 14 muestra el cromatograma HPSEC de dextranos sintetizados por DSR-S vardel $\Delta 3$ a 20 °C y 10 °C. Las flechas corresponden a los tiempos de retención de dextranos comerciales de 2×10^6 Da, 70.000 y 10.000 Da que sirvieron como referencias.

La Figura 15 muestra el cromatograma HPSEC de dextranos sintetizados a 20 °C con 100 g/l de sacarosa y con 1 U/ml de (1) DSR-S vardel $\Delta 4N$, (2) DSR-S vardel $\Delta 3$, (3) DSR-S vardel Core y (4) DSR-S Core ΔA y el perfil de elución (5) de un dextrano comercial de 10.000 Da (Sigma).

La Figura 16 muestra el perfil HPAEC-PAD de dextranos sintetizados a 20 °C con 100 g/l de sacarosa y con 1 U/ml de DSR-S vardel $\Delta 4N$ (1), DSR-S vardel $\Delta 3$ (2), DSR-S vardel Core (3) y DSR-S vardel Core ΔA (4).

La Figura 17 muestra el perfil HPAEC-PAD (A) y la distribución (B) de los IMO producidos por una reacción aceptora a 20 °C con las variantes DSR-S vardel $\Delta 4N$ (1), DSR-S vardel $\Delta 3$ (2), DSR-S vardel Core (3) y DSR-S vardel Core ΔA (4). G: glucosa; F: fructosa; L: leucrosa; T: trehalulosa; I₂ a I₂₀: isomalto-oligosacáridos con DP 2 a DP 20. El inserto de la Figura B corresponde a un alargamiento de los IMO de DP de 15 a 27.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La frase "enzima que tiene actividad enzimática de dextranosa" como se usa en el presente documento significa una enzima que cataliza la conversión de sacarosa en oligósidos y poliósidos que comprenden más del 50 % de unidades de glucosilo unidas por enlaces α -1,6 con un tamaño en el intervalo de 342 y 10^9 Da, y más particularmente dextranos e isomalto-oligosacáridos que comprenden más del 95 % de enlaces α -1,6. Esta conversión puede tener

lugar en ausencia de aceptores externos tales como maltosa, glucosa, isomaltosa o fructosa o isomalto-oligosacáridos. Maltosa, isomaltosa y glucosa son los aceptadores preferidos descritos en el presente documento. La actividad enzimática de las dextranacararas de la presente invención puede medirse como se describe en los Ejemplos.

5 Los términos "nucleótidos", "polinucleótidos", "ácidos nucleicos" y "oligonucleótidos", como se usan aquí son intercambiables e incluyen, sin estar limitados a los mismos, secuencias de ARN, ADN, ADN/ARN que comprenden más de un nucleótido en una sola cadena o en forma de una doble cadena. Las secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento pueden prepararse por cualquier método conocido incluyendo, sin estar limitados a los mismos, cualquier método de síntesis recombinante y cualquier método de generación *ex vivo*, así como combinaciones de esos métodos.

10 El término "truncado" como se usa en el presente documento significa que al menos uno de los extremos N- o C-terminales de la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos se ha acortado. Ese acortamiento puede llevarse a cabo usando enzimas de restricción, enzimas proteolíticas o sintéticamente, incluyendo por amplificación específica de secuencias de nucleótidos, en particular por PCR.

15 La frase "dextranacarasa purificada" como se usa aquí significa una dextranacarasa que tiene una sola forma activa de dextranacarasa en las preparaciones, que tiene un grado de pureza proteica de al menos el 70 % o el 85 % o el 95 %.

20 La frase "propiedad de texturizado original interesante" como se usa aquí significa las propiedades reológicas de los dextranos de la invención que, en comparación con los dextranos sintetizados por enzimas nativas en las mismas condiciones, por ejemplo, exhiben un comportamiento no newtoniano, especialmente un comportamiento de tipo gel o fibroso. Un "polímero tipo gel" se caracteriza aquí por mediciones reológicas en modo dinámico, detectando los módulos de conservación de energía (G') y de disipación de energía (G''). Para un gel, G' es mayor que G'' en todo el intervalo de frecuencia estudiado, como será evidente en el Ejemplo 5. El carácter fibroso puede identificarse a simple vista. Los dextranos fibrosos de la invención cambian del comportamiento del tipo solución al comportamiento del tipo gel después de la aplicación de una segunda serie de esfuerzos de cizalla, como también se verá en el Ejemplo 5.

25 30 Las siguientes abreviaturas usadas aquí tienen los siguientes significados: DSR-S para dextranacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F; DP para el grado de polimerización; HMW para "masa molar alta", IMW para "masa molar intermedia", siendo los polímeros IMW polímeros altamente polidispersos con tamaños en el intervalo de 1.000 a 10^7 Da, donde la separación por HPSEC es difícil debido a su baja concentración. Los polímeros LMW (masa molar baja) son, de acuerdo con la invención, una población que es mucho más alta y fácil de detectar entre 750 y 70.000 Da, centrada alrededor de 10.000 Da o en el intervalo de 2.000 a $1,7 \times 10^5$ Da y se centró alrededor de 40.000 Da.

35 La frase "dextrano de 10.000 Da" como se usa aquí significa una población de dextrano con un tamaño en el intervalo de 1.300 a 52.000 Da, más precisamente entre 5.000 y 22.000 Da y centrado a la altura del pico en aproximadamente 10.000 Da. Durante la caracterización, la base del pico de elución obtenido por permeación de gel estaba en el intervalo de 1.300 a 52.000 Da, el intervalo de masa molar estimado a la altura media del pico de elución estuvo en el intervalo de 5.000 a 22.000 Da y el pico se centró a la altura del pico a aproximadamente una masa de 10.000 Da. Cuando la masa molar se expresó a la altura media del pico, al menos el 50 % de la población de dextrano cayó dentro del intervalo indicado.

40 45 La frase "dextrano de 40.000 Da" como se usa aquí significa una población de dextrano con un tamaño en el intervalo de 7000 a $1,7 \times 10^5$ Da, más precisamente entre 22.000 y 70.000 Da y centrado a la altura del pico en aproximadamente 40.000 Da. Durante la caracterización, la base del pico de elución obtenido por permeación de gel estaba en el intervalo de 7.000 a $1,7 \times 10^5$ Da, el intervalo de masa molar estimado en la altura media del pico de elución estaba en el intervalo de 22.000 a 70.000 Da y el pico estaba centrado en una masa de aproximadamente 40.000 Da. Cuando la masa molar se expresó a la altura media del pico, al menos el 50 % de la población de dextrano cayó dentro del intervalo indicado.

IMO significa isomalto-oligosacáridos.

55 La frase "que consiste esencialmente en" cuando se usa en conexión con ácidos nucleicos o aminoácidos como se usa aquí significa que otros ingredientes menores o moléculas pueden estar presentes con las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. La secuencia de ácido nucleico tiene exactamente la misma longitud que se indica en el número de identificación de secuencia, pero puede tener de 3 a 12 nucleótidos adicionales en los N- y C-terminales. Igualmente, la secuencia de aminoácidos que tiene la misma longitud exacta como se indica en el número de identificación de secuencia, pero pueden añadirse de 1 a 4 aminoácidos adicionales en los N- y C-terminales. Estos aminoácidos adicionales no tienen efecto sobre la actividad enzimática.

60 La divulgación describe ácidos nucleicos que codifican una dextranacarasa truncada o una dextranacarasa mutada, una secuencia complementaria a todas o parte de esas secuencias o una secuencia que hibrida en condiciones rigurosas con una de las secuencias anteriores con la condición de que se mantenga la actividad enzimática de dextranacarasa. Debe apreciarse que las secuencias de nucleótidos que se hibridan con ellas tienen el mismo número

ES 2 800 724 T3

de nucleótidos e hibridan en toda la longitud del fragmento.

La frase "condiciones de hibridación rigurosas" como se usa aquí significa condiciones descritas por Sambrook et al., Molecular Cloning Manual, 3a edición (2001), es decir, como un ejemplo, las siguientes condiciones: tampones de hibridación: SSC 2 X, solución de Denhardtts 10X (Ficoll 400 y PEG y BSA, relación 1:1:1), SDS al 0,1 %, EDTA 5 mM, Na₂HPO₄ 50 mM, ADN de esperma de arenque 250 mg/ml, ARN-t 50 mg/ml o tampón fosfato sódico 0,25 M con un pH de 7,2, EDTA 1 mM, SDS al 7 %; Temperatura de hibridación: 60 °C; Tampón de lavado: SSC 2 X, SDS al 0,1 %; Temperatura de lavado: 60 °C.

Las moléculas de ácido nucleico que hibridan en condiciones rigurosas con los ácidos nucleicos descritos en el presente documento en principio pueden codificar dextran-sacarosas de cualquier microorganismo tales como bacterias, bacterias gram positivas y, bacterias de los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* o *Lactobacillus*.

La divulgación describe ácidos nucleicos que codifican proteínas de dextran-sacarasa que tienen al menos el 70 % o el 80 % o el 90 % de identidad de secuencia con aquellos de las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO 17 a 21, siempre que la proteína codificada por dichas secuencias tenga actividad enzimática de dextran-sacarasa.

La divulgación describe secuencias de nucleótidos que codifican una proteína que consiste esencialmente en o que consiste en aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 6 a 10 o 22 a 26.

Como se describe en el presente documento, las secuencias complementarias a las secuencias descritas en el presente documento o secuencias que hibridan con dichas secuencias en condiciones rigurosas, con la condición de que se mantenga la actividad enzimática de dextran-sacarasa, también se describen en el presente documento.

Las derivaciones de las secuencias de nucleótidos básicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, donde las secuencias se seleccionan del fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 1 de la posición 373 a la posición 4269, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 2 desde la posición 373 a la posición 4005, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 3 desde la posición 373 a la posición 3408, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 4 desde la posición 373 a la posición 3018 y el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 5 de un nucleótido en la posición 373 a la posición 4269, las secuencias complementarias a dichas secuencias o secuencias que hibridan con dichas secuencias en condiciones rigurosas con la condición de que se mantenga la actividad enzimática de dextran-sacarasa, pueden producirse por delección, sustitución, inserción o recombinación, por ejemplo; siendo los métodos para llevar a cabo dichas etapas y transformaciones bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, por Sambrook et al., citado anteriormente.

Debe entenderse aquí que si tiene lugar cualquier delección, sustitución, inserción o recombinación de cualquiera de las secuencias citadas anteriormente, las proteínas codificadas por las secuencias deben mantener su actividad enzimática de dextran-sacarasa. Por lo tanto, 1 a 132, preferentemente de 2 a 60 nucleótidos, más preferentemente de 15 a 36 nucleótidos y aún más preferentemente de 12 a 27 nucleótidos pueden modificarse, por ejemplo, por delección, sustitución, inserción o recombinación. Como se describe en el presente documento, el 90 %, preferentemente el 95 % de los nucleótidos permanecen sin cambios.

La actividad enzimática de dextran-sacarasa puede medirse, como se describe en la sección de métodos y en los Ejemplos de la presente solicitud.

Los oligonucleótidos que pueden usarse como sonda o cebador son, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 5 o las secuencias de nucleótidos seleccionadas del fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 1 de la posición 373 a la posición 4269, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 2 desde la posición 373 a la posición 4005, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 3 desde la posición 373 a la posición 3408, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 4 desde la posición 373 a la posición 3018 y el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 5 de un nucleótido en la posición 373 a la posición 4269.

La longitud de las sondas y cebadores puede variar dependiendo de sus aplicaciones. En general, deben tener al menos 25 nucleótidos y pueden comprender todas las secuencias de dextran-sacarasa descritas, tales como 3.896 nucleótidos. La longitud también puede variar para estar en el intervalo de 25 a 150 nucleótidos, 25 y 800 nucleótidos o 25 y 3000 nucleótidos, por ejemplo.

Los cebadores generalmente comprenden de 18 a 25 nucleótidos de longitud, pero también pueden ser más largos, dependiendo de la aplicación prevista. Algunos ejemplos de cebadores que pueden usarse son:

GGC TTC TCT GGT GTG ATT (SEQ ID NO:11)
GAT CTG TCA GAA ACT GGC (SEQ ID NO:12)
ACA CAA CAA GTT AGC GGC (SEQ ID NO: 13)
CCA GAT ACT AAC TTG AGT (SEQ ID NO: 14)

TTC ATT GAT GCA GAC GGG (SEQ ID NO:15)
CAC GAC TAC GAC GCG CAA (SEQ ID NO:16)

- 5 Nótese que los cebadores en las posiciones terminales 5' y 3' de los nucleótidos codifican la dextranacarasa (SEQ ID NO: 11 a 15) y el lado 5' y 3' de la secuencia mutante (SEQ ID NO: 16). Sin embargo, una persona experta puede usar cada una de estas secuencias para producir cebadores o sondas usando nucleótidos consecutivos. Adicionalmente, estas secuencias de nucleótidos que se usan como sonda pueden etiquetarse con radiactividad, etiquetado enzimático, etiquetado fluorescente, en particular.
- 10 Para diseñar genéticamente la célula procariota o eucariota, los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o una porción de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden introducirse en plásmidos que permiten la mutagénesis o modificación de secuencias mediante recombinación de secuencias de nucleótidos. Los métodos convencionales que usan estas técnicas son conocidos por los expertos y se han descrito por Sambrook et al., mencionado anteriormente, en particular. Los fragmentos de ADN también pueden conectarse entre sí mediante
- 15 adaptadores o enlazadores y pueden usarse enzimas de restricción adecuadas para retirar ciertas secuencias de ADN. Métodos tales como la mutagénesis, la restricción después de la restauración de cebadores o ligaduras puede usarse para obtener la secuencia deseada con las inserciones deleciones o sustituciones apropiadas o necesarias o deseables.
- 20 Adicionalmente, pueden fijarse etiquetas bien definidas que codifican ácidos nucleicos a los extremos N- o C-terminales de las secuencias de ácido nucleico. Pueden ser péptidos tales como poli-His, epítipo c-myc o etiqueta HA o proteínas pequeñas tales como GST bacteriana, MBP (proteína de unión a maltosa), tiorredoxina, β-galactosidasa, VSV-glicoproteína y similares.
- 25 Los ácidos nucleicos particulares que codifican otras etiquetas de proteínas son etiqueta His, etiqueta T7, etiqueta S, un péptido "bandera", trpE, avidina/estreptavidina, proteína estafilocócica A o G, dihidrofolato reductasa, dominios de unión a celulosa, policisteína, polifenilalanina y similares, que también pueden usarse.
- 30 Un ácido nucleico que codifica una tiorredoxina puede fusionarse con la secuencia de ácido nucleico N-terminal. Un ácido nucleico que codifica una etiqueta 6xHis se fusiona al extremo 3' de las secuencias de ácido nucleico.
- Los ácidos nucleicos pueden enlazarse a una unidad de transcripción que comprende (1) elementos de regulación de la expresión génica tales como promotores y amplificadores y (2) una secuencia codificante o estructural que se transcribe en un ARNm y se traduce en la proteína correspondiente y (3) señales de iniciación y terminación
- 35 apropiadas.
- Se conocen varias secuencias de control de expresión adecuadas en la técnica. Los métodos generales para expresar la proteína recombinante también son conocidos y se ejemplifican en el documento por R Kaufman, Methods in Enzymology 185, 537-566 (1990) [17].
- 40 Las regiones promotoras que pueden usarse en los vectores descritos en el presente documento incluyen lacL, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, tre y ara.
- 45 La divulgación también describe vectores, en particular plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores que son conocidos en el campo de la ingeniería genética y que comprenden las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento, siendo dichos vectores plásmidos y seleccionados de DSR-S vardel Δ4N, DSR-S vardel Δ3, DSR-S vardel Core, DSR-S Core ΔA y DSR-S vardel Δ4N SEV663YDA.
- 50 Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden expresarse en células procariotas o eucariotas. Los ejemplos no limitantes de tales células que pueden citarse son células VERO, células HELA tales como ATCC N.º CCL3, líneas celulares CHO tales como ATCC CCL61, células COS tales como COS-7 y células ATCC N.º CR: 1650, W138, BHK, HepG2, 3T3 tales como ATCC N.º CRL6361, A549, PC12, K562, células 293, células Sf9 tales como ATCC N.º CRL 1711, células Cv1 tales como ATCC N.º CCL70 y células JRKAT tales como ATCC Tib152.
- 55 Las células no limitantes que pueden usarse en el presente documento incluyen cepas de las células hospedadoras procariotas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* o cepas del género *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* o cepas de células hospedadoras eucariotas tales como los parásitos *Apicomplexan* (*Plasmodia*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidia*), *Leishmania* o *Trypanosoma*.
- 60 Pueden usarse otras células apropiadas en el presente documento y en particular incluyen células de levadura tales como *Saccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *pombe*, *Pichia pastoris* y células eucariotas (células vegetales, células CHO y similares).
- 65 Las células usadas para expresar los ácidos nucleicos descritos en el presente documento son *Escherichia coli* y cepas seleccionadas, por ejemplo, de JM109, BL21 (DE3)pLysS, TOP10 o Pir1. La cepa INVsc de *Saccharomyces cerevisiae* también puede usarse.

La divulgación describe células hospedadoras transformadas con las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente o con un vector como se describe anteriormente y células derivadas de células transformadas y que contienen el vector o las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento.

Algunos ejemplos de tales células hospedadoras que pueden citarse son *Escherichia coli*, en donde puede producirse la dextranasa troncada y/o mutada. La preparación de tales células hospedadoras se conoce en la técnica.

Las proteínas y los fragmentos biológicamente activos de dichas proteínas, así como las proteínas mutadas que están codificadas por las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento y sus métodos de preparación también se describen en el presente documento.

Por lo tanto, la divulgación también describe un método para preparar dextranasa mutada y/o troncada, que comprende las siguientes etapas:

- (a) cultivar células hospedadoras transformadas con las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente o con un vector como se describe anteriormente en condiciones que permitan la expresión de una dextranasa;
- y
- (b) aislar dicha dextranasa del medio de cultivo.

Más específicamente, las secuencias de ácido nucleico pueden seleccionarse de SEQ ID NO: 1 de la posición 373 a la posición 4269, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 2 desde la posición 373 a la posición 4005, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 3 desde la posición 373 a la posición 3408, el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 4 desde el precursor 373 a la posición 3018 y el fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 5 desde la posición 373 a la posición 4269, secuencias complementarias de dichas secuencias y secuencias que hibridan con dichas secuencias en condiciones rigurosas, con la condición de que se mantenga la actividad enzimática de dextranasa.

Después de aislarse, las dextranasas de la presente invención también pueden purificarse. Con respecto a esto, pueden usarse los métodos de purificación habituales tales como precipitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio hidrófobo, filtración en gel, HPLC en fase inversa, desmezcla de fase y similares. Las dextranasas mutadas o troncadas de la presente invención pueden purificarse usando una resina cargada con níquel, teniendo en cuenta la existencia de la tiorredoxina y la etiqueta 6xHis.

La divulgación también describe proteínas de dextranasa que consisten esencialmente en o consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6 a 10 o una secuencia de aminoácidos seleccionada del fragmento de SEQ ID NO: 6 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1423, el fragmento de SEQ ID NO: 7 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1335, el fragmento de SEQ ID NO: 8 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1136, el fragmento de SEQ ID NO: 9 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1006 y el fragmento de SEQ ID NO: 10 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1423.

Una proteína codificada por una de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 5 o fragmentos de dichas secuencias, como se ha expuesto anteriormente, se describe en el presente documento.

Las secuencias de aminoácidos homólogas, es decir, en donde el grado de similitud con las secuencias definidas anteriormente es suficiente para mantener la actividad enzimática, también se describen en el presente documento. Por lo tanto, los programas Blast y Fasta pueden usarse para investigar similitudes. Ya que se demostró en el presente documento que era posible truncar los extremos N- y C-terminales de las dextranasas, manteniendo la actividad enzimática, la similitud de secuencia no puede considerarse solo para la secuencia completa única, sino también para las secuencias troncadas. La divulgación describe de esa manera cualquier secuencia que contenga el 80 %, el 90 % o el 98 % de similitud de secuencia con la secuencia completa, pero también las que tendrían el 80 %, el 90 % o el 98 % de similitud de secuencia con una de las secuencias troncadas, con la condición de que se mantenga la actividad enzimática.

Más específicamente, la presente invención se refiere a secuencias que tienen el 90 %, el 95 % o el 98 % de similitud con las secuencias de aminoácidos seleccionadas del fragmento de SEQ ID NO: 6 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1423, SEQ ID NO: 7 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1335, SEQ ID NO: 8 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1136, SEQ ID NO: 9 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1006 y SEQ ID NO: 10 del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1423, siempre que estas proteínas tengan la actividad enzimática de dichas dextranasas. Claramente, las secuencias de aminoácidos con una identidad específica definida anteriormente tienen una mayoría de sustituciones conservativas de aminoácidos.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones de aminoácidos de la misma clase. Estas clases comprenden, por ejemplo, aminoácidos que tienen cadenas laterales polares sin carga, tales como Asn, Gln, Ser, Thr o Tyr; aminoácidos que contienen cadenas laterales básicas, tales como His, Lys o Arg; aminoácidos que

contienen cadenas laterales ácidas, tales como Glu o Asp y aminoácidos que contienen cadenas laterales no polares, tales como Ala, Gly, Leu, Val, Ile, Phe, Cys o Trp.

5 Adicionalmente, sobre la actividad enzimática de la dextranasa con sustituciones de aminoácidos, esto puede probarse como se establece en los Ejemplos, pero la actividad también puede evaluarse mediante análisis de HPLC o usando las predicciones habituales sobre la forma en que los cambios de aminoácidos afectan a las funciones de las proteínas.

10 En un aspecto adicional, ya que las secuencias de aminoácidos se indican aquí, la proteína puede sintetizarse usando el método de R B Merrifield, 1963 [20], Por este motivo, las proteínas dextranasa sintetizadas constituyen otro aspecto descrito en el presente documento.

15 Las dextranases mutantes pueden ser SEV663YDA mutante de DSR-S var del $\Delta 4N$ en donde la serina, el ácido glutámico y la valina en las posiciones 663, 664 y 665 se han modificado a tirosina, ácido aspártico y alanina respectivamente.

Este mutante puede usarse para sintetizar isomaltosa a partir de sacarosa, usando sacarosa como único sustrato con un rendimiento que es equivalente al obtenido cuando un aceptor, tales como glucosa, se añade al medio de reacción.

20 La divulgación describe un método para producir isomaltosa directamente a partir de sacarosa, comprendiendo dicho método hacer reaccionar dextranasa mutante con SEQ ID NO: 10 con sacarosa y producir isomaltosa.

25 Las proteínas de fusión que contienen una etiqueta de proteína como se describe anteriormente también forman parte de la presente invención. A este respecto, las proteínas mutadas y/o truncadas de la presente invención pueden fusionarse con al menos una etiqueta de proteína.

30 De esta manera la presente invención también se refiere a una proteína de fusión que comprende en la posición N-terminal y/o C-terminal, una etiqueta de proteína seleccionada del grupo de una etiqueta poli-His, una etiqueta de epítipo c-myc, una etiqueta HA, una etiqueta T7, una etiqueta S, una etiqueta trpE, una etiqueta de avidina/estreptavidina, una etiqueta de estafilococo A, una etiqueta de proteína G, una etiqueta de dihidrofolato reductasa, etiquetas de dominio de unión a celulosa, una etiqueta de policisteína, una etiqueta de fenilalanina, una etiqueta bacteriana GST, una etiqueta de proteína de unión a maltosa, una etiqueta de tioredoxina, una etiqueta de beta-galactosidasa y una etiqueta de proteína VSV fusionada a la dextranasa de acuerdo con la invención, en donde la proteína de fusión conserva su especificidad para sintetizar enlaces alfa-1,6.

35 La preparación de dextranos de alta masa molar (aproximadamente 10^6 - 10^8 Da) y con propiedades reológicas modificadas en comparación con dextrano sintetizado por DSR-S nativo de *L. mesenteroides* NRRL B-512F que usa la dextranasa truncada de la presente invención es otro aspecto de la invención.

40 Más específicamente, los microorganismos que secretan dextranasa o extractos celulares de microorganismos que producen dextranasa de manera intracelular pueden cultivarse o usarse en un medio que comprende sacarosa, dando como resultado la síntesis de isomaltosa (342 Da), (ii) isomalto-oligosacáridos de 342 a 5.000 Da, (iii) dextranos con un tamaño controlado de 1.300 a 5.200 Da centrados alrededor de 10.000 Da, (iv) dextranos con un tamaño controlado de 7.000 a $1,7 \times 10^5$ Da centrado alrededor de 40.000 Da y (v) dextranos con una alta masa molar de 2×10^6 Da a 10^9 Da. Estos compuestos pueden aislarse del medio de cultivo mediante métodos convencionales tales como ultrafiltración, nanofiltración, precipitación alcohólica, cromatografía líquida y similares.

50 Alternativamente, las dextranases truncadas y/o mutadas descritas en la presente invención pueden purificarse y usarse en un método para producir dextranos con una masa molar controlada.

55 Por lo tanto, la divulgación describe un método para producir dextranos y/o isomalto-oligosacáridos con una masa molar controlada, que comprende hacer reaccionar una dextranasa mutada y/o truncada que consiste esencialmente en o que consiste en una secuencia seleccionada de secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 10 definida anteriormente con al menos sacarosa y opcionalmente un aceptor.

60 La divulgación también describe un método para producir isomaltosa, comprendiendo el método hacer reaccionar una dextranasa mutada y/o truncada con la secuencia SEQ ID NO: 10 esencialmente con sacarosa. La divulgación también se refiere a un método para producir dextranos con propiedades de textura interesantes, comprendiendo el método hacer reaccionar una dextranasa mutada y/o truncada con la secuencia de SEQ ID NO: 6.

65 La divulgación también describe dextranos e isomalto-oligosacáridos que tienen las características definidas en el presente documento que pueden obtenerse mediante los métodos descritos en el presente documento. Estas propiedades características incluyen el hecho de que los dextranos de alta masa molar tienen un comportamiento no newtoniano y tienen el carácter de un gel o una naturaleza fibrosa, y la propiedad de cambiar de forma un comportamiento de tipo solución al de un gel después de la aplicación de una segunda serie de esfuerzos de cizalla.

Como se hará evidente en los Ejemplos, ventajosamente, pueden obtenerse las diferentes propiedades reológicas dependiendo de si la enzima está purificada o no.

5 Los dextranos producidos enzimáticamente pueden usarse como un soporte en la industria farmacéutica, como un sustituto de plasma, aditivos en textiles o pinturas, en cosmética y en la industria agroalimentaria, así como un agente texturizante, por ejemplo como un sustituto de la goma arábiga o un agente gelificante. La divulgación también describe composiciones que comprenden los dextranos y los IMO descritos en el presente documento.

10 Una aplicación importante de los dextranos e isomalto-oligosacáridos descritos en el presente documento es su uso como prebióticos. Estos productos no se metabolizan por completo y se fermentan selectivamente en el colon por especies bacterianas apropiadas tales como *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*.

15 Los oligosacáridos se han usado tradicionalmente para alimentos humanos o animales, en las industrias farmacéuticas y en la industria cosmética o como edulcorante, estabilizante o carga [21]. Durante los últimos quince años, se ha desarrollado un nuevo campo de actividad para las propiedades prebióticas de determinadas moléculas no digeribles [23]. Los oligosacáridos como prebióticos son interesantes con respecto a su capacidad para resistir el ataque por las enzimas digestivas y para acentuar el crecimiento de bacterias "sanas", principalmente *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*, en el intestino. Este concepto ha sido estimulado por la aparición de productos prebióticos comerciales que han ganado popularidad rápidamente. Los oligómeros tales como fructo-oligosacáridos, lactulosa, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, oligosacáridos extraídos de soja o isomalto-oligosacáridos que habitualmente se obtienen por procesos biológicos o por extracción de plantas, también son prometedores. En la actualidad, la investigación en este campo se ha centrado en la producción de estructuras novedosas de oligosacáridos denominadas prebióticos de segunda generación que deberían tener nuevas propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas más específicas [18].

25 La divulgación describe una composición que comprende un dextrano obtenido de una dextransacarasa descrita en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable o un vehículo de calidad alimentaria.

30 El vehículo aceptable puede, por ejemplo, seleccionarse de adyuvantes, sales y similares y los adyuvantes pueden seleccionarse de péptidos de muramilo, alumbre, montanida y similares. Las dextransacarasas mutadas y/o truncadas pueden ser una proteína purificada, una proteína producida de manera recombinante o una proteína producida sintéticamente.

35 Con respecto al método para producir los dextranos y/o los IMO descritos en el presente documento, los aceptores preferidos, cuando se usan, son glucosa, isomaltosa, maltosa e isomalto-oligosacáridos.

40 Preferentemente, como se describe en el presente documento, el método para producir isomalto-oligosacáridos con una masa molar controlada comprende hacer reaccionar una dextransacarasa mutada y/o truncada que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 7, 8, 9 o 10 esencialmente con sacarosa. El grado de polimerización puede variar de 2 a 60 unidades de glucosilo (DP2 a DP60).

La reacción de producción puede tener lugar a temperaturas en el intervalo de 4 °C a 80 °C, preferentemente de 4 °C a 40 °C.

45 Preferentemente, cuando la secuencia es SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, la temperatura puede estar en el intervalo de 4 °C a 15 °C, preferentemente 8 °C a 12 °C y más preferentemente la temperatura puede ser del orden de 10 °C para la producción de dextranos con un tamaño controlado. Además, para tales secuencias, la temperatura puede estar preferentemente en el intervalo de aproximadamente 8 °C a 25 °C, más preferentemente del orden de 20 °C para la síntesis de IMO.

50 Adicionalmente, de forma preferente cuando la secuencia es SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10, la temperatura puede estar en el intervalo de 15 °C a 45 °C, preferentemente de 17 °C a 30 °C y más preferentemente del orden de 20 °C a 25 °C.

55 Además, la concentración de sacarosa puede estar en el intervalo de 10 a 600 g/l, preferentemente de 75 a 400 g/l y más preferentemente de 90 a 280 g/l.

Cuando la secuencia es SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, la concentración de sacarosa en el medio puede ser preferentemente del orden de 250 g/l.

60 Además, cuando la secuencia es SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 10, la concentración de sacarosa puede ser del orden de 100 g/l.

65 Además, según sea apropiado, la relación en peso de sacarosa/aceptor puede ser del orden de 0,5 a 12, preferentemente de 1 a 4, más preferentemente aproximadamente 2.

En el método descrito en el presente documento, la dextransacarasa está en forma libre o inmovilizada sobre un

soporte. Dicha inmovilización puede efectuarse por adsorción, inclusión o unión covalente, por ejemplo.

Finalmente, para llevar a cabo el método descrito en el presente documento, el pH está en el intervalo de 3,0 a 10,0, preferentemente de 4,0 a 7,0, más preferentemente de 4,5 a 6,0 y aún más preferentemente de aproximadamente 5,2.

5 Otros aspectos de la invención pueden hacerse evidentes a partir de un estudio de los Ejemplos a continuación.

Ejemplo 1: Construcción de variantes

10 El vector de Riofusión pBad/TOPO (Invitrogen) se usó para clonar y expresar genes *dsrS* truncados y/o mutados bajo el control del promotor de L-arabinosa. Permite la fusión del gen con la etiqueta 6xHis en el extremo C-terminal y con una etiqueta de tiorredoxina en el extremo N-terminal.

15 Para su uso como una matriz, se extrajo ADN genómico de *L. mesenteroides* NRRL B-512F usando el kit "Blood and Cell culture DNA maxi" (Qiagen). La cepa deriva de la colección NCAUR, Peoria, IL, EE.UU.

20 Se usaron células One Shot TOP10 (Invitrogen) para la expresión de los genes *dsrS* truncados y/o mutados. Las enzimas de restricción se compraron de New England Biolabs y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN se purificó usando los kits "QIAquick" (purificación por PCR y extracción en gel) y "QIAprep" (purificación de plásmidos) de Qiagen.

25 Las variantes se construyeron mediante amplificación por PCR del gen DSR-S a partir de ADN genómico de *L. mesenteroides* NRRL B-512F usando la polimerasa "Expand High fidelity" (Roche) y los siguientes cebadores (dados en la dirección 5' → 3'):

1 DSR-S vardel Δ4N se construyó usando los cebadores pBad y DSR-S vardel: 454-acacaacaagtttagcgccaagtacgttgaaaaagac-490 y PBadΔ4N: 4350-actcaagtttagtctggatccacaatgatagc-4317. Contenía los aminoácidos T152 a S1450 de DSR-S.

30 2 DSR-S vardel Δ3 se construyó usando los cebadores PBad y DSR-S vardel: 454-acacaacaagtttagcgccaagtacgttgaaaaagac-490 y PBad Δ3: 4086-cccgtctgcatcaatgaattcacc-4062. Contenía los aminoácidos T152 a G1362 de DSR-S.

3 3 DSR-S vardel Core se construyó usando los cebadores PBad y DSR-S vardel: 454-acacaacaagtttagcgccaagtacgttgaaaaagac-490 y PBad Core: 3489-gccagtttctgacagatcattagtaactg-3459. Contenía los aminoácidos T152 a G1162 de DSR-S.

35 4 DSR-S Core ΔA se construyó usando los cebadores PBad DSR-S cat: 843-ggcttctctggtgtgattgatggtcaa-870 y PBad Core: 3489-gccagtttctgacagatcattagtaactg-3459. Contiene los aminoácidos G282 a G1162 de DSR-S.

40 5 El mutante DSR-S vardel Δ4N SEV663YDA se construyó mediante mutagénesis dirigida usando la técnica de "mega cebador" [33, 21] y la ADN polimerasa Pfu (Stratagene). Se llevó a cabo una primera reacción de PCR usando la matriz de plásmido DSR-S vardel Δ4N y el par de cebadores SEV663YDA: 1965-agctttgtacgagctcagcactacgacgcaaacggtt-2004 e inv: 3447-gtcaccatcctcagtggtcgaacag-3422, que comprende el sitio de restricción SsfBI (subrayado). Este producto de PCR se usó después como un mega cebador inverso en una segunda PCR con el cebador dir: 1329-caaccacagtggaatgaaactagtc1354 que comprende el sitio de restricción SpeI. Este segundo producto de PCR se dirigió después con las dos enzimas de restricción SpeI y SsfBI de acuerdo con las condiciones del fabricante (New England Biolabs) y se clonó en el vector pBad DSR-S vardel Δ4N previamente digerido con las mismas enzimas. El cebador SEV663YDA fue diseñado para introducir un único sitio de restricción para seleccionar clones positivos (en este caso, el sitio SacI).

50 La estructura primaria de cada una de las variantes DSR-S vardel Δ4N, DSR-S vardel Δ3, DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA se muestran esquemáticamente en la Figura 6.

Ejemplo 2: Producción de variantes en *E. coli*

55 Los cultivos se llevaron a cabo en un matraz Erlenmeyer impedido en medio 2X YT tamponado a un pH de 6,4 con 100 mM de Tris-HCl, sabiéndose que DSR-S es inestable en condiciones de pH alcalino [3].

Composición del medio 2XYT:

Bactotripton	16 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
NaCl	5 g/l
Tris	12,1 g/l

60 Las células de *E. coli* TOP10 que llevaban los plásmidos pBad DSR-S vardel Δ4N y pBad DSR-S vardel Δ4N SEV663YDA se cultivaron a 23 °C. La inducción de L arabinosa se llevó a cabo cuando el crecimiento celular alcanzó

una DO_{600 nm} de 0,2 con un 0,002 % (p/v) de inductor. El cultivo se detuvo cuando el crecimiento celular alcanzó una meseta (DO_{600 nm} de aproximadamente 3-3,5) antes de comenzar la fase de lisis celular.

5 Las células de *E. coli* TOP10 que llevaban los plásmidos pBad DSR-S vardel Δ3, pBad DSR-S vardel Core y pBad DSR-S Core ΔA se llevaron a 16 °C. La inducción se llevó a cabo cuando el crecimiento celular alcanzó una DO_{600 nm} de 0,2 con un 0,005 % (p/v) de L arabinosa en el caso de DSR-S vardel Δ3 y un 0,02 % (p/v) en el caso de DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA. El cultivo se detuvo cuando el crecimiento celular alcanzó una meseta (DO_{600 nm} de aproximadamente 2,5) antes de comenzar la fase de lisis celular.

10 Después del cultivo, las células se recuperaron por centrifugación (8.000 x g, 10 minutos, 4 °C), se resuspendieron y se concentraron a una DO_{600 nm} de equivalente a 80 en un tampón de acetato sódico 50 mM, pH 5,2, suplementado con 0,05 g/l de CaCl₂ 1 mM y fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF). La ruptura celular se realizó sometiendo a ultrasonidos. Las preparaciones se centrifugaron una vez más (20.000 x g, 30 min, 4 °C) para eliminar los restos celulares y recuperar solo el sobrenadante del sometimiento a ultrasonidos.

15 La actividad enzimática de los extractos se midió usando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Sumner y Howell, 1935 [22]. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un mmol de fructosa por minuto a una temperatura dada (4 °C a 40 °C dependiendo del caso, más precisamente 20 °C o 30 °C) y en un tampón acetato sódico (50 mM), pH 5,2, que contiene 0,05 g/l de CaCl₂ y 100 g/l de sacarosa.

20 Ejemplo 3: Purificación de la variante DSR-S vardel Δ4N

25 Se produjeron diferentes formas enzimáticas de DSR-S vardel Δ4N durante el cultivo de *E. coli* TOP10: una forma completa muy importante y diferentes formas degradadas en el extremo C-terminal (Figura 7). El origen de estas degradaciones sigue sin estar claro. La producción en el Ejemplo 2 alcanzó aproximadamente 5500 U/l de cultivo en los sobrenadantes de sometimiento a ultrasonidos (actividad ensayada a 30 °C).

30 Para determinar el número de formas enzimáticas activas en los extractos, los geles de electroforesis se produjeron en condiciones nativas o desnaturalizantes. Después de re-naturalizar el gel, se incubó durante la noche a 25 °C en un tampón acetato sódico, 50 mM, pH 5,2 suplementado con 100 g/l de sacarosa. Las formas enzimáticas activas sintetizaron después el polímero en la región a la que migraron en el gel. Se usó un reactivo (reactivo de Schiff) que coloreó específicamente los polímeros sintetizados por dextranacararas activas, después de la oxidación de las funciones primarias de alcohol del polímero ácido periódico y los geles se tiñeron con este reactivo. Este tipo de gel se denomina zimograma. En el caso de DSR-S vardel Δ4N, o su mutante SEV663YDA, solo las dos formas de masa molar superior se detectaron siendo activas (resultados no mostrados). Sin embargo, solo la forma completa tenía la etiqueta de tiorredoxina y la etiqueta 6xHis.

40 La presencia de la etiqueta 6xHis solo en la forma completa de DSR-S vardel Δ4N se explotó para purificar la enzima por cromatografía de afinidad en resina de níquel (Probond Ni-NTA, Invitrogen).

45 La purificación se llevó a cabo a 4 °C. Todos los tampones tenían concentraciones de acetato sódico 50 mM, 400 mM de NaCl, diferentes concentraciones de imidazol y se ajustaron a un pH de 7,5. La resina se equilibró con 8 volúmenes de tampón con una concentración de 40 mM de imidazol. La fijación se llevó a cabo durante 2 horas con 7 volúmenes de extracto enzimático suplementado con 20 mM de imidazol y se ajustó a un pH de 7,5. A continuación, la resina se lavó con 40 volúmenes de tampón imidazol 40 mM, 8 volúmenes a 60 mM y 4 volúmenes a 100 mM. Finalmente, las proteínas se eluyeron con 7 volúmenes de tampón con una concentración de 250 mM de imidazol.

50 Las fracciones que contenían las proteínas de fusión eluidas se mezclaron y se dializaron durante la noche a 4 °C contra un tampón que contenía una concentración de acetato sódico 50 mM, pH de 5,2 y 0,05 g/l de CaCl₂. La concentración de proteína se determinó por el método de microBradford (Biorad Laboratories) con BSA (albúmina de suero bovino) como patrón.

55 La pureza de la preparación al final del procedimiento se estimó en aproximadamente el 90 % (Figura 8). Las proteínas purificadas DSR-S vardel Δ4N tenían una tendencia muy fuerte a agregarse, provocando la formación de precipitados blancos y limitando los rendimientos obtenidos al final del procedimiento (Tabla 1). Sin embargo, La actividad específica de la preparación se estimó en 584 U/mg de proteína, que correspondía a la actividad específica mejor descrita de una dextranacarasa recombinante. A modo de comparación, la actividad específica de DSR-S nativa (expresado por *L. mesenteroides* NRRL B-512F) se estimó en aproximadamente 170 U/mg [24].

60

Tabla 1: Purificación de DSR-S vardel Δ4N por cromatografía de afinidad en resina de níquel

Fase de purificación	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína cono (mg/l)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Sobrenadantes de sometimiento a ultrasonidos	150	149,2	9,46	15,7	1	100
Fracción de elución después de la diálisis	150	67,6	0,25	270,5	17	45,3
Fracción soluble después de eliminar los agregados	150	38,2	0,09	424,4	27	25,4

Ejemplo 4: Secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos

Las construcciones se secuenciaron y las secuencias correspondientes se muestran en las Figuras 1 a 5.

Ejemplo 5: Síntesis de dextrano por DSR-S vardel Δ4N, comparación con DSR-S de *L. mesenteroides* NRRL B-512F

El dextrano se sintetizó a partir de DSR-S nativa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, DSR-S recombinante completa (sobrenadante de sometimiento a ultrasonidos) y DSR-S vardel Δ4N (sobrenadante de sometimiento a ultrasonidos y enzima purificada).

Condiciones de síntesis y análisis de productos formados

La DSR-S recombinante completa se construyó con el mismo principio que las variantes descritas en el Ejemplo 1, con cebadores que eran adecuados para la amplificación de todo el gen. Las células de *E. coli* TOP10 que llevaban el plásmido pBad DSR-S se cultivaron usando el protocolo descrito para DSR-S vardel Δ4N (Ejemplo 2). El sobrenadante contenía tres formas enzimáticas, incluyendo dos con una masa molar activa más alta.

La forma con el mayor tamaño contenía DSR-S en su totalidad; las otras dos formas se degradaron en su posición N-terminal (datos no mostrados).

La actividad de cada preparación enzimática se determinó a 30 °C.

Las síntesis de dextrano se llevaron a cabo a 25 °C comenzando con una solución de sacarosa 100 g/l, en un tampón acetato sódico 50 mM que contiene 0,05 g/l de CaCl₂ y con 1 unidad por ml de enzima. El agotamiento progresivo de la sacarosa se controló mediante análisis HPAEC-PAD (véase a continuación) y la reacción se detuvo después de su consumo completo, calentando durante 5 min a 95 °C (desnaturalización completa de las dextranosaes citadas).

Los productos formados se analizaron por HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada) con respecto a los mono, di y oligosacáridos, y por HPSEC (cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento) con respecto a los polisacáridos.

El sistema HPAEC-PAD comprendía una columna Dionex "Carbopack PA100" de 4x250 mm. Se aplicó un gradiente de acetato sódico de 6 a 300 mM en 28 minutos en una solución de hidróxido sódico 150 mM a un caudal de 1 ml/min. La detección se realizó por amperometría usando un módulo Dionex ED40 con un electrodo de oro y un electrodo de referencia de pH de Ag/AgCl.

El sistema HPSEC estaba constituido por dos columnas Shodex OH-Pack SB-805 y SB-802.5 en serie, usando nitrato sódico 0,45 M + etilenglicol al 1 % (v/v) como el disolvente, en una cantidad de 0,3 ml/min. Las columnas y precolumnas se mantuvieron a 70 °C y las muestras se filtraron en filtros de 0,45 mm (Sartorius) antes de la inyección. La detección fue del tipo refractométrico, acoplado a un detector de difusión de luz (Wyatt) para determinar la masa de los dextranos.

Las concentraciones en peso de glucosa, fructosa y leucrosa (isómero de la sacarosa) se determinaron mediante análisis HPAEC-PAD. Los porcentajes de restos glucosilo de la sacarosa incorporada en la glucosa libre y la leucrosa se calcularon usando la siguiente fórmula:

$$\%G_{\text{glucosa}} = [\text{glucosa}_{\text{tr}}] / ([\text{sacarosa}_{\text{tr}}] \times (180/342))$$

y

$$\%G_{\text{leucrosa}} = [\text{leucrosa}_{\text{tr}}] / [\text{sacarosa}_{\text{tr}}]$$

donde [glucosat_f] y [leucrosat_f] corresponden a las concentraciones finales de glucosa y leucrosa al final de la reacción y [sacarosat₀] corresponde a la del sustrato inicial (g/l).

- 5 El porcentaje de restos glucosilo incorporados en el polímero HMW se determinó mediante análisis HPSEC usando la fórmula:

$$\%G_{\text{dextrano}} = \text{área superficial}_{\text{dextrano-tf}} / (\text{área superficial}_{\text{sacarosa-t0}} / (162/342))$$

- 10 en el cual el área superficial_{dextrano tf} corresponde al área superficial del pico de dextrano, determinado usando el cromatograma HPSEC al final de la reacción y el área superficial_{sacarosa t0} corresponde a aquella del pico del sustrato inicial. Para una concentración dada, la superficie obtenida por refractometría es idéntica independientemente del azúcar.

- 15 La proporción de unidades de glucosilo incorporadas en los polímeros u oligosacáridos IMW para los cuales la concentración no pudo cuantificarse directamente por HPAEC-PAD o HPSEC se determinó usando la fórmula:

$$\%G_{\text{IMW}} = 100 - \% \text{ de } G_{\text{glucosa-tf}} - \% \text{ de } G_{\text{leucrosa-tf}} - \% \text{ de } G_{\text{dextrano-tf}}$$

- 20 Los perfiles de elución de los cuatro dextranos obtenidos por HPSEC se muestran en la Figura 9. Pueden distinguirse diferentes poblaciones: un primer pico eluyó a los 38 minutos, correspondiente al polímero de alta masa molar (HMW), y un segundo pico a los 75 minutos correspondiente a fructosa, glucosa, leucrosa (5-O-α-D glucosil fructosa) y otros oligosacáridos con un grado de polimerización (DP) de menos de 7, no separados por el sistema o en concentraciones muy bajas. Entre estos dos picos principales, como lo indican las perturbaciones de la línea base, los productos de tamaño intermedio (dextranos IMW) también estuvieron presentes. Estos compuestos, con tamaños muy variables, entre 1000 y 10⁷ Da, estaban altamente polidispersados y en concentraciones muy bajas, lo que explica su baja intensidad en el cromatograma. Los análisis de HPAEC-PAD confirmaron su presencia, sin embargo (resultados no mostrados).

- 30 La cantidad relativa de unidades de glucosilo derivadas de sacarosa e incorporadas a los diferentes productos se enumeran a continuación en la Tabla 2. El rendimiento de síntesis para HMW dextrano representa aproximadamente el 60 % de las unidades de glucosilo para cada una de las preparaciones. La transferencia de unidades de glucosilo a agua (glucosa) o fructosa (leucrosa) representa menos del 8 %, mientras que la síntesis de dextranos de tamaño intermedio (IMW) representó del 25 % al 32 % de las unidades de glucosilo transferidas. Todas las formas recombinantes de DSR-S tienden a sintetizar más dextranos de tamaño intermedio. Los análisis de HPSEC también mostraron que la enzima nativa parecía sintetizar dos poblaciones diferentes de dextrano, a diferencia de uno solo para las enzimas recombinantes. La masa molar de HMW dextranos se determinó por difusión de luz y se estimó en más de 10⁷ g/mol para todas las muestras (límite de exclusión de las columnas utilizadas).

Tabla 2: Porcentaje de unidades de glucosilo incorporadas en los diversos productos derivados de la síntesis de dextrano a 25 °C y 100 g/l de sacarosa, para las cuatro preparaciones de DSR-S citadas

	Glucosa	Leucrosa	Dextranos IMW	Dextranos HMW	
				% Rel	HMW (g/mol)
DSR-S nativa	4,12	5,80	25,60	64,47	1,5x 10 x 8,88x 10 ⁷
DSR-S completa	2,32	5,39	29,32	62,96	1,86 x 10 ⁸
DSR-S vardel Δ4N	2,43	5,90	31,03	60,64	4,87 x 10 ⁷
DSR-S vardel Δ4N purificada	2,33	5,80	32,24	59,62	2,47 x 10 ⁷

40 *Estructura de dextranos formados*

- La estructura del dextrano producido por DSR-S vardel Δ4N (purificada o no) se comparó con la de los dextranos sintetizados a partir de DSR-S recombinante completa y DSR-S nativa. Estas estructuras se determinaron por resonancia magnética nuclear (RMN¹ H) usando un Brücker AC 300, a 85 °C y con una frecuencia de adquisición de 300,13 MHz. El tiempo de adquisición fue de 3 s, con 32 a 64 pases. Los dextranos se separaron inicialmente de la fructosa coproducida precipitando 3 veces con 1 volumen de etanol absoluto, se recuperaron por centrifugación, se lavaron con agua destilada y se secaron por congelación. Las muestras se disolvieron en D₂O a una concentración de 6 mg/ml.

- 50 Los espectros de RMN se muestran en la Figura 10. Solo se detectaron enlaces α-1,6. El análisis de RMN de carbono

13 también se llevó a cabo en el dextrano sintetizado por DSR-S vardel $\Delta 4N$ purificada. El espectro obtenido fue idéntico a aquellos publicados para el dextrano de *L. mesenteroides* NRRL B-512F y DSR-S completa [3].

5 Estos polímeros también se digirieron con endodextranasa de *Chaetomium gracile* llevado a cabo durante 16 h a 37 °C con 3 unidades enzimáticas por ml de medio de síntesis. Los productos de digestión fueron analizados por HPAEC-PAD (Figura 11). Los perfiles de digestión obtenidos fueron idénticos para los cuatro dextranos analizados, confirmando que todos tenían al menos 95 % de enlaces α -1,6.

10 Las supresiones realizadas en las posiciones N y C-terminal de la DSR-S para construir la variante DSR-S vardel $\Delta 4N$ no tienen influencia significativa sobre la actividad inicial de DSR-S o sobre la porción de unidades de glucosilo derivadas de sacarosa incorporada en la síntesis del dextrano HMW, el tamaño o la estructura del polisacárido.

Comportamiento reológico de los dextranos formados

15 El comportamiento reológico de los cuatro dextranos se analizó utilizando un sistema de plano cónico (AR 1000, TA Instruments) provisto de un cono de 4 cm de diámetro en un ángulo de 3,59° y velocidades de cobertura de 0,01 a 100 s⁻¹. Las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C. Se realizaron experimentos dinámicos en el dominio lineal entre 0 y 10 Pa, con una deformación del 8 % para el dextrano sintetizado por DSR-S nativa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F (control), el 3 % para aquel sintetizado por la DSR-S recombinante completa, el 5 % para aquel sintetizado por un extracto no purificado de DSR-S vardel $\Delta 4N$ y el 0,4 % para aquel sintetizado por DSR-S vardel $\Delta 4N$ purificada. El módulo de rigidez complejo está definido por la relación:

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega).$$

25 El módulo de conservación de energía $G'(\omega)$ es más grande cuando la muestra es predominantemente elástica o altamente estructurada. El módulo de pérdida $G''(\omega)$ representa la energía disipada durante la deformación. Las muestras predominantemente viscosas tienen una alta $G''(\omega)$.

30 Estos análisis reológicos produjeron resultados completamente originales (Figura 12). Como se describe en la bibliografía, la DSR-S nativa sintetizó un dextrano con comportamiento newtoniano [25].

35 Los extractos de DSR-S recombinantes completos y los extractos de DSR-S vardel $\Delta 4N$ no purificados produjeron soluciones viscosas con un comportamiento idéntico (viscosidad aproximadamente 10 veces mayor que la del dextrano producido por la enzima nativa). Cuando se observa a simple vista, también tuvieron un comportamiento fibroso bastante pronunciado. Además, después de la aplicación de nuevos esfuerzos de cizalla, el comportamiento de dichos polímeros cambió de un tipo de solución a un tipo de gel, que es una propiedad novedosa que se ha identificado para este tipo de biopolímero. El dextrano producido por la enzima nativa, por el contrario, no era fibroso y su comportamiento era completamente reversible después de la aplicación de una segunda serie de esfuerzos (Figura 12A).

40 La enzima purificada sintetizó directamente un polímero que tiene las propiedades de un gel altamente estructurado (Figura 12B, módulo G' mucho más alto que G''), conservando sus características a través de un intervalo de temperaturas de 10 °C a 70 °C (resultados no mostrados). Este comportamiento es completamente diferente del de la enzima nativa.

45 Solamente la preparación de DSR-S vardel $\Delta 4N$ purificada contenía solo una dextranasa activa en el extracto. Se sabe que la DSR-S nativa es propensa a problemas de degradación proteolítica [26] y las técnicas de purificación desarrolladas no pudieron resolver ese problema [27, 28, 29]. La DSR-S recombinante completa usada en la prueba contenía al menos dos formas enzimáticas activas, como la preparación DSR-S vardel $\Delta 4N$ antes de la purificación. Sin embargo, las formas degradadas de DSR-S nativa, DSR-S recombinante completa y DSR-S vardel $\Delta 4N$ son completamente diferentes. Actualmente se supone que la cooperación entre estas diferentes formas enzimáticas activas presentes en el medio podría ser el origen de modificaciones en las cadenas de dextrano, provocando estas diferencias en el comportamiento.

55 Ejemplo 6: Síntesis de isomaltosa a partir de sacarosa

Se estudió la capacidad del mutante DSR-S vardel $\Delta 4N$ SEV663YDA para sintetizar solo isomaltosa (IMO con DP 2) a partir de sacarosa en detrimento de los dextranos de alta masa molar.

60 El mutante se purificó por cromatografía de afinidad usando el procedimiento descrito para DSR-S vardel $\Delta 4N$ dado en el Ejemplo 3.

La actividad se ensayó a 30 °C.

65 Con una actividad específica de solo 9 U/mg, las mutaciones SEV663YDA indujeron efectos graves sobre la actividad de DSR-S (pérdida del 98 % de la tasa de consumo inicial de sacarosa). Esa actividad específica, sin embargo, es

equivalente al de la amilosacarasa recombinante de *N. polysaccharea* [32], que se ha estudiado ampliamente por su posibilidad de aplicación.

Las caracterizaciones que se llevaron a cabo demuestran la factibilidad de producir isomaltosa por este mutante DSR-S, mientras que la enzima silvestre produce solo dextranos de alta masa molar. Las síntesis se llevaron a cabo a 25 °C en un tampón que contenía una concentración de 50 mM de acetato sódico a un pH de 5,2 y 0,05 g/l de CaCl₂, 1 U/ml de enzima purificada y usando 100 g/l de sacarosa como el único sustrato, o mediante reacción aceptora comenzando con 100 g/l de sacarosa y 50 g/l de glucosa. El agotamiento de sacarosa se monitorizó mediante análisis HPAEC-PAD (véase el Ejemplo 4 para las condiciones de análisis) y las reacciones se interrumpieron después de un consumo completo.

La producción de isomaltosa alcanzó de esta manera un rendimiento del 47 % usando sacarosa como el único sustrato (Tabla 3 y Figura 13), un rendimiento que fue equivalente al obtenido por la reacción del aceptor. Por lo tanto, no fue necesario añadir un aceptor exógeno. También se identificaron trazas de isomaltotriosa, maltosa o nigerosa (no separadas por el sistema) (Figura 13), así como la presencia de otros oligosacáridos con un DP de menos de 7 y de estructura desconocida.

Tabla 3: Síntesis de isomaltosa por mutante DSR-S vardeI Δ4N SEV663YDA a partir de 100 g/l de sacarosa sola, o por reacción aceptora con 50 g/l de glucosa. Concentración de diferentes productos presentes al final de la reacción.

	sacarosa 100 g/l	sacarosa 100 g/l + glucosa 50 g/l
Glucosa	16,73	33,14
Fructosa	45,95	42,31
isomaltosa	23,99	47,17
Otros oligosacáridos	13,33	27,38
% de restos de glucosa transferidos a la isomaltosa	47,98 %	47,17 % ²

²: calculado a partir de restos de glucosilo derivados de glucosa exógena y sacarosa añadida al medio.

De esta manera en este Ejemplo, la producción de isomaltosa alcanzó un rendimiento del 47 %. En la actualidad, este es el primer método que involucra una sola enzima para sintetizar isomaltosa a partir de sacarosa; estando todos los estudios previos relacionados con la degradación del almidón por un cóctel de α-amilasas y glicosidasas [11], o con la acción conjunta de la dextranosa y la dextranasa [30]. Además, la sacarosa es un sustrato barato y ampliamente disponible y la fructosa liberada durante las síntesis constituye un co-producto cuyo valor puede explotarse por separado.

Ejemplo 7: Síntesis de dextrano por DSR-S vardeI Δ3

Se produjeron diferentes formas enzimáticas de DSR-S vardeI Δ3 durante el cultivo de *E. coli* TOP10. Sin embargo, la forma completa era ampliamente mayoritaria y los zimogramas producidos (véase el Ejemplo 3) mostraron que solo la forma completa era activa.

La temperatura de actividad óptima para esta variante fue de 20 °C. Así, los ensayos de actividad se llevaron a cabo a esta temperatura. La producción de DSR-S vardeI Δ3 de acuerdo con el Ejemplo 2 alcanzó aproximadamente 320 U/l de cultivo.

Las síntesis de dextrano se llevaron a cabo a 20 °C en un tampón que contenía 50 mM de acetato sódico, pH de 5,2 y 0,05 g/l de CaCl₂, 100 g/l de sacarosa y 1 U/ml de extracto DSR-S vardeI Δ3 no purificada. El extracto DSR-S vardeI Δ3 podría purificarse por cromatografía de afinidad en resina de níquel usando el protocolo descrito para DSR-S vardeI Δ4N en el Ejemplo 3. Sin embargo, ya que el sobrenadante de sometimiento a ultrasonidos contenía solo una forma enzimática única de dextranosa y *E. coli* no produjo otra enzima que pudiera consumir la sacarosa, la purificación de la variante no constituyó un requisito previo para la caracterización rigurosa de sus propiedades. A modo de comparación, las síntesis de dextrano se llevaron a cabo en las mismas condiciones que con DSR-S vardeI Δ4N (no purificada). La desaparición de la sacarosa se controló mediante análisis HPAEC-PAD y las reacciones se detuvieron (5 minutos, 95 °C) después del agotamiento total.

Los productos sintetizados se analizaron y cuantificaron por HPAEC-PAD y HPSEC usando las condiciones descritas en el Ejemplo 4. Para los análisis de HPSEC, el tamaño de los dextranos se estimó usando dextranos disponibles en el mercado con tamaños de 2 x 10⁶, 503 x 10³, 70.000, 10.000 Da, maltoheptaosa y glucosa (Sigma).

Como puede verse en la Figura 13, a 20 °C la variante DSR-S vardeI Δ3 sintetizó dos poblaciones de polímeros; la

población principal de dextrano HMW con un tamaño de 2×10^6 Da, representando aproximadamente el 39 % de los restos glucosilo derivados de la sacarosa (Tabla 4) y una segunda población de 1.300 a 52.000 Da, centrado en el pico más alto a alrededor de 10.000 Da (aproximadamente el 25 % de restos glucosilo). Esta es la primera vez que se observa una segunda población de dextrano que es claramente visible en el cromatograma HPSEC para una variante de DSR-S.

Efecto de la temperatura sobre el perfil de los productos

Las síntesis de dextrano también se llevaron a cabo a una temperatura de 10 °C, todavía con un tampón que contiene 50 mM de acetato sódico, pH 5,2, 0,05 g/l de CaCl₂ y 1 U/ml de enzima (actividad analizada a 20 °C). El agotamiento de la sacarosa se monitorizó mediante análisis HPAEC-PAD y las reacciones se detuvieron (5 min, 95 °C) después del consumo total de las mismas.

Como puede verse en la Figura 14, a 10 °C, la variante DSR-S vardel Δ3 sintetizó una población de dextrano que era muy diferente de la producida a 20 °C. El polímero principal (aproximadamente el 44 %) formado a esa temperatura tenía una masa molar en el intervalo de 7.000 y $1,7 \times 10^5$ Da se centró en el pico en alrededor de 40.000 Da.

Tabla 4: Porcentaje de unidades de glucosilo incorporadas en diferentes productos sintetizados por DSR-S vardelΔ4N y DSR-S vardel Δ3 a 10 °C y 20 °C a partir de 100 g/l de sacarosa

	DSR-S vardel Δ4N		DSR-S vardel Δ3	
	20 °C	10 °C	20 °C	10 °C
HMW dextrano > 2×10^6 Da	55,2	37,1	39,2	8,8
Dextrano 40.000 Da	nd ¹	nd	nd	43,9
Dextrano 10.000 Da	18,2	14,7	24,8	nd
Oligosacáridos con DP ≤ 8 ²	16,2	39,1	27,3	36,7
Leucrosa	9,2	7,6	5,3	9,3
Glucosa	1,2	1,5	3,4	1,3

¹: nd: no detectado
²: grado de polimerización calculado a partir del tiempo de retención estimado en el límite inferior de 10000 Da de pico de dextrano.

Efecto de la concentración de sacarosa

Se probaron cuatro concentraciones crecientes de sacarosa (100, 150, 200 y 250 g/l) para las síntesis de dextrano llevadas a cabo a 20 °C y 10 °C con DSR-S vardel Δ3 (1 U/ml). El consumo total de sacarosa se controló mediante análisis HPAEC-PAD y las síntesis se detuvieron después de su consumo total (menos de 48 h).

Para las dos temperaturas, el aumento inicial en la concentración de sustrato alentó la síntesis de dextranos de baja masa molar. A 20 °C, la síntesis de dextrano de 10.000 Da cambió de esta manera de un rendimiento del 25 % al 48 % al cambiar de 100 a 250 g/l de sacarosa inicial. A 10 °C y a partir de 250 g/l, la síntesis de dextrano HMW fue completamente abolida y la de dextrano con la población principal con una masa molar centrada alrededor de 40.000 Da alcanzó ventajosamente un rendimiento del 69 %.

Para todos los dextranos sintetizados por DSR-S vardel Δ3, a 10 °C y 20 °C y de 100 a 250 g/l de sacarosa, los perfiles de digestión con endodextranasa (véase el Ejemplo 5) llevados a cabo confirmaron que la especificidad de unión de DSR-S no cambió (mismos perfiles de oligosacáridos detectados por HPAEC-PAD que con DSR-S vardel Δ4N, es decir, al menos el 95 % de enlaces α-1,6).

Ejemplo 8: Síntesis de dextrano por DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA

Las variantes DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA también se degradaron ligeramente durante la expresión por *E. coli* TOP en las condiciones descritas en el Ejemplo 2. Sin embargo, como fue el caso de la variante DSR-S vardel Δ3, solo la forma completa, que estaba en la gran mayoría, fue activa de acuerdo con el zimograma (resultados no mostrados).

La temperatura de actividad óptima para estas variantes también fue de 20 °C. La producción alcanzó de esta manera 38 y 180 U/l de cultivo para DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA respectivamente.

Las síntesis de dextrano se llevaron a cabo a 20 °C y 10 °C usando 100 a 250 g/l de sacarosa en un tampón que contenía 50 mM de acetato sódico, pH 5,2, 0,05 g/l de CaCl₂ y 1 U/ml de extracto enzimático (no purificado). El

consumo de sacarosa se monitorizó mediante análisis HPAEC-PAD y las síntesis se detuvieron (5 min, 95 °C) después del agotamiento completo (menos de 48 h). Los productos formados se analizaron por HPAEC-PAD y HPSEC y su concentración se cuantificó como se describe en el Ejemplo 5.

5 La Figura 15 muestra el perfil de los productos sintetizados a 20 °C por las dos variantes (cromatograma HPSEC). Puede verse claramente que con estas variantes, y en contraste con DSR-S vardel Δ4N y DSR-S vardel Δ3, la población principal de dextrano formado tenía una masa molar de cerca de 10.000 Da con la base del pico entre 1.300 y 52.000 (a media altura entre 5.000 y 22.000). Con la variante DSR-S Core ΔA, la síntesis de HMW dextrano fue completamente abolida (Tabla 5). Una reducción de la temperatura a 10 °C podría aumentar los rendimientos de dextrano con ~ 10.000 Da sin una diferencia de tamaño significativa, como fue el caso con DSR-S vardel Δ3 (Tabla 5). La síntesis de dextrano con la variante DSR-S Core ΔA alcanzó así un rendimiento del 75 %. Se obtuvo un rendimiento equivalente con la variante DSR-S vardel Core cuando la concentración inicial de sacarosa fue de 250 g/l (resultados no mostrados).

Tabla 5: Porcentaje de unidades de glucosilo incorporadas en diferentes productos sintetizados por DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA a 10 °C y 20 °C a partir de 100 g/l de sacarosa

	DSR-S vardel Δ4N		DSR-S vardel Core		DSR-S	Core ΔA
	20 °C	10 °C	20 °C	10 °C	20 °C	10 °C
HMW dextrano > 2x 10 ⁶ Da	55,2	37,1	9,9	2,4	nd	Nd
Dextrano 10.000 Da	18,2	14,7	57,5	62,5	64,4	74,5
Oligosacáridos con DP ≤ 8 ²	16,2	39,1	19,6	14,8	19,8	10,0
Leucrosa	9,2	7,6	6,5	10,2	12,7	12,8
Glucosa	1,2	1,5	6,5	10,1	3,1	2,7

¹: nd: no detectado
²: grado de polimerización calculado a partir del tiempo de retención estimado en el límite inferior de 10000 Da de pico de dextrano.

15 El análisis HPAEC-PAD del dextrano sintetizado a partir de 100 g/l de sacarosa a 20 °C por las diferentes variantes mostró la muy alta polidispersibilidad del producto (Figura 16), que contiene isomalto-oligosacáridos con un DP de 2 a un DP de aproximadamente 60 para DSR-S Core ΔA en particular.

20 Para todos los dextranos sintetizados por DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA a 10 °C y 20 °C y usando de 100 a 250 g/l de sacarosa, los perfiles de digestión con endodextranasa (véase el Ejemplo 5) llevados a cabo confirmaron que la especificidad de unión de DSR-S no cambió (incluso los perfiles de oligosacáridos detectados por HPAEC-PAD en comparación con DSR-S vardel Δ4N, de esta manera al menos el 95 % de enlaces α-1,6).

25 Ejemplo 9: Reacción aceptora con glucosa

Las reaccionesceptoras se llevaron a cabo a 20 °C con una relación sacarosa/glucosa de 2 (100 g/l de sacarosa, 50 g/l de glucosa), 1 U/ml de extracto de DSR-S vardel Δ4N, DSR-S vardel Δ3, DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA en un tampón que contiene 50 mM de acetato sódico a un pH de 5,2 y 0,05 g/l de CaCl₂. El consumo total de sacarosa se controló mediante HPAEC-PAD y las reacciones se detuvieron después de que se hubo agotado por completo. Todas las variantes sintetizaron isomalto-oligosacáridos (IMO) con un DP de 2 a aproximadamente 30, en detrimento de la síntesis de polímero con un DP más alto.

35 Sin embargo, los rendimientos obtenidos fueron mayores para las variantes truncadas de las unidades A. De esta manera, la producción de IMO alcanzó el 52 % en el caso de DSR-S vardel Δ3 y el 58 % para DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA, a diferencia del 47 % en el caso de DSR-S vardel Δ4N. La distribución de oligosacáridos también se modificó (Figura 17).

40 Para DSR-S vardel Δ3, la proporción de IMO con un DP de 2 a un DP de 15 fue menor que la de los productos sintetizados por DSR-S vardel Δ4N. La situación se revirtió para las IMO con un DP de más de 15.

45 De forma similar, se demostró que los mutantes DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA funcionan mejor para la síntesis de IMO con un DP alto que DSR-S vardel Δ4N o DSR-S nativo (DP esencialmente de 2 a 15): La producción de IMO con un DP de 12 a un DP de 27 fue de dos a cinco veces mayor con estas dos variantes (de acuerdo con la relación de las áreas superficiales obtenidas por HPAEC-PAD).

REFERENCIAS

- [1] Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M., & Remaud-Simeon, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 11, 675-685.
- 5 [2] Coutinho, P. M., &Henrissat, B. 1999, Carbohydrate-Active Enzymes server, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/cazy/CAZYI-index.html>
- [3] Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russell, R. R., Monsan, P., & Willemot, R. M. 1997. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase (DSR-S) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 48, 465.
- 10 [4] Koepsell, H. J., Tsuchiya, H. M., Heilman, N. N., Kazenko, A., 15 Hoffman, C. A., Sharpe, E. S., & Jackson, R. W. 1953. Enzymatic synthesis of dextran; acceptor specificity and chain initiation. *J Biol Chem* 200, 793-801.
- [5] Groenwall, A. J., & Ingelman, G. A. 1948. Manufacture of infusion and injection fluids. *Patente de EE.UU.* 2.437.518.
- [6] Robyt, J. F. 1985. Dextran, p. 753-767. In J. I. Kroschwitz (ed.), *Encyclopedia of polymer Science*, vol. 4. Wiley-VCH, Nueva York.
- 15 [7] Ahsan, N. 1998. Intravenous infusion of total dose iron is superior to oral iron in treatment of anemia in peritoneal dialysis patients: a single center comparative study. *J Am Soc Nephrol* 9, 664-8.
- [8] De Beider, A. N. 1996 Medical applications of dextran and its derivatives p 275-296. In S. Domitriu (ed.), *Polysaccharides in medicinal applications*. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- 20 [9] Jagodzinski, P. P., Lewandowska, M., Januchowski, R., Franciszkiewicz, K., & Trzeciak, W. H. 2002. The effect of high molecular weight dextran sulfate on the production of interleukin-8 in monocyte cell culture. *Biomed Pharmacother* 56, 254-7.
- [10] Hersline, R. 2004. Antiviral composition. *Patente de EE.UU.* 6 821 958.
- [11] Nakakuki, T. 2002. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure App Chem* 74, 1245-1251.
- 25 [12] Goulas, A. K., Fisher, D. A., Grimble, G. K. Grandison, A. S., & Rastall, R. A. 2004b. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextranase and dextranase. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 327-338.
- [13] Rousseau, V., Lepargneur, J., Roques, C., Remaud-Simeon, M., & Paul, F. 2005. Prebiotic effect of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. *Anaerobe*, 11(3),145-153.
- 30 [14] Goulas, A. K., Cooper, J. M., Grandison, A. S., & Rastall, R. A. 2004a. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans in a recycle membrane bioreactor by the combined use of dextranase and dextranase. *Biotechnol Bioeng* 88, 778-87.
- [15] Scientific Committee On Food. 2000. Opinion on the scientific committee on food on a dextran preparation produced using *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* ssp as a novel food ingredient in bakery products. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Brussels.
- 35 [16] Monchois, V., Reverte, A., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., & Willemot, R. M. 1998. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. *Appl.Environ.Microbiol.* 64, 1644-49.
- [17] R. Kaufman, *Methods in Enzymology* 185, 537-566 (1990)
- [18] Tannock, W. G. *Probiotics and Prebiotics. Where are we going?* Caister Academic Press, Wymondham, UK2002
- 45 [19] Khalikova, E., Susi, P. & Korpela, T., 2005. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbial. Mol. Biol.* 69,306-25
- [20] Merrifield, R.B., 1963 *J. Am. Chem. Soc.* 85,2149.
- [21] Monsan, P., Paul, F., 1995 Enzymatic synthesis of oligosaccharides *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 187-192.
- [22] Sumner, J., & Howell, S. 1935. A method for determination of invertase activity. *Journal of Biological Chemistry* 108, 51.
- 50 [23] Gibson, G. R., Roberfroid, M. B., 1995 Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics *J. Nutr.*, 125, 1401-12.
- [24] Paul, F., Auriol, D., Oriol, E., &Monsan, P. 1984. Production and purification of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 434, 267-270.
- 55 [25] Carrasco, F., Chornet, E., Overend, R. P., &Costa, J. 1989 A generalized correlation for the viscosity of dextrans in aqueous solutions as a function of temperature, concentration, and molecular weight at low shear rate. *J Appl Polymer Sci* 37, 2087-98.
- [26] Arguello-Morales, M., Sanchez-Gonzalez. M., Canedo, M., Quirasco. M., Farres, A., & Lopez-Munguia, A. 2005. Proteolytic modification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 131-41.
- 60 [27] Miller, A. W., Eklund, S. H., & Robyt, J. F. 1986. Milligram to gram scale purification and characterization of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr.Res.* 147, 119.
- [28] Kobayashi, M., & Matsumada, K. 1986. Electrophoretic analysis of the multiple forms of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J.Biochem. (Tokyo)* 100, 615
- [29] Kobayashi, M., Mihara, K., & Matsuda, K. 1986. Dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F: characterization of the enzyme bound to Sephadex gel. *Agric Biol Chem* 50, 551-556.
- 65 [30] Paul, F., Monsan, P., Remaud, M., Pelenc, V. Process for preparing enzymatically a sugar mixture having a

high content of isomaltose from sucrose, Patente de EE.UU. 4.861.381

[31] Blood Products Committee 83er Meeting - 21 de julio de 2005

[32] Potocki-de-Montalk, G., Remaud-Simeon, M., Willemot, R.M., Planchot, V. y Monsan, P. 1999. Sequence analysis of the gene encoding amylosucrase from Neisseria polysaccharea and characterization of the recombinant enzyme. J. Bacteriol. 181, 375-381.

[33] Barik, S. 1995. site-directed mutagenesis by double polymerase chain reaction. Mol Biotechno/3, 1-7.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE
- <120> CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS VARIANTES DE DEXTRANSACARASA DSR-S POR INGENIERÍA
GENÉTICA
- 15 <130> B6624A-JAZ/JV
- <140> Nueva solicitud de patente PCT
20 <141> 08/02/2007
- <150> FR 06/01.117
20 <151> 08/02/2006
- <160> 26
- 25 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
30 <211> 4356
<212> ADN
<213> Artificial
- <220>
35 <223> Dextrano sacarasa truncada
- <400> 1

ES 2 800 724 T3

atgggatctg	ataaaattat	tcatctgact	gatgattctt	ttgatactga	tgtacttaag	60
gcagatggtg	caatcctggt	tgatttctgg	gcacactggt	gcggtccgtg	caaaatgatc	120
gctccgattc	tggatgaaat	cgctgacgaa	tatcagggca	aactgaccgt	tgcaaaactg	180
aacatcgatc	acaacccggg	cactgcgccg	aaatatggca	tccgtggtat	cccgactctg	240
ctgctgttca	aaaacggtga	agtggcggca	accaaagtgg	gtgcaactgtc	taaaggtcag	300
ttgaaagagt	tcctcgacgc	taacctggcc	ggctctggat	ccggtgatga	cgatgacaag	360
ctcgccctta	tgacacaaca	agttagcggc	aagtacgttg	aaaaagacgg	tagttggtat	420
tattattttg	atgatggcaa	aaatgctaaa	ggtttatcaa	cgatagacaa	caatattcaa	480
tatttttacg	agagtggtaa	acaagccaaa	ggacagtatg	tcacaattga	taatcaaaca	540
tattattttg	ataagggctc	aggtgatgag	ttaactggtc	tgcaaagcat	tgatgggaac	600
atagttgctt	ttaacgatga	agggcaacaa	atttttaatc	aatattacca	atctgaaaat	660
ggtacaacat	actactttga	tgataaagga	cacgctgcta	ccggtattaa	gaatatcgag	720
ggcaaaaatt	attattttga	taatcttggg	caactaaaaa	aaggcttctc	tggtgtgatt	780
gatggtcaaa	taatgacatt	tgatcaggaa	acagggcaag	aagtttctaa	cacaacttct	840
gaaataaaag	aaggtttgac	gactcaaaac	acggattata	gcgaacataa	tgcagccac	900
ggtacggatg	ctgaggactt	tgaaaatatt	gacggctatt	taacagctag	ttcatggtat	960
cgtccaacag	gtatttttacg	taacggaaca	gactgggaac	cttctacaga	tacagatttc	1020
agaccaatat	tgtcagtgtg	gtggccagat	aagaacaccc	aggtcaatta	tttaaattac	1080
atggctgatt	tagggtttat	cagtaatgcg	gacagttttg	aaactgggga	tagccaaagc	1140

ES 2 800 724 T3

ttattaaatg aagcaagtaa ctatgttcaa aaatcaattg aaatgaaaat tagtgcgcaa 1200
 caaagtacag agtgggttaa ggatgcaatg gcggccttca ttgtcgcgca accacagtgg 1260
 aatgaaacta gtgaagatat gagcaatgac catttacaaa atggcgcatt aacttatgtc 1320
 aacagtccac tgacacctga cgctaattca aacttttagac tacttaatcg gacaccaaca 1380
 aaccagactg gtgaacaagc gtataattta gataattcaa aaggtgggtt tgaattggtg 1440
 ttagccaatg acgttgataa ttcaaaccct gtagtacaag cagaacaatt gaattggtta 1500
 tattatttaa tgaattttgg tacgattacg gccaacgacg cggatgctaa ttttgatggt 1560
 attcgtgtag atgcagtcga caatgtggat gctgatttgt tacaattgc tgccgattat 1620
 ttcaaactag cttacggtgt tgatcaaaat gatgctactg ctaatcagca tctttcaatt 1680
 ttggaagatt ggagtcacaa tgatcctttg tatgtaacag atcaaggaag caatcaatta 1740
 accatggatg attatgtgca cacacaatta atctggtctc taacaaaatc atctgacata 1800
 cgagggtacaa tgcagcgctt cgtggattat tatatgggtg atcgatctaa tgatagtaca 1860
 gaaaacgaag ccattcctaa ttacagcttt gtacgtgcac acgacagcga agtgcaaacg 1920
 gttattgccc aaattgtttc cgattttgat cctgatggtg aaaatagttt agcaccaaca 1980
 acagaacaat tggcagctgc tttcaaagta tacaatgaag atgaaaaatt agcagacaaa 2040
 aagtacacac aatataatat ggctagtgtc tatgcgatgt tgctaacca taaggatact 2100
 gttcctcgtg tctattatgg cgatttatat acagatgatg gtcaatatat ggcaacaaag 2160
 tcaccatact atgatgcat taacactttg ctaaaggcta gagttcagta tgttgctggt 2220
 ggccaatcga tgtccgttga tagtaatgac gtgttaacaa gtgttcgcta tggtaaagat 2280
 gccatgacag cttctgacac tggaacatct gagacgcgta ctgaaggat tggagtcac 2340
 gtcagcaata acgcgagct acaattagag gatgggcata ctgtcacatt gcatatgggg 2400
 gcagctcata agaaccaagc ttatcgtgct ttgttatcaa caactgcaga tggattagct 2460
 tattatgata ctgatgaaaa tgcacctgtg gcgtacacag atgctaacgg cgatttgatt 2520
 tttacgaatg aatcaattta tgggtgtaca aatccacaag tttctggtta cttggcagtt 2580
 tgggttccgg taggtgcgca acaagatcaa gatgcacgaa cggcctctga tacaacaaca 2640
 aacacgagtg ataaagtgtt ccattcaaac gctgctcttg attctcaagt catctacgaa 2700
 ggtttctcaa acttccaagc atttgctaca gacagcagtg aatatacaa cgtagtcac 2760
 gctcagaatg cggaccaatt taagcaatgg ggtgtgacaa gcttccaatt ggcaccaca 2820
 tatcgttcaa gtacagatac aagtttcttg gattcaatta ttcaaacgg gtatgcattc 2880
 acggatcgtt atgacttagg ttatggcaca ccgacaaaat atggaactgc tgatcagttg 2940
 cgcgatgcta ttaaagcctt acatgctagc ggtattcaag ccattgccga ttgggtgccg 3000
 gaccaaattt ataatttgcc agagcaagaa ttagctactg tcacaagaac aaattcattt 3060
 ggagatgacg atacagattc tgatattgac aatgccttat atgttgtaaa aagtcgtggg 3120
 ggtggtcaat atcaagagat gtatgggtgt gccttcttag aagagttaca ggcactctat 3180

ES 2 800 724 T3

ccatccctat ttaaagtgaa tcaaatctca actggcgttc caattgatgg cagtgtaaag 3240
 attactgagt gggcggctaa gtacttcaat ggctctaaca tccaaggtaa aggtgctgga 3300
 tacgtattga aagatatggg ttctaataag tacttttaagg tcgtttcgaa cactgaggat 3360
 ggtgactact taccaaaaaca gttaactaat gatctgtcag aaactggctt tacacacgat 3420
 gataaaggaa tcatctatta tacattaagt ggttatcgtg cccaaaatgc atttattcaa 3480
 gatgatgata ataactatta ctatthttgat aaaacagggtc atttagtaac aggtttgcaa 3540
 aagattaata accataccta cttcttctta cctaattggta tcgaactggg caagagcttc 3600
 ttacaaaacg aagatgggtac aattgtttat ttcgataaga aagggtcatca agtttttgat 3660
 caatatataa ctgatcaaaa tggaaatgcg tattactttg atgatgctgg tgtaatgctt 3720
 aatcagggc ttgcaacgat tgatggacat caacagattt ttgatcaaaa tgggtgtgag 3780
 gtttaaggata agttttgtgat tggcactgat ggttataagt attactttga accaggtagt 3840
 ggtaacttag ctatcctacg ttatgtgcaa aatagtaaga atcaatgggt ctatthttgat 3900
 ggtaatggcc atgctgtcac tggtttccaa acaattaatg gtaaaaaaca atatthttctat 3960
 aatgatgggtc atcaaaagtaa aggtgaattc attgatgcag acgggggatac tttctatacg 4020
 agtgccactg atgggtcgcct agtaactggg gttcagaaga ttaatgggtat tacctatgct 4080
 tttgataaca caggaaatth gatcacaaat cagtattatc aattagcaga tggtaaatat 4140
 atgtttgtag atgatagtgg tcgtgcgaaa acagggtttg tattgcaaga tgggtgtacta 4200
 agatacttcg atcaaaaacgg tgagcaagtg aaagatgcta tcattgtgga tccagatact 4260
 aacttgagtt acaagggcga gcttgaaggt aagcctatcc ctaaccctct cctcgggtctc 4320
 gattctacgc gtaccgggtca tcatcaccat caccat 4356

<210> 2
 <211> 4092
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Dextrano sacarasa truncada

10

<400> 2

atgggatctg ataaaattat tcatctgact gatgattcct ttgatactga tgtacttaag 60
 gcagatgggt caatcctggg tgatthttctgg gcacactggg gcgggtccgtg caaaatgatc 120
 gctccgattc tggatgaaat cgctgacgaa tatcagggca aactgaccgt tgcaaaaactg 180
 aacatcgatc acaaccggg cactgcgccc aaatatggca tccgtgggtat cccgactctg 240
 ctgctgttca aaaacgggtga agtggcggca accaaagtgg gtgcaactgtc taaagggtcag 300
 ttgaaagagt tcctcgacgc taacctggcc ggctctggat ccgggtgatga cgatgacaag 360
 ctcgccctta tgacacaaca agttagcggc aagtacgttg aaaaagacgg tagttgggtat 420
 tattatthttg atgatggcaa aatgctaaa ggtthttatcaa cgatagacaa caatattcaa 480
 tattthttacg agagtggtaa acaagccaaa ggacagtatg tcacaattga taatcaaaaca 540

ES 2 800 724 T3

tattatTTTTg ataagggctc aggtgatgag ttaactggtc tgcaaagcat tgatgggaac 600
atagttgctt ttaacgatga agggcaacaa atttttaatc aatattacca atctgaaaat 660
ggtacaacat actactttga tgataaagga cacgctgcta ccggtattaa gaatatcgag 720
ggcaaaaatt attatTTTga taatcttggg caactaaaa aaggcttctc tgggtgtgatt 780
gatggtcaaa taatgacatt tgatcaggaa acagggcaag aagtttctaa cacaacttct 840
gaaataaaaag aaggtttgac gactcaaaac acggattata gcgaacataa tgcagcccac 900
ggtacggatg ctgaggactt tgaaaatatt gacggctatt taacagctag ttcatgggat 960
cgtccaacag gtatTTTtacg taacggaaca gactgggaac cttctacaga tacagatttc 1020
agaccaatat tgcagtggtg gtggccagat aagaacaccc aggtcaatta tttaaattac 1080
atggctgatt tagggTTTat cagtaatgcg gacagTTTTg aaactgggga tagccaaagc 1140
ttattaaatg aagcaagtaa ctatgttcaa aatcaattg aatgaaaat tagtgcgcaa 1200
caaagtacag agtggTtaa ggatgcaatg gcggccttca ttgtcgcgca accacagtgg 1260
aatgaaacta gtgaagatat gagcaatgac catttacaaa atggcgcatt aacttatgtc 1320
aacagtccac tgacacctga cgctaattca aactttagac tacttaatcg gacaccaaca 1380
aaccagactg gtgaacaagc gtataattta gataattcaa aaggTggTtt tgaattgttg 1440
ttagccaatg acgttgataa ttcaaaccct gtagtacaag cagaacaatt gaattggTta 1500
tattatTTTaa tgaatTTTgg tacgattacg gccaacgacg cggatgctaa ttttgatggt 1560
attcgtgtag atgcagtcga caatgtggat gctgatttgt taaaaattgc tgccgattat 1620
ttcaaactag cttacggTgt tgatcaaaat gatgctactg ctaatcagca tctttcaatt 1680
ttggaagatt ggagtcacaa tgatcctTtg tatgtaacag atcaaggaag caatcaatta 1740
accatggatg attatgtgca cacacaatta atctggTctc taacaaaatc atctgacata 1800
cgaggtacaa tgcagcgctt cgtggattat tatatggTgg atcgatctaa tgatagtaca 1860
gaaaacgaag ccattcctaa ttacagcttt gtacgtgcac acgacagcga agtgcaaacg 1920
gttattgccc aaattgtTtc cgatttgtat cctgatgttg aaaatagTtt agcaccaaca 1980
acagaacaat tggcagctgc tttcaaagta tacaatgaag atgaaaaaatt agcagacaaa 2040
aagtacacac aatataatat ggctagtGct tatgcgatgt tgctaaccaa taaggatact 2100
gttcctcgtg tctattatgg cgatttatat acagatgatg gtcaatatat ggcaacaaag 2160
tcaccatact atgatgcat taacactTtg ctaaaggcta gagttcagta tgttgctggT 2220
ggccaatcga tgtccgtTga tagtaatgac gtgttaacaa gtgttcgcta tggtaaagat 2280
gccatgacag cttctgacac tggaacatct gagacgcgta ctgaaggTat tggagTcatc 2340
gtcagcaata acgcggagct acaattagag gatgggcata ctgtcacatt gcatatgggg 2400
gcagctcata agaaccaagc ttatcgtGct ttgttatcaa caactgcaga tggattagct 2460
tattatgata ctgatgaaaa tgcacctgtg gcgtacacag atgctaacgg cgatttGatt 2520
tttacgaatg aatcaattta tgggtgacaa aatccacaag tttctggTta cttggcagtt 2580

ES 2 800 724 T3

tgggttccgg taggtgcgca acaagatcaa gatgcacgaa cggcctctga tacaacaaca 2640
aacacgagtg ataaagtgtt ccattcaaac gctgctcttg atttcaagt catctacgaa 2700
ggtttctcaa acttccaagc atttgctaca gacagcagtg aatatacaaa cgtagtcatc 2760
gctcagaatg cggaccaatt taagcaatgg ggtgtgacaa gcttccaatt ggcaccacaa 2820
tatcgttcaa gtacagatac aagtttcttg gattcaatta ttcaaaacgg gtatgcattc 2880
acggatcgtt atgacttagg ttatggcaca ccgacaaaat atggaactgc tgatcagttg 2940
cgcgatgcta ttaaagcctt acatgctagc ggtattcaag ccattgccga ttgggtgccg 3000
gaccaaattt ataatttgcc agagcaagaa ttagctactg tcacaagaac aaattcattt 3060
ggagatgacg atacagattc tgatattgac aatgccttat atgttgata aagtcgtggg 3120
gggtgtcaat atcaagagat gtatggtggt gccttcttag aagagttaca ggcactctat 3180
ccatccctat ttaaagtga tcaaactca actggcgctt caattgatgg cagtgtaaag 3240
attactgagt gggcggctaa gtacttcaat ggctctaaca tccaaggtaa aggtgctgga 3300
tacgtattga aagatatggg ttctaataag tactttaagg tcgtttcgaa cactgaggat 3360
ggtgactact taccaaaaca gttaactaat gatctgtcag aaactggctt tacacacgat 3420
gataaaggaa tcatctatta tacattaagt ggttatcgtg cccaaaatgc atttattcaa 3480
gatgatgata ataactatta ctattttgat aaaacaggtc atttagtaac aggtttgcaa 3540
aagattaata accataccta cttcttctta cctaattgta tcgaactggt caagagcttc 3600
ttacaaaacg aagatggtac aattgtttat ttcgataaga aaggatcatca agttttgat 3660
caatatataa ctgatcaaaa tggaaatgcg tattactttg atgatgctgg tgtaatgctt 3720
aaatcagggc ttgcaacgat tgatggacat caacagtatt ttgatcaaaa tgggtgtgag 3780
gttaaggata agtttgtgat tggcactgat ggttataagt attactttga accaggtagt 3840
ggtaacttag ctatcctacg ttatgtgcaa aatagtaaga atcaatggtt ctattttgat 3900
ggtaatggcc atgctgtcac tggtttcaa acaattaatg gtaaaaaaca atatctctat 3960
aatgatggtc atcaaagtaa aggtgaattc attgatgagc acgggtacaa gggcgagctt 4020
gaaggtaagc ctatccctaa ccctctctc ggtctcgatt ctacgcgtac cggatcatcat 4080
caccatcacc at 4092

5 <210> 3
<211> 3495
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Dextrano sacarasa truncada
<400> 3

atgggatctg ataaaattat tcatctgact gatgattctt ttgatactga tgtacttaag 60
gcagatggtg caatcctggt tgatttctgg gcacactggt gcgggtccgtg caaaatgatc 120
gctccgattc tggatgaaat cgctgacgaa tatcagggca aactgaccgt tgcaaaaactg 180

ES 2 800 724 T3

aacatcgatc acaacccggg cactgcgccg aaatatggca tccgtggtat cccgactctg 240
ctgctgttca aaaacgggtga agtggcgcca accaaagtgg gtgcaactgtc taaagggtcag 300
ttgaaagagt tcctcgacgc taacctggcc ggctctggat ccggtgatga cgatgacaag 360
ctcgccctta tgacacaaca agttagcggc aagtacgttg aaaaagacgg tagttggtat 420
tattatTTTTg atgatggcaa aaatgctaaa ggtttatcaa cgatagacaa caatattcaa 480
tatttttacg agagtggtaa acaagccaaa ggacagtatg tcacaattga taatcaaaca 540
tattatTTTTg ataagggtc aggtgatgag ttaactggc tgcaaagcat tgatgggaac 600
atagttgctt ttaacgatga agggcaacaa atttttaatc aatattacca atctgaaaat 660
ggtacaacat actactttga tgataaagga cacgctgcta ccggtattaa gaatatcgag 720
ggcaaaaatt attatTTTTg taatcttggg caactaaaaa aaggcttctc tgggtgtgatt 780
gatggtcaaa taatgacatt tgatcaggaa acagggcaag aagtttctaa cacaacttct 840
gaaataaaag aaggtttgac gactcaaac acggattata gcgaacataa tgcagcccac 900
ggtacggatg ctgaggactt tgaaaatatt gacggctatt taacagctag ttcattggtat 960
cgtccaacag gtatTTTTacg taacggaaca gactgggaac cttctacaga tacagatttc 1020
agaccaatat tgtcagtgtg gtggccagat aagaacacc aggtcaatta tttaaattac 1080
atggctgatt tagggtttat cagtaatgcg gacagttttg aaactgggga tagccaaagc 1140
ttattaaatg aagcaagtaa ctatgttcaa aaatcaattg aaatgaaaat tagtgcgcaa 1200
caaagtacag agtgggttaa ggatgcaatg gcggccttca ttgtcgcgca accacagtgg 1260
aatgaaacta gtgaagatat gagcaatgac catttacaaa atggcgcatt aacttatgtc 1320
aacagtccac tgacacctga cgctaattca aactttagac tacttaatcg gacaccaaca 1380
aaccagactg gtgaacaagc gtataattta gataattcaa aagggtggtt tgaattggtg 1440
ttagccaatg acgttgataa ttcaaaccct gtagtacaag cagaacaatt gaattgggta 1500
tattatTTTaa tgaattttgg tacgattacg gccaacgacg cggatgctaa ttttgatggt 1560
attcgtgtag atgcagtcga caatgtggat gctgatttgt tacaattgc tgccgattat 1620
ttcaaactag cttacggtgt tgatcaaat gatgctactg ctaatcagca tctttcaatt 1680
ttggaagatt ggagtcacaa tgatcctttg tatgtaacag atcaaggaag caatcaatta 1740
accatggatg attatgtgca cacacaatta atctgggtctc taacaaaatc atctgacata 1800
cgaggtacaa tgcagcgctt cgtggattat tatatgggtg atcgatctaa tgatagtaca 1860
gaaaacgaag ccattcctaa ttacagcttt gtacgtgcac acgacagcga agtgcaaacg 1920
gttattgccc aaattgtttc cgatttgat cctgatgttg aaaatagttt agcaccaaca 1980
acagaacaat tggcagctgc tttcaaagta tacaatgaag atgaaaaatt agcagacaaa 2040
aagtacacac aatataatat ggctagtgtc tatgcatgtg tgctaaccaa taaggatact 2100
gttcctcgtg tctattatgg cgatttatat acagatgatg gtcaatatat ggcaacaaag 2160
tcaccatact atgatgcgat taacactttg ctaaaggcta gagttcagta tgttgctggt 2220

ES 2 800 724 T3

ggccaatcga tgtccgttga tagtaatgac gtgtaacaa gtgttcgcta tggtaaagat 2280
gccatgacag cttctgacac tggaacatct gagacgcgta ctgaaggat tggagtcac 2340
gtcagcaata acgcggagct acaattagag gatgggcata ctgtcacatt gcatatggg 2400
gcagctcata agaaccaagc ttatcgtgct ttgttatcaa caactgcaga tggattagct 2460
tattatgata ctgatgaaaa tgcacctgtg gcgtacacag atgctaacgg cgatttgatt 2520
tttacgaatg aatcaattta tgggtgtacaa aatccacaag tttctgggta cttggcagtt 2580
tggggtccgg taggtgcgca acaagatcaa gatgcacgaa cggcctctga tacaacaaca 2640
aacacgagtg ataaagtgtt ccattcaaac gctgctcttg attctcaagt catctacgaa 2700
ggtttctcaa acttccaagc atttgctaca gacagcagtg aatatacaaa cgtagtcac 2760
gctcagaatg cggaccaatt taagcaatgg ggtgtgacaa gcttccaatt ggcaccacaa 2820
tatcgttcaa gtacagatac aagtttcttg gattcaatta ttcaaacgg gtatgcattc 2880
acggatcggt atgacttagg ttatggcaca ccgacaaaat atggaactgc tgatcagttg 2940
cgcgatgcta ttaaagcctt acatgctagc ggtattcaag ccattgccga ttgggtgccg 3000
gaccaaattt ataatttgcc agagcaagaa ttagctactg tcacaagaac aaattcattt 3060
ggagatgacg atacagattc tgatattgac aatgccttat atgttgtaaca aagtcgtggg 3120
ggtggtcaat atcaagagat gtatggtggt gccttcttag aagagttaca ggcactctat 3180
ccatccctat ttaaagtga tcaaatctca actggcgctt caattgatgg cagtgtaaag 3240
attactgagt gggcggctaa gtacttcaat ggctctaaca tccaaggtaa aggtgctgga 3300
tacgtattga aagatatggg ttctaataag tactttaagg tcgtttcgaa cactgaggat 3360
ggtgactact taccaaaaca gttaactaat gatctgtcag aaactggcta caagggcgag 3420
cttgaaggta agcctatccc taaccctctc ctcggtctcg attctacgcg taccgggtcat 3480
catcaccatc accat 3495

<210> 4
<211> 3105
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Dextrano sacarasa truncada

10

<400> 4

atgggatctg ataaaattat tcatctgact gatgattctt ttgatactga tgtacttaag 60
gcagatggtg caatcctggt tgatttctgg gcacactggt gcggtccgtg caaaatgatc 120
gctccgattc tggatgaaat cgctgacgaa tatcagggca aactgaccgt tgcaaaactg 180
aacatcgatc acaaccggg cactgcgccg aaatatggca tccgtggtat cccgactctg 240
ctgctgttca aaaacggtga agtggcggca accaaagtgg gtgactgtc taaaggtcag 300
ttgaaagagt tcctcgacgc taacctggcc ggctctggat ccggtgatga cgatgacaag 360
ctcgccctta tgggcttctc tgggtgtgatt gatggtcaaa taatgacatt tgatcaggaa 420

ES 2 800 724 T3

acagggcaag aagtttctaa cacaacttct gaaataaaaag aaggtttgac gactcaaaac 480
 acggattata gcgaacataa tgcagcccac ggtacggatg ctgaggactt tgaaaatatt 540
 gacggctatt taacagctag ttcattggtat cgtccaacag gtattttacg taacggaaca 600
 gactgggaac cttctacaga tacagatttc agaccaatat tgtcagtgtg gtggccagat 660
 aagaacacc aggtcaatta tttaaattac atggctgatt tagggtttat cagtaatgcg 720
 gacagttttg aaactgggga tagccaaagc ttattaaatg aagcaagtaa ctatgttcaa 780
 aatcaattg aatgaaaat tagtgcgcaa caagtacag agtggttaaa ggatgcaatg 840
 gcggccttca ttgtcgcgca accacagtgg aatgaaacta gtgaagatat gagcaatgac 900
 catttcaaaa atggcgcatt aacttatgtc aacagtccac tgacacctga cgtaattca 960
 aactttagac tacttaatcg gacaccaaca aaccagactg gtgaacaagc gtataattta 1020
 gataattcaa aaggtggttt tgaattgttg ttagccaatg acgttgataa ttcaaacctt 1080
 gtagtacaag cagaacaatt gaattggtta tattatttaa tgaattttgg tacgattacg 1140
 gccaacgacg cggatgctaa ttttgatggg attcgtgtag atgcagtcga caatgtggat 1200
 gctgatttgc tacaattgca tgccgattat ttcaaacctag cttacgggtg tgatcaaaat 1260
 gatgctactg ctaatcagca tctttcaatt ttggaagatt ggagtcacaa tgatcctttg 1320
 tatgtaacag atcaaggaag caatcaatta accatggatg attatgtgca cacacaatta 1380
 atctggtctc taacaaaatc atctgacata cgagggtacaa tgcagcgctt cgtggattat 1440
 tatatggtgg atcgatctaa tgatagtaca gaaaacgaag ccattcctaa ttacagcttt 1500
 gtacgtgcac acgacagcga agtgcaaacg gttattgccc aaattgtttc cgatttgtat 1560
 cctgatgttg aaaatagttt agcaccaaca acagaacaat tggcagctgc tttcaaagta 1620
 tacaatgaag atgaaaaatt agcagacaaa aagtacacac aatataatat ggctagtgtc 1680
 tatgcatgat tgctaacca taaggatact gttcctcgtg tctattatgg cgatttatat 1740
 acagatgatg gtcaatatat ggcaacaaag tcaccatact atgatgcatg taacactttg 1800
 ctaaaggcta gagttcagta tgttgctggt ggccaatcga tgtccggtga tagtaatgac 1860
 gtgttaacaa gtgttcgcta tggtaaagat gccatgacag cttctgacac tggaacatct 1920
 gagacgcgta ctgaaggat tggagtcac gtcagcaata acgaggagct acaattagag 1980
 gatgggcata ctgtcacatt gcatatgggg gcagctcata agaaccaagc ttatcgtgct 2040
 ttgttatcaa caactgcaga tggattagct tattatgata ctgatgaaaa tgcacctgtg 2100
 gcgtacacag atgctaacgg cgatttgatt tttacgaatg aatcaattta tgggtgtacaa 2160
 aatccacaag tttctgggta cttggcagtt tgggttccgg taggtgca acaagatcaa 2220
 gatgcacgaa cggcctctga tacaacaaca aacacgagtg ataaagtgtt ccattcaaac 2280
 gctgctcttg attctcaagt catctacgaa ggtttctcaa acttccaagc atttgtaca 2340
 gacagcagtg aatatacaaa cgtagtcac gctcagaatg cggaccaatt taagcaatgg 2400
 ggtgtgacaa gcttccaatt ggcaccacaa tctcgttcaa gtacagatac aagtttcttg 2460

ES 2 800 724 T3

gattcaatta ttcaaacgg gtatgcattc acggatcggt atgacttagg ttatggcaca 2520
 ccgacaaaat atggaactgc tgatcagttg cgcgatgcta ttaaagcctt acatgctagc 2580
 ggtattcaag ccattgccga ttgggtgccg gaccaaattt ataatttgcc agagcaagaa 2640
 ttagctactg tcacaagaac aaattcattt ggagatgacg atacagattc tgatattgac 2700
 aatgccttat atgttgatca aagtcgtggg ggtgggtcaat atcaagagat gtatgggtgg 2760
 gccttcttag aagagttaca ggcactctat ccatccctat ttaaagtga tcaaatctca 2820
 actggcgctc caattgatgg cagtgtaaag attactgagt gggcggctaa gtacttcaat 2880
 ggctctaaca tccaaggtaa aggtgctgga tacgtattga aagatatggg ttctaataag 2940
 tactttaagg tcgtttcgaa cactgaggat ggtgactact taccaaaaca gttaactaat 3000
 gatctgtcag aaactggcta caagggcgag cttgaaggta agcctatccc taaccctctc 3060
 ctcggtctcg attctacgag taccggtcat catcaccatc accat 3105

<210> 5
 <211> 4356
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Dextrano sacarasa mutante

10

<400> 5

atgggatctg ataaaattat tcatctgact gatgattctt ttgatactga tgtacttaag 60
 gcagatgggt caatcctggg tgatttctgg gcacactggg gcgggtccgtg caaaatgatc 120
 gctccgattc tggatgaaat cgctgacgaa tatcagggca aactgaccgt tgcaaaaactg 180
 aacatcgatc acaaccggg cactgcgccg aaatatggca tccgtgggat cccgactctg 240
 ctgctgttca aaaacgggtga agtggcgcca accaaagtgg gtgcactgtc taaaggtcag 300
 ttgaaagagt tcctcgacgc taacctggcc ggctctggat ccggtgatga cgatgacaag 360
 ctcgccctta tgacacaaca agttagcggc aagtacgttg aaaaagacgg tagttgggat 420
 tattattttg atgatggcaa aaatgctaaa ggtttatcaa cgatagacaa caatattcaa 480
 tatttttacg agagtggtaa acaagccaaa ggacagtatg tcacaattga taatcaaaaca 540
 tattattttg ataagggctc aggtgatgag ttaactggct tgcaaagcat tgatgggaac 600
 atagttgctt ttaacgatga agggcaacaa atttttaatc aatattacca atctgaaaat 660
 ggtacaacat actactttga tgataaagga cacgctgcta ccggtattaa gaatatcgag 720
 ggcaaaaatt attattttga taatcttggg caactaaaaa aaggcttctc tgggtgtgatt 780
 gatggtcaaa taatgacatt tgatcaggaa acagggcaag aagtttctaa cacaacttct 840
 gaaataaaag aaggtttgac gactcaaac acggattata gcgaacataa tgcagcccac 900
 ggtacggatg ctgaggactt tgaaaatatt gacggctatt taacagctag ttcatgggat 960
 cgtccaacag gtattttacg taacggaaca gactgggaac cttctacaga tacagatttc 1020
 agaccaatat tgtcagtgtg gtggccagat aagaacaccc aggtcaatta tttaaattac 1080

ES 2 800 724 T3

atggctgatt tagggtttat cagtaatgcg gacagttttg aaactgggga tagccaaagc 1140
ttattaaatg aagcaagtaa ctatgttcaa aatcaattg aaatgaaaat tagtgcgcaa 1200
caaagtacag agtgggttaa ggatgcaatg gcggccttca ttgtcgcgca accacagtgg 1260
aatgaaacta gtgaagatat gagcaatgac catttacaaa atggcgcatt aacttatgtc 1320
aacagtccac tgacacctga cgctaattca aactttagac tacttaatcg gacaccaaca 1380
aaccagactg gtgaacaagc gtataattta gataattcaa aagggtggttt tgaattggtg 1440
ttagccaatg acgttgataa ttcaaaccct gtagtacaag cagaacaatt gaattgggta 1500
tattatttaa tgaattttgg tacgattacg gccaacgacg cggatgctaa ttttgatggt 1560
attcgtgtag atgcagtcga caatgtggat gctgatttgt taaaaattgc tgccgattat 1620
ttcaaactag cttacggtgt tgatcaaaaat gatgctactg ctaatcagca tctttcaatt 1680
ttggaagatt ggagtcacaa tgatcctttg tatgtaacag atcaaggaag caatcaatta 1740
accatggatg attatgtgca cacacaatta atctgggtctc taacaaaatc atctgacata 1800
cgaggtacaa tgcagcgctt cgtggattat tatatgggtg atcgatctaa tgatagtaca 1860
gaaaacgaag ccattcctaa ttacagcttt gtacgagctc acgactacga cgcgcaaacg 1920
gttattgccc aaattgtttc cgatttgtat cctgatgttg aaaatagttt agcaccaaca 1980
acagaacaat tggcagctgc tttcaaagta tacaatgaag atgaaaaatt agcagacaaa 2040
aagtacacac aatataatat ggctagtgtc tatgcatgtg tgctaaccaa taaggatact 2100
gttcctcgtg tctattatgg cgatttatat acagatgatg gtcaatatat ggcaacaaag 2160
tcaccatact atgatgcgat taacactttg ctaaaggcta gagttcagta tgttgctggt 2220
ggccaatcga tgtccgttga tagtaatgac gtgttaacaa gtgttcgcta tggtaaagat 2280
gccatgacag cttctgacac tggaacatct gagacgcgta ctgaaggat tggagtcac 2340
gtcagcaata acgcgagct acaattagag gatgggcata ctgtcacatt gcatatgggg 2400
gcagctcata agaaccaagc ttatcgtgct ttgttatcaa caactgcaga tggattagct 2460
tattatgata ctgatgaaaa tgcacctgtg gcgtacacag atgctaacgg cgatttgatt 2520
tttacgaatg aatcaattta tgggtgtaca aatccacaag tttctgggta cttggcagtt 2580
tgggttccgg taggtgcgca acaagatcaa gatgcacgaa cggcctctga tacaacaaca 2640
aacacgagtg ataaagtgtt ccattcaaac gctgctcttg attctcaagt catctacgaa 2700
ggtttctcaa acttccaagc atttgctaca gacagcagtg aatatacaaa cgtagtcac 2760
gctcagaatg cggaccaatt taagcaatgg ggtgtgacaa gcttccaatt ggcaccacaa 2820
tatcgttcaa gtacagatac aagtttcttg gattcaatta ttcaaacgg gtatgcattc 2880
acggatcgtt atgacttagg ttatggcaca ccgacaaaat atggaactgc tgatcagttg 2940
cgcgatgcta ttaaagcctt acatgctagc ggtattcaag ccattgccga ttgggtgccc 3000
gaccaaattt ataatttgcc agagcaagaa ttagctactg tcacaagaac aaattcattt 3060
ggagatgacg atacagattc tgatattgac aatgccttat atgttggtaca aagtcgtggg 3120

ES 2 800 724 T3

```

ggtggtcaat atcaagagat gtatggtggt gccttcttag aagagttaca ggcactctat 3180
ccatccctat ttaaagtgaa tcaaatctca actggcgttc caattgatgg cagtgtaaag 3240
attactgagt gggcggctaa gtacttcaat ggctctaaca tccaaggtaa aggtgctgga 3300
tacgtattga aagatatggg ttctaataag tactttaagg tcgtttcgaa cactgaggat 3360
ggtgactact taccaaaaca gttaactaat gatctgtcag aaactggctt tacacacgat 3420
gataaaggaa tcatctatta tacattaagt ggttatcgtg cccaaaatgc atttattcaa 3480
gatgatgata ataactatta ctattttgat aaaacaggtc atttagtaac aggtttgcaa 3540
aagattaata accataccta ctcttctta cctaattggtc tcgaaactggt caagagcttc 3600
ttacaaaacg aagatggtac aattgtttat ttcgataaga aaggatcatca agtttttgat 3660
caatatataa ctgatcaaaa tggaaatgcg tattactttg atgatgctgg tgtaatgctt 3720
aaatcagggc ttgcaacgat tgatggacat caacagtatt ttgatcaaaa tgggtgtgcag 3780
gttaaggata agtttgatgat tggcactgat ggttataagt attactttga accaggtagt 3840
ggtaacttag ctatcctacg ttatgtgcaa aatagtaaga atcaatggtt ctattttgat 3900
ggtaatggcc atgctgtcac tggtttccaa acaattaatg gtaaaaaaca atatctctat 3960
aatgatggtc atcaaagtaa aggtgaattc attgatgcag acggggatac tttctatacg 4020
agtgccactg atggctgcct agtaactggt gttcagaaga ttaatggtat tacctatgct 4080
tttgataaca caggaaattt gatcacaaat cagtattatc aattagcaga tggtaaatat 4140
atgttgtag atgatagtgg tcgtgcaaaa acagggtttg tattgcaaga tgggtgacta 4200
agatacttcg atcaaaacgg tgagcaagtg aaagatgcta tcattgtgga tccagatact 4260
aacttgagtt acaagggcga gcttgaaggt aagcctatcc ctaaccctct cctcggctc 4320
gattctacgc gtaccggtca tcatcaccat caccat 4356

```

<210> 6
 <211> 1452
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Dextrano sacarasa truncada

10

<400> 6

```

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

```

ES 2 800 724 T3

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

ES 2 800 724 T3

Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn
 340 345 350
 Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser
 355 360 365
 Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser Leu Leu Asn Glu
 370 375 380
 Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys Ile Ser Ala Gln
 385 390 395 400
 Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala Phe Ile Val Ala
 405 410 415
 Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser Asn Asp His Leu
 420 425 430
 Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu Thr Pro Asp Ala
 435 440 445
 Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly
 450 455 460
 Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu
 465 470 475 480
 Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Gln
 485 490 495
 Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn
 500 505 510
 Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Asp Asn
 515 520 525
 Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala
 530 535 540
 Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu Ser Ile
 545 550 555 560
 Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly
 565 570 575
 Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu Ile Trp
 580 585 590
 Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg Phe Val
 595 600 605

ES 2 800 724 T3

Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala
 610 615 620
 Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr
 625 630 635 640
 Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser
 645 650 655
 Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn
 660 665 670
 Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala
 675 680 685
 Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val
 690 695 700
 Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys
 705 710 715 720
 Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln
 725 730 735
 Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu
 740 745 750
 Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly
 755 760 765
 Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn
 770 775 780
 Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly
 785 790 795 800
 Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala
 805 810 815
 Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr
 820 825 830
 Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly
 835 840 845
 Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val
 850 855 860
 Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr
 865 870 875 880

ES 2 800 724 T3

Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln
 885 890 895
 Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser
 900 905 910
 Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys
 915 920 925
 Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser
 930 935 940
 Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe
 945 950 955 960
 Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr
 965 970 975
 Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser Gly Ile
 980 985 990
 Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Glu
 995 1000 1005
 Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp Asp
 1010 1015 1020
 Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser
 1025 1030 1035
 Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu
 1040 1045 1050
 Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
 1055 1060 1065
 Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu
 1070 1075 1080
 Trp Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly
 1085 1090 1095
 Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys
 1100 1105 1110
 Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu
 1115 1120 1125
 Thr Asn Asp Leu Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp Lys Gly
 1130 1135 1140

ES 2 800 724 T3

Ile Ile Tyr Tyr Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala Phe
1145 1150 1155

Ile Gln Asp Asp Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly
1160 1165 1170

His Leu Val Thr Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe
1175 1180 1185

Phe Leu Pro Asn Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn
1190 1200

Glu Asp Gly Thr Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val
1205 1210 1215

Phe Asp Gln Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe
1220 1225 1230

Asp Asp Ala Gly Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp
1235 1240 1245

Gly His Gln Gln Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp
1250 1255 1260

Lys Phe Val Ile Gly Thr Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro
1265 1270 1275

Gly Ser Gly Asn Leu Ala Ile Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys
1280 1285 1290

Asn Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Gly Asn Gly His Ala Val Thr Gly
1295 1300 1305

Phe Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly
1310 1315 1320

His Gln Ser Lys Gly Glu Phe Ile Asp Ala Asp Gly Asp Thr Phe
1325 1330 1335

Tyr Thr Ser Ala Thr Asp Gly Arg Leu Val Thr Gly Val Gln Lys
1340 1345 1350

Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Ala Phe Asp Asn Thr Gly Asn Leu Ile
1355 1360 1365

Thr Asn Gln Tyr Tyr Gln Leu Ala Asp Gly Lys Tyr Met Leu Leu
1370 1375 1380

Asp Asp Ser Gly Arg Ala Lys Thr Gly Phe Val Leu Gln Asp Gly
1385 1390 1395

ES 2 800 724 T3

Val Leu Arg Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Glu Gln Val Lys Asp Ala
 1400 1405 1410
 Ile Ile Val Asp Pro Asp Thr Asn Leu Ser Tyr Lys Gly Glu Leu
 1415 1420 1425
 Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 1430 1435 1440
 Arg Thr Gly His His His His His His
 1445 1450

5 <210> 7
 <211> 1364
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Dextrano sacarasa truncada
 <400> 7

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

ES 2 800 724 T3

				165					170					175			
Asp	Asn	Gln	Thr 180	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Lys 185	Gly	Ser	Gly	Asp	Glu 190	Leu	Thr		
Gly	Leu	Gln 195	Ser	Ile	Asp	Gly	Asn 200	Ile	Val	Ala	Phe	Asn 205	Asp	Glu	Gly		
Gln	Gln 210	Ile	Phe	Asn	Gln	Tyr 215	Tyr	Gln	Ser	Glu	Asn 220	Gly	Thr	Thr	Tyr		
Tyr 225	Phe	Asp	Asp	Lys	Gly 230	His	Ala	Ala	Thr	Gly 235	Ile	Lys	Asn	Ile	Glu 240		
Gly	Lys	Asn	Tyr	Tyr 245	Phe	Asp	Asn	Leu	Gly 250	Gln	Leu	Lys	Lys	Gly 255	Phe		
Ser	Gly	Val	Ile 260	Asp	Gly	Gln	Ile	Met 265	Thr	Phe	Asp	Gln	Glu 270	Thr	Gly		
Gln	Glu	Val 275	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser 280	Glu	Ile	Lys	Glu	Gly 285	Leu	Thr	Thr		
Gln	Asn 290	Thr	Asp	Tyr	Ser	Glu 295	His	Asn	Ala	Ala	His 300	Gly	Thr	Asp	Ala		
Glu 305	Asp	Phe	Glu	Asn	Ile 310	Asp	Gly	Tyr	Leu	Thr 315	Ala	Ser	Ser	Trp	Tyr 320		
Arg	Pro	Thr	Gly	Ile 325	Leu	Arg	Asn	Gly	Thr 330	Asp	Trp	Glu	Pro	Ser 335	Thr		
Asp	Thr	Asp	Phe 340	Arg	Pro	Ile	Leu	Ser 345	Val	Trp	Trp	Pro	Asp 350	Lys	Asn		
Thr	Gln	Val 355	Asn	Tyr	Leu	Asn	Tyr 360	Met	Ala	Asp	Leu	Gly 365	Phe	Ile	Ser		
Asn	Ala 370	Asp	Ser	Phe	Glu	Thr 375	Gly	Asp	Ser	Gln	Ser 380	Leu	Leu	Asn	Glu		
Ala 385	Ser	Asn	Tyr	Val	Gln 390	Lys	Ser	Ile	Glu	Met 395	Lys	Ile	Ser	Ala	Gln 400		
Gln	Ser	Thr	Glu	Trp 405	Leu	Lys	Asp	Ala	Met 410	Ala	Ala	Phe	Ile	Val 415	Ala		
Gln	Pro	Gln	Trp 420	Asn	Glu	Thr	Ser	Glu 425	Asp	Met	Ser	Asn	Asp 430	His	Leu		
Gln	Asn	Gly	Ala	Leu	Thr	Tyr	Val	Asn	Ser	Pro	Leu	Thr	Pro	Asp	Ala		

ES 2 800 724 T3

435					440					445					
Asn	Ser	Asn	Phe	Arg	Leu	Leu	Asn	Arg	Thr	Pro	Thr	Asn	Gln	Thr	Gly
	450					455					460				
Glu	Gln	Ala	Tyr	Asn	Leu	Asp	Asn	Ser	Lys	Gly	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu
465					470					475					480
Leu	Ala	Asn	Asp	Val	Asp	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Val	Gln	Ala	Glu	Gln
				485					490					495	
Leu	Asn	Trp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asn	Phe	Gly	Thr	Ile	Thr	Ala	Asn
			500					505					510		
Asp	Ala	Asp	Ala	Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Arg	Val	Asp	Ala	Val	Asp	Asn
		515					520					525			
Val	Asp	Ala	Asp	Leu	Leu	Gln	Ile	Ala	Ala	Asp	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ala
	530					535					540				
Tyr	Gly	Val	Asp	Gln	Asn	Asp	Ala	Thr	Ala	Asn	Gln	His	Leu	Ser	Ile
545					550					555					560
Leu	Glu	Asp	Trp	Ser	His	Asn	Asp	Pro	Leu	Tyr	Val	Thr	Asp	Gln	Gly
				565					570					575	
Ser	Asn	Gln	Leu	Thr	Met	Asp	Asp	Tyr	Val	His	Thr	Gln	Leu	Ile	Trp
			580					585					590		
Ser	Leu	Thr	Lys	Ser	Ser	Asp	Ile	Arg	Gly	Thr	Met	Gln	Arg	Phe	Val
		595					600					605			
Asp	Tyr	Tyr	Met	Val	Asp	Arg	Ser	Asn	Asp	Ser	Thr	Glu	Asn	Glu	Ala
	610					615					620				
Ile	Pro	Asn	Tyr	Ser	Phe	Val	Arg	Ala	His	Asp	Ser	Glu	Val	Gln	Thr
625					630					635					640
Val	Ile	Ala	Gln	Ile	Val	Ser	Asp	Leu	Tyr	Pro	Asp	Val	Glu	Asn	Ser
				645					650					655	
Leu	Ala	Pro	Thr	Thr	Glu	Gln	Leu	Ala	Ala	Ala	Phe	Lys	Val	Tyr	Asn
			660					665					670		
Glu	Asp	Glu	Lys	Leu	Ala	Asp	Lys	Lys	Tyr	Thr	Gln	Tyr	Asn	Met	Ala
		675					680					685			
Ser	Ala	Tyr	Ala	Met	Leu	Leu	Thr	Asn	Lys	Asp	Thr	Val	Pro	Arg	Val
					695						700				
Tyr	Tyr	Gly	Asp	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Gly	Gln	Tyr	Met	Ala	Thr	Lys

ES 2 800 724 T3

980					985					990					
Gln	Ala	Ile	Ala	Asp	Trp	Val	Pro	Asp	Gln	Ile	Tyr	Asn	Leu	Pro	Glu
		995					1000					1005			
Gln	Glu	Leu	Ala	Thr	Val	Thr	Arg	Thr	Asn	Ser	Phe	Gly	Asp	Asp	
	1010					1015					1020				
Asp	Thr	Asp	Ser	Asp	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Tyr	Val	Val	Gln	Ser	
	1025					1030					1035				
Arg	Gly	Gly	Gly	Gln	Tyr	Gln	Glu	Met	Tyr	Gly	Gly	Ala	Phe	Leu	
	1040					1045					1050				
Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser	Leu	Phe	Lys	Val	Asn	Gln	
	1055					1060					1065				
Ile	Ser	Thr	Gly	Val	Pro	Ile	Asp	Gly	Ser	Val	Lys	Ile	Thr	Glu	
	1070					1075					1080				
Trp	Ala	Ala	Lys	Tyr	Phe	Asn	Gly	Ser	Asn	Ile	Gln	Gly	Lys	Gly	
	1085					1090					1095				
Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Met	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Phe	Lys	
	1100					1105					1110				
Val	Val	Ser	Asn	Thr	Glu	Asp	Gly	Asp	Tyr	Leu	Pro	Lys	Gln	Leu	
	1115					1120					1125				
Thr	Asn	Asp	Leu	Ser	Glu	Thr	Gly	Phe	Thr	His	Asp	Asp	Lys	Gly	
	1130					1135					1140				
Ile	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Leu	Ser	Gly	Tyr	Arg	Ala	Gln	Asn	Ala	Phe	
	1145					1150					1155				
Ile	Gln	Asp	Asp	Asp	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Lys	Thr	Gly	
	1160					1165					1170				
His	Leu	Val	Thr	Gly	Leu	Gln	Lys	Ile	Asn	Asn	His	Thr	Tyr	Phe	
	1175					1180					1185				
Phe	Leu	Pro	Asn	Gly	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	
	1190					1195					1200				
Glu	Asp	Gly	Thr	Ile	Val	Tyr	Phe	Asp	Lys	Lys	Gly	His	Gln	Val	
	1205					1210					1215				
Phe	Asp	Gln	Tyr	Ile	Thr	Asp	Gln	Asn	Gly	Asn	Ala	Tyr	Tyr	Phe	
	1220					1225					1230				
Asp	Asp	Ala	Gly	Val	Met	Leu	Lys	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Asp	

ES 2 800 724 T3

1235		1240		1245
Gly His 1250	Gln Gln Tyr Phe	Asp 1255	Gln Asn Gly Val	Gln Val Lys Asp 1260
Lys Phe 1265	Val Ile Gly Thr	Asp 1270	Gly Tyr Lys Tyr	Tyr Phe Glu Pro 1275
Gly Ser 1280	Gly Asn Leu Ala	Ile 1285	Leu Arg Tyr Val	Gln Asn Ser Lys 1290
Asn Gln 1295	Trp Phe Tyr Phe	Asp 1300	Gly Asn Gly His	Ala Val Thr Gly 1305
Phe Gln 1310	Thr Ile Asn Gly	Lys 1315	Lys Gln Tyr Phe	Tyr Asn Asp Gly 1320
His Gln 1325	Ser Lys Gly Glu	Phe 1330	Ile Asp Ala Asp	Gly Tyr Lys Gly 1335
Glu Leu 1340	Glu Gly Lys Pro	Ile 1345	Pro Asn Pro Leu	Leu Gly Leu Asp 1350
Ser Thr 1355	Arg Thr Gly His	His 1360	His His His His	

<210> 8
 <211> 1165
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Dextrano sacarasa truncada

10

<400> 8

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

ES 2 800 724 T3

Ser Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser
100 105 110

Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Leu Met Thr Gln Gln Val
115 120 125

Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr Tyr Tyr Phe Asp
130 135 140

Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp Asn Asn Ile Gln
145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln Tyr Val Thr Ile
165 170 175

Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly Asp Glu Leu Thr
180 185 190

Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe Asn Asp Glu Gly
195 200 205

Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn Gly Thr Thr Tyr
210 215 220

Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile Lys Asn Ile Glu
225 230 235 240

Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu Lys Lys Gly Phe
245 250 255

Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp Gln Glu Thr Gly
260 265 270

Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu Gly Leu Thr Thr
275 280 285

Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His Gly Thr Asp Ala
290 295 300

Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ser Trp Tyr
305 310 315 320

Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr
325 330 335

Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn
340 345 350

Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser
355 360 365

ES 2 800 724 T3

Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser Leu Leu Asn Glu
 370 375 380
 Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys Ile Ser Ala Gln
 385 390 395 400
 Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala Phe Ile Val Ala
 405 410 415
 Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser Asn Asp His Leu
 420 425 430
 Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu Thr Pro Asp Ala
 435 440 445
 Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly
 450 455 460
 Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu
 465 470 475 480
 Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Gln
 485 490 495
 Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn
 500 505 510
 Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Asp Asn
 515 520 525
 Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala
 530 535 540
 Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu Ser Ile
 545 550 555 560
 Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly
 565 570 575
 Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu Ile Trp
 580 585 590
 Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg Phe Val
 595 600 605
 Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala
 610 615 620
 Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr
 625 630 635 640

ES 2 800 724 T3

Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser
 645 650 655
 Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn
 660 665 670
 Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala
 675 680 685
 Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val
 690 695 700
 Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys
 705 710 715 720
 Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln
 725 730 735
 Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu
 740 745 750
 Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly
 755 760 765
 Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn
 770 775 780
 Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly
 785 790 795 800
 Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala
 805 810 815
 Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr
 820 825 830
 Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly
 835 840 845
 Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val
 850 855 860
 Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr
 865 870 875 880
 Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln
 885 890 895
 Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser
 900 905 910

ES 2 800 724 T3

Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys
 915 920 925

Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser
 930 935 940

Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe
 945 950 955 960

Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr
 965 970 975

Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser Gly Ile
 980 985 990

Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Glu
 995 1000 1005

Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp Asp
 1010 1015 1020

Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser
 1025 1030 1035

Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu
 1040 1045 1050

Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
 1055 1060 1065

Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu
 1070 1075 1080

Trp Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly
 1085 1090 1095

Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys
 1100 1105 1110

Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu
 1115 1120 1125

Thr Asn Asp Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Lys Gly Glu Leu Glu Gly
 1130 1135 1140

Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr
 1145 1150 1155

Gly His His His His His His
 1160 1165

<210> 9
 <211> 1035

ES 2 800 724 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Dextrano sacarasa truncada

<400> 9

Met Gly Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr
 1 5 10 15

Asp Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala His
 20 25 30

Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala
 35 40 45

Asp Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp His
 50 55 60

Asn Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu
 65 70 75 80

Leu Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu
 85 90 95

Ser Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser
 100 105 110

Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Leu Met Gly Phe Ser Gly
 115 120 125

Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp Gln Glu Thr Gly Gln Glu
 130 135 140

Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu Gly Leu Thr Thr Gln Asn
 145 150 155 160

Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His Gly Thr Asp Ala Glu Asp
 165 170 175

Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ser Trp Tyr Arg Pro
 180 185 190

Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr Asp Thr
 195 200 205

Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn Thr Gln
 210 215 220

Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser Asn Ala

ES 2 800 724 T3

500 505 510
 Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser Leu Ala
 515 520 525
 Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn Glu Asp
 530 535 540
 Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala Ser Ala
 545 550 555 560
 Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val Tyr Tyr
 565 570 575
 Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys Ser Pro
 580 585 590
 Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln Tyr Val
 595 600 605
 Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu Thr Ser
 610 615 620
 Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly Thr Ser
 625 630 635 640
 Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn Ala Glu
 645 650 655
 Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly Ala Ala
 660 665 670
 His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala Asp Gly
 675 680 685
 Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr Thr Asp
 690 695 700
 Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly Val Gln
 705 710 715 720
 Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val Gly Ala
 725 730 735
 Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr Asn Thr
 740 745 750
 Ser Asp Lys Val phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln val Ile
 755 760 765
 Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser Ser Glu

ES 2 800 724 T3

<220>

<223> Dextrano sacarasa truncada

5

<400> 10

Met Gly Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr
 1 5 10 15

Asp Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala His
 20 25 30

Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala
 35 40 45

Asp Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp His
 50 55 60

Asn Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu
 65 70 75 80

Leu Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu
 85 90 95

Ser Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser
 100 105 110

Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Leu Met Thr Gln Gln Val
 115 120 125

Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr Tyr Tyr Phe Asp
 130 135 140

Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp Asn Asn Ile Gln
 145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln Tyr Val Thr Ile
 165 170 175

Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly Asp Glu Leu Thr
 180 185 190

Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe Asn Asp Glu Gly
 195 200 205

Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn Gly Thr Thr Tyr
 210 215 220

Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile Lys Asn Ile Glu
 225 230 235 240

ES 2 800 724 T3

Gln Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu Lys Lys Gly Phe
 245 250 255

Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp Gln Glu Thr Gly
 260 265 270

Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu Gly Leu Thr Thr
 275 280 285

Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His Gly Thr Asp Ala
 290 295 300

Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ser Trp Tyr
 305 310 315 320

Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr
 325 330 335

Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn
 340 345 350

Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser
 355 360 365

Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser Leu Leu Asn Glu
 370 375 380

Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys Ile Ser Ala Gln
 385 390 395 400

Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala Phe Ile Val Ala
 405 410 415

Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser Asn Asp His Leu
 420 425 430

Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu Thr Pro Asp Ala
 435 440 445

Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly
 450 455 460

Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu
 465 470 475 480

Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Gln
 485 490 495

Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn
 500 505 510

ES 2 800 724 T3

Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Asp Asn
 515 520 525
 Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala
 530 535 540
 Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu Ser Ile
 545 550 555 560
 Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly
 565 570 575
 Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu Ile Trp
 580 585 590
 Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg Phe Val
 595 600 605
 Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala
 610 615 620
 Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Tyr Asp Ala Gln Thr
 625 630 635 640
 Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser
 645 650 655
 Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn
 660 665 670
 Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala
 675 680 685
 Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val
 690 695 700
 Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys
 705 710 715 720
 Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln
 725 730 735
 Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu
 740 745 750
 Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly
 755 760 765
 Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn
 770 775 780

ES 2 800 724 T3

Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly
785 790 795 800

Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala
805 810 815

Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr
820 825 830

Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly
835 840 845

Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val
850 855 860

Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr
865 870 875 880

Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln
885 890 895

Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser
900 905 910

Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys
915 920 925

Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser
930 935 940

Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe
945 950 955 960

Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr
965 970 975

Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser Gly Ile
980 985 990

Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Glu
995 1000 1005

Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp Asp
1010 1015 1020

Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser
1025 1030 1035

Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu
1040 1045 1050

ES 2 800 724 T3

Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
 1055 1060 1065
 Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu
 1070 1075 1080
 Trp Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly
 1085 1090 1095
 Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys
 1100 1105 1110
 Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu
 1115 1120 1125
 Thr Asn Asp Leu Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp Lys Gly
 1130 1135 1140
 Ile Ile Tyr Tyr Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala Phe
 1145 1150 1155
 Ile Gln Asp Asp Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly
 1160 1165 1170
 His Leu Val Thr Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe
 1175 1180 1185
 Phe Leu Pro Asn Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn
 1190 1195 1200
 Glu Asp Gly Thr Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val
 1205 1210 1215
 Phe Asp Gln Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe
 1220 1225 1230
 Asp Asp Ala Gly Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp
 1235 1240 1245
 Gly His Gln Gln Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp
 1250 1255 1260
 Lys Phe Val Ile Gly Thr Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro
 1265 1270 1275
 Gly Ser Gly Asn Leu Ala Ile Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys
 1280 1285 1290
 Asn Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Gly Asn Gly His Ala Val Thr Gly
 1295 1300 1305

ES 2 800 724 T3

Phe Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly
 1310 1315 1320
 His Gln Ser Lys Gly Glu Phe Ile Asp Ala Asp Gly Asp Thr Phe
 1325 1330 1335
 Tyr Thr Ser Ala Thr Asp Gly Arg Leu Val Thr Gly Val Gln Lys
 1340 1345 1350
 Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Ala Phe Asp Asn Thr Gly Asn Leu Ile
 1355 1360 1365
 Thr Asn Gln Tyr Tyr Gln Leu Ala Asp Gly Lys Tyr Met Leu Leu
 1370 1375 1380
 Asp Asp Ser Gly Arg Ala Lys Thr Gly Phe Val Leu Gln Asp Gly
 1385 1390 1395
 Val Leu Arg Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Glu Gln Val Lys Asp Ala
 1400 1405 1410
 Ile Ile Val Asp Pro Asp Thr Asn Leu Ser Tyr Lys Gly Glu Leu
 1415 1420 1425
 Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 1430 1435 1440
 Arg Thr Gly His His His His His His
 1445 1450

5 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 11
 ggcttctctg gtgtgatt 18

15 <210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 12
 gatctgtcag aaactggc 18

25 <210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>

ES 2 800 724 T3

<223> Cebador

<400> 13
 5 acacaacaag ttagcggc 18

<210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 14
 15 ccagatacta acttgagt 18

<210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 15
 25 ttcattgatg cagacggg 18

<210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 16
 35 cacgactacg acgcgcaa 18

<210> 17
 <211> 3897
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Dextrano sacarasa truncada

45 <400> 17

acacaacaag ttagcggcaa gtacgttgaa aaagacggta gttggtatta ttattingat 60
 gatggcaaaa atgctaaagg tttatcaacg atagacaaca atattcaata tttttacgag 120
 agtggtaaac aagccaaagg acagtatgtc acaattgata atcaaacata ttattingat 180
 aagggctcag gtgatgagtt aactggctctg caaagcattg atgggaacat agttgctttt 240
 aacgatgaag ggcaacaaat ttttaataca tattaccaat ctgaaaatgg tacaacatac 300
 tactttgatg ataaaggaca cgctgctacc ggtattaaga atatcgaggg caaaaattat 360
 tattttgata atcttgggca actaaaaaaa ggcttctctg gtgtgattga tgggtcaaata 420

ES 2 800 724 T3

atgacatttg atcaggaaac agggcaagaa gtttctaaca caacttctga aataaaagaa 480
ggtttgacga ctcaaaacac ggattatagc gaacataatg cagcccacgg tacggatgct 540
gaggactttg aaaatattga cggctattta acagctagtt catggtatcg tccaacaggt 600
attttacgta acggaacaga ctgggaacct tctacagata cagatttcag accaatattg 660
tcagtgtggt ggccagataa gaacaccag gtcaattatt taaattacat ggctgattta 720
gggtttatca gtaatgcgga cagttttgaa actggggata gccaaagctt attaaatgaa 780
gcaagtaact atgttcaaaa atcaattgaa atgaaaatta gtgcgcaaca aagtacagag 840
tggttaaagg atgcaatggc ggccttcatt gtcgcgcaac cacagtggaa tgaaactagt 900
gaagatatga gcaatgacca tttacaaaat ggcgcattaa cttatgtcaa cagtccactg 960
acacctgacg ctaattcaaa ctttagacta cttaatcgga caccaacaaa ccagactggg 1020
gaacaagcgt ataatttaga taattcaaaa ggtgggtttg aattgttggt agccaatgac 1080
gttgataatt caaacctgt agtacaagca gaacaattga attggttata ttatttaatg 1140
aattttggta cgattacggc caacgacgcg gatgctaatt ttgatgggat tcgtgtagat 1200
gcagtcgaca atgtggatgc tgatttgta caaattgctg ccgattattt caaactagct 1260
tacggtgttg atcaaaatga tgctactgct aatcagcatc tttcaatttt ggaagattgg 1320
agtcacaatg atcctttgta tgtaacagat caaggaagca atcaattaac catggatgat 1380
tatgtgcaca cacaattaat ctggtctcta acaaaatcat ctgacatacg aggtacaatg 1440
cagcgcttcg tggattatta tatggtggat cgatctaatt atagtacaga aaacgaagcc 1500
attcctaatt acagctttgt acgtgcacac gacagcgaag tgcaaacggg tattgcccac 1560
attgtttccg atttgtatcc tgatgttgaa aatagtttag caccaacaac agaacaattg 1620
gcagctgctt tcaaagtata caatgaagat gaaaaattag cagacaaaaa gtacacacaa 1680
tataatatgg ctagtgctta tgcgatgtg ctaaccaata aggatactgt tcctcggtgc 1740
tattatggcg atttatatac agatgatgg caatatatgg caacaaagtc accatactat 1800
gatgcgatta acactttgct aaaggctaga gttcagtatg ttgctgggtg ccaatcgatg 1860
tccgttgata gtaatgacgt gttaacaagt gttcgctatg gtaaagatgc catgacagct 1920
tctgacactg gaacatctga gacgcgtact gaaggatttg gagtcatcgt cagcaataac 1980
gcgagctac aattagagga tgggcatact gtcacattgc atatgggggc agctcataag 2040
aaccaagctt atcgtgcttt gttatcaaca actgcagatg gattagctta ttatgatact 2100
gatgaaaatg cacctgtggc gtacacagat gctaacggcg atttgatttt tacgaatgaa 2160
tcaatttatg gtgtacaaaa tccacaagtt tctggttact tggcagtttg ggttccggta 2220
ggtgcgcaac aagatcaaga tgcacgaacg gcctctgata caacaacaaa cacgagtgat 2280
aaagtgttcc attcaaacgc tgctcttgat tctcaagtca tctacgaagg tttctcaaac 2340
ttccaagcat ttgctacaga cagcagtgaa tatacaaacg tagtcatcgc tcagaatgcg 2400
gaccaattta agcaatgggg tgtgacaagc ttccaattgg caccacaata tcgttcaagt 2460

ES 2 800 724 T3

acagatacaa gtttcttggga ttcaattatt caaaacgggt atgcattcac ggatcgttat 2520
gacttagggt atggcacacc gacaaaatat ggaactgctg atcagttgcg cgatgctatt 2580
aaagccttac atgctagcgg tattcaagcc attgccgatt gggtgccgga ccaaatttat 2640
aatttgccag agcaagaatt agctactgtc acaagaacaa attcatttgg agatgacgat 2700
acagattctg atattgacaa tgccttatat gttgtacaaa gtcgtggggg tggatcaatat 2760
caagagatgt atgggtggtc cttcttagaa gagttacagg cactctatcc atccctattt 2820
aaagtgaatc aaatctcaac tggcgttcca attgatggca gtgtaaagat tactgagtg 2880
gchgctaagt acttcaatgg ctctaacatc caaggtaaag gtgctggata cgtattgaaa 2940
gatatggggt ctaataagta ctttaaggtc gtttcgaaca ctgaggatgg tgactactta 3000
ccaaaacagt taactaatga tctgtcagaa actggcttta cacacgatga taaaggaatc 3060
atctattata cattaagtgg ttatcgtgcc caaaatgcat ttattcaaga tgatgataat 3120
aactattact attttgataa aacaggatcatt ttagtaacag gtttgcaaaa gattaataac 3180
catacctact tcttcttacc taatggatc gaactggta agagcttctt acaaaacgaa 3240
gatggtacaa ttgtttattt cgataagaaa ggtcatcaag tttttgatca atatataact 3300
gatcaaaatg gaaatgcgta ttactttgat gatgctggtg taatgcttaa atcagggctt 3360
gcaacgattg atggacatca acagtatctt gatcaaaatg gtgtgcaggt taaggataag 3420
tttgtgattg gcaactgatg ttataagtat tactttgaac caggtagtg taacttagct 3480
atcctacggt atgtgcaaaa tagtaagaat caatggttct attttgatgg taatggccat 3540
gctgtcactg gtttccaaac aattaatggt aaaaaacaat atttctataa tgatggatc 3600
caaagtaaag gtgaattcat tgatgcagac ggggatactt tctatacgag tgccactgat 3660
ggtcgcctag taactggtgt tcagaagatt aatggtatta cctatgcttt tgataacaca 3720
ggaaatttga tcacaaatca gtattatcaa ttagcagatg gtaaataat gttgttagat 3780
gatagtggct gtgcgaaaac agggtttgtg ttgcaagatg gtgtactaag atacttcgat 3840
caaaacgggt agcaagtga agatgctatc attgtggatc cagatactaa cttgagt 3897

<210> 18
<211> 3633
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Dextrano sacarasa truncada

10

<400> 18

acacaacaag ttagcggcaa gtacggtgaa aaagacggta gttggtatta ttatcttgat 60
gatggcaaaa atgctaaagg tttatcaacg atagacaaca atattcaata tttttacgag 120
agtggtaaac aagccaaagg acagtatgtc acaattgata atcaaacata ttatcttgat 180
aagggctcag gtgatgagtt aactggtctg caaagcattg atgggaacat agttgctttt 240
aacgatgaag ggcaacaaat ttttaataca tattaccaat ctgaaaatgg tacaacatac 300

ES 2 800 724 T3

tactttgatg ataaaggaca cgctgctacc ggtattaaga atatcgaggg caaaaattat 360
tattttgata atcttgggca actaaaaaaa ggcttctctg gtgtgattga tgggtcaaata 420
atgacatttg atcaggaaac agggcaagaa gtttctaaca caacttctga aataaaagaa 480
ggtttgacga ctcaaacac ggattatagc gaacataatg cagcccacgg tacggatgct 540
gaggactttg aaaatattga cggctattta acagctagtt catggtatcg tccaacaggt 600
attttacgta acggaacaga ctgggaacct tctacagata cagatttcag accaatattg 660
tcagtgtggg ggccagataa gaacaccacg gtcaattatt taaattacat ggctgattta 720
gggtttatca gtaatgcgga cagttttgaa actggggata gccaaagctt attaaatgaa 780
gcaagtaact atgttcaaaa atcaattgaa atgaaaatta gtgcgcaaca aagtacagag 840
tggttaaagg atgcaatggc ggcttccatt gtcgcgcaac cacagtggaa tgaaactagt 900
gaagatatga gcaatgacca tttacaaaat ggcgcattaa cttatgtcaa cagtccactg 960
acacctgacg ctaattcaaa ctttagacta cttaatcggg caccaacaaa ccagactggg 1020
gaacaagcgt ataatttaga taattcaaaa ggtggttttg aattgttggt agccaatgac 1080
gttgataatt caaacctgt agtacaagca gaacaattga attggttata ttatttaatg 1140
aattttggta cgattacggc caacgacgcg gatgctaatt ttgatgggat tcgtgtagat 1200
gcagtcgaca atgtggatgc tgatttgta caaattgctg ccgattattt caaactagct 1260
tacggtgttg atcaaaatga tgctactgct aatcagcatc tttcaatttt ggaagattgg 1320
agtcacaatg atcctttgta tgtaacagat caaggaagca atcaattaac catggatgat 1380
tatgtgcaca cacaattaat ctggctctca acaaatcat ctgacatacg aggtacaatg 1440
cagcgcttcg tggattatta tatggtggat cgatctaatt atagtacaga aaacgaagcc 1500
attcctaatt acagctttgt acgtgcacac gacagcgaag tgcaaacggg tattgcccaa 1560
attgtttccg atttgtatcc tgatgttgaa aatagtttag caccaacaac agaacaattg 1620
gcagctgctt tcaaagtata caatgaagat gaaaaattag cagacaaaaa gtacacacaa 1680
tataatatgg ctagtgctta tgcgatgttg ctaaccaata aggatactgt tcctcggtgc 1740
tattatggcg atttatatac agatgatggg caatatatgg caacaaagtc accatactat 1800
gatgcgatta acactttgct aaaggctaga gttcagtatg ttgctgggtg ccaatcgatg 1860
tccgttgata gtaatgacgt .gttaacaagt gttcgctatg gtaaagatgc catgacagct 1920
tctgacactg gaacatctga gacgcgtact gaaggatttg gagtcatcgt cagcaataac 1980
gcggagctac aattagagga tgggcatact gtcacattgc atatgggggc agctcataag 2040
aaccaagctt atcgtgcttt gttatcaaca actgcagatg gattagctta ttatgatact 2100
gatgaaaatg cacctgtggc gtacacagat gtaaacggcg .atttgatttt tacgaatgaa 2160
tcaatttatg gtgtacaaaa tccacaagtt tctggttact tggcagtttg ggttccggta 2220
ggtgcgcaac aagatcaaga tgcacgaacg gcctctgata caacaacaaa cacgagtgat 2280
aaagtgttcc attcaaacgc tgctcttgat tctcaagtca tctacgaagg tttctcaaac 2340

ES 2 800 724 T3

ttccaagcat ttgctacaga cagcagtgaataatacaaacg tagtcatcgc tcagaatgcg 2400
 gaccaattta agcaatgggg tgtgacaagc ttccaattgg caccacaata tcgttcaagt 2460
 acagatacaa gtttcttggga ttcaattatt caaacgggt atgcattcac ggatcgttat 2520
 gacttaggtt atggcacacc gacaaaatat ggaactgctg atcagttgcg cgatgctatt 2580
 aaagccttac atgctagcgg tattcaagcc attgccgatt gggtgccgga ccaaatattat 2640
 aatttgccag agcaagaatt agctactgtc acaagaacaa attcatttgg agatgacgat 2700
 acagattctg atattgacaa tgccttatat gttgtacaaa gtcgtggggg tggtaaatat 2760
 caagagatgt atgggtggtc cttcttagaa gagttacagg cactctatcc atccctat 2820
 aaagtgaatc aaatctcaac tggcgttcca attgatggca gtgtaaagat tactgagtgg 2880
 gcggtcaagt acttcaatgg ctctaacatc caaggtaaag gtgctggata cgtattgaaa 2940
 gatatgggtt ctaataagta ctttaaggtc gtttcgaaca ctgaggatgg tgactactta 3000
 ccaaacagc taactaatga tctgtcagaa actggcttta cacacgatga taaaggaatc 3060
 atctattata cattaagtgg ttatcgtgcc caaatgcat ttattcaaga tgatgataat 3120
 aactattact attttgataa aacaggtcat ttagtaacag gtttgcaaaa gattaataac 3180
 catacctact tcttcttacc taatggtatc gaactggtca agagcttctt acaaacgaa 3240
 gatggtacaa ttgtttat cgataagaaa ggtcatcaag tttttgatca atatataact 3300
 gatcaaatg gaaatgctga ttactttgat gatgctggtg taatgcttaa atcagggctt 3360
 gcaacgattg atggacatca acagtat gatcaaatg gtgtgcaggt taaggataag 3420
 tttgtgattg gcaactgatg ttataagtat tactttgaac caggtagtgg taacttagct 3480
 atcctacgtt atgtgcaaaa tagtaagaat caatggttct attttgatgg taatggccat 3540
 gctgtcactg gtttccaaac aattaatggt aaaaaacaat atttctataa tgatggtcat 3600
 caaagtaaag gtgaattcat tgatgcagac ggg 3633

5 <210> 19
 <211> 3036
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Dextrano sacarasa truncada
 <400> 19

acacaacaag ttagcggcaa gtacgttgaa aaagacggta gttggtatta ttat 60
 gatggcaaaa atgctaaagg tttatcaacg atagacaaca atattcaata tttttacgag 120
 agtggtaaac aagccaaagg acagtatgtc acaattgata atcaaacata ttat 180
 aagggctcag gtgatgagtt aactggtctg caaagcattg atgggaacat agttgctttt 240
 aacgatgaag ggcaacaaat ttttaataca tattaccaat ctgaaaatgg tacaacatac 300
 tactttgatg ataaaggaca cgctgtctacc ggtattaaga atatcgaggg caaaaattat 360
 tattttgata atcttgggca actaaaaaaaa ggcttctctg gtgtgattga tggta 420

ES 2 800 724 T3

atgacatttg atcaggaaac agggcaagaa gtttctaaca caacttctga aataaaagaa 480
 ggtttgacga ctcaaaacac ggattatagc gaacataatg cagcccacgg tacggatgct 540
 gaggactttg aaaatattga cggctattta acagctagtt catggtatcg tccaacaggt 600
 attttacgta acggaacaga ctgggaacct tctacagata cagatttcag accaatattg 660
 tcagtgtggt ggccagataa gaacacccag gtcaattatt taaattacat ggctgattta 720
 gggtttatca gtaatgcgga cagttttgaa actggggata gccaaagctt attaaatgaa 780
 gcaagtaact atgttcaaaa atcaattgaa atgaaaatta gtgcgcaaca aagtacagag 840
 tggttaaagg atgcaatggc ggccttcatt gtcgcgcaac cacagtggaa tgaaactagt 900
 gaagatatga gcaatgacca tttacaaaat ggcgcattaa cttatgtcaa cagtccactg 960
 acacctgacg ctaattcaaa ctttagacta cttaatcgga caccaacaaa ccagactggt 1020
 gaacaagcgt ataattttaga taattcaaaa ggtggttttg aattgttggt agccaatgac 1080
 gttgataatt caaacctgt agtacaagca gaacaattga attggttata ttatttaatg 1140
 aattttggta cgattacggc caacgacgcg gatgctaatt ttgatggtat tcgtgtagat 1200
 gcagtcgaca atgtggatgc tgatttgta caaattgctg ccgattattt caaactagct 1260
 tacggtgttg atcaaaatga tgctactgct aatcagcatc tttcaatttt ggaagattgg 1320
 agtcacaatg atcctttgta tgtaacagat caaggaagca atcaattaac catggatgat 1380
 tatgtgcaca cacaattaat ctggctctta acaaaatcat ctgacatacg aggtacaatg 1440
 cagcgcttcg tggattatta tatggtggat cgatctaatt atagtacaga aaacgaagcc 1500
 attcctaatt acagctttgt acgtgcacac gacagcgaag tgcaaacggt tattgcccaa 1560
 attgtttccg atttgtatcc tgatgttgaa aatagtttag caccaacaac agaacaattg 1620
 gcagctgctt tcaaagtata caatgaagat gaaaaattag cagacaaaaa gtacacacaa 1680
 tataatatgg ctagtgctta tgcgatgttg ctaaccaata aggatactgt tcctcgtgct 1740
 tattatggcg atttatatac agatgatggt caatatatgg caacaaagtc accatactat 1800
 gatgcgatta acactttgct aaaggctaga gttcagtatg ttgctggtgg ccaatcgatg 1860
 tccgttgata gtaatgacgt gttaacaagt gttcgctatg gtaaagatgc catgacagct 1920
 tctgacactg gaacatctga gacgcgtact gaaggatttg gagtcatcgt cagcaataac 1980
 gcgagctac aattagagga tgggcatact gtcacattgc atatgggggc agctcataag 2040
 aaccaagctt atcgtgcttt gttatcaaca actgcagatg gattagctta ttatgatact 2100
 gatgaaaatg cacctgtggc gtacacagat gctaacggcg atttgatttt tacgaatgaa 2160
 tcaatttatg gtgtacaaaa tccacaagtt tctggttact tggcagtttg ggttccggta 2220
 ggtgcgcaac aagatcaaga tgcacgaacg gcctctgata caacaacaaa cagcagtgat 2280
 aaagtgttcc attcaaacgc tgctcttgat tctcaagtca tctacgaagg tttctcaaac 2340
 ttccaagcat ttgctacaga cagcagtgaa tatacaaacg tagtcatcgc tcagaatgcg 2400
 gaccaattta agcaatgggg tgtgacaagc ttccaattgg caccacaata tcgttcaagt 2460

ES 2 800 724 T3

acagatacaa gtttcttga ttcaattatt caaaacgggt atgcattcac ggatcgttat 2520
gacttaggtt atggcacacc gacaaaatat ggaactgctg atcagttgcg cgatgctatt 2580
aaagccttac atgctagcgg tattcaagcc attgccgatt gggtgccgga ccaaatttat 2640
aatttgccag agcaagaatt agctactgtc acaagaacaa attcatttgg agatgacgat 2700
acagattctg atattgacaa tgccttatat gttgtacaaa gtcgtggggg tggtaaatat 2760
caagagatgt atggtggtgc cttcttagaa gagttacagg cactctatcc atccctattt 2820
aaagtgaatc aaatctcaac tggcgttcca attgatggca gtgtaaagat tactgagtgg 2880
gcygctaagt acttcaatgg ctctaacatc caaggtaaag gtgctggata cgtattgaaa 2940
gatatgggtt ctaataagta ctttaaggtc gtttcgaaca ctgaggatgg tgactactta 3000
ccaaaacagt taactaatga tctgtcagaa actggc 3036

<210> 20
<211> 2646
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Dextrano sacarasa truncada

10

<400> 20

ggcttctctg gtgtgattga tggtaaata atgacatttg atcaggaaac agggcaagaa 60
gtttctaaca caacttctga aataaaagaa ggtttgacga ctcaaaacac ggattatagc 120
gaacataatg cagcccacgg tacggatgct gaggactttg aaaatattga cggctattta 180
acagctagtt catggtatcg tccaacaggt attttacgta acggaacaga ctgggaacct 240
tctacagata cagatttcag accaatattg tcagtgtggt ggccagataa gaacaccag 300
gtcaattatt taaattacat ggctgattta gggtttatca gtaatgcgga cagttttgaa 360
actggggata gccaaagctt attaaatgaa gcaagtaact atgttcaaaa atcaattgaa 420
atgaaaatta gtgcgcaaca aagtacagag tggttaaagg atgcaatggc ggccttcatt 480
gtcgcgcaac cacagtggaa tgaaactagt gaagatatga gcaatgacca tttacaaaat 540
ggcgcattaa cttatgtcaa cagtccactg acacctgacg ctaattcaaa ctttagacta 600
cttaatcggg caccaacaaa ccagactggt gaacaagcgt ataatttaga taattcaaaa 660
gggtggtttt aattggttgt agccaatgac gttgataatt caaacctgt agtacaagca 720
gaacaattga attggttata ttatttaatg aattttggta cgattacggc caacgacgcy 780
gatgctaatt ttgatggtat tcgtgtagat gcagtcgaca atgtggatgc tgatttgta 840
caaattgctg ccgattattt caaactagct tacggtggtg atcaaaatga tgctactgct 900
aatcagcatc tttcaatttt ggaagattgg agtcacaatg atcctttgta tgtaacagat 960
caaggaagca atcaattaac catggatgat tatgtgcaca cacaattaat ctggtctcta 1020
acaaaatcat ctgacatacg aggtacaatg cagcgcttcg tggattatta tatggtggat 1080
cgatctaatt atagtacaga aaacgaagcc attcctaatt acagctttgt acgtgcacac 1140

ES 2 800 724 T3

gacagcgaag tgcaaacggt tattgcccaa attgtttccg atttgtatcc tgatgttgaa 1200
aatagtttag caccaacaac agaacaattg gcagctgctt tcaaagtata caatgaagat 1260
gaaaaattag cagacaaaaa gtacacacaa tataatatgg ctagtgctta tgcgatgttg 1320
ctaaccaata aggatactgt tcctcgtgtc tattatggcg atttatatac agatgatggt 1380
caatatatgg caacaaagtc accatactat gatgcgatta acactttgct aaaggctaga 1440
gttcagtatg ttgctggtgg ccaatcgatg tccgttgata gtaatgacgt gttaacaagt 1500
gttcgctatg gtaaagatgc catgacagct tctgacactg gaacatctga gacgcgtact 1560
gaaggattg gagtcatcgt cagcaataac gcggagctac aattagagga tgggcatact 1620
gtcacattgc atatgggggc agctcataag aaccaagctt atcgtgcttt gttatcaaca 1680
actgcagatg gattagctta ttatgatact gatgaaaatg cacctgtggc gtacacagat 1740
gctaacggcg atttgatttt tacgaatgaa tcaatttatg gtgtacaaaa tccacaagtt 1800
tctggttact tggcagtttg ggttccggtg ggtgcgcaac aagatcaaga tgcacgaacg 1860
gcctctgata caacaacaaa cacgagtgat aaagtgttcc attcaaacgc tgctcttgat 1920
tctcaagtca tctacgaagg tttctcaaac ttccaagcat ttgctacaga cagcagtgaa 1980
tatacaaacg tagtcatcgc tcagaatgcg gaccaattta agcaatgggg tgtgacaagc 2040
ttccaattgg caccacaata tcgttcaagt acagatacaa gtttcttgga ttcaattatt 2100
caaacgggt atgcattcac ggatcgttat gacttagggt atggcacacc gacaaaatat 2160
ggaactgctg atcagttgcg cgatgctatt aaagccttac atgctagcgg tattcaagcc 2220
attgccgatt gggtgccgga ccaaatttat aatttgccag agcaagaatt agctactgtc 2280
acaagaacaa attcatttgg agatgacgat acagattctg atattgacaa tgccttatat 2340
gttgtaacaa gtcgtggggg tggtaaatat caagagatgt atgggtggtgc cttcttagaa 2400
gagttacag cactctatcc atccctattt aaagtgaatc aaatctcaac tggcgttcca 2460
attgatggca gtgtaaagat tactgagtg gcggttaagt acttcaatgg ctctaacatc 2520
caaggtaaag gtgctggata cgtattgaaa gatatgggtt ctaataagta ctttaaggtc 2580
gtttcgaaca ctgaggatgg tgactactta ccaaacagt taactaatga tctgtcagaa 2640
actggc 2646

<210> 21
<211> 3897
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Mutada/truncada

10

<400> 21

acacaacaag ttagcggcaa gtacgttgaa aaagacggta gttggtatta ttattttgat 60
gatggcaaaa atgctaaagg tttatcaacg atagacaaca atattcaata tttttacgag 120
agtggtaaac aagccaaagg acagtatgct acaattgata atcaaacata ttattttgat 180

ES 2 800 724 T3

aagggctcag gtgatgagtt aactggctctg caaagcattg atgggaacat agttgctttt 240
aacgatgaag ggcaacaaat ttttaataca tattaccaat ctgaaaatgg tacaacatac 300
tactttgatg ataaaggaca cgctgctacc ggtattaaga atatcgaggg caaaaattat 360
tattttgata atcttgggca actaaaaaaaa ggcttctctg gtgtgattga tggcaata 420
atgacatttg atcaggaaac agggcaagaa gtttctaaca caacttctga aataaaagaa 480
ggtttgacga ctcaaaacac ggattatagc gaacataatg cagcccacgg tacggatgct 540
gaggactttg aaaatattga cggctattta acagctagtt catggtatcg tccaacaggt 600
attttacgta acggaacaga ctgggaacct tctacagata cagatttcag accaatattg 660
tcagtgtggt ggccagataa gaacaccag gtcaattatt taaattacat ggctgattta 720
gggtttatca gtaatgcgga cagttttgaa actggggata gccaaagctt attaaatgaa 780
gcaagtaact atgttcaaaa atcaattgaa atgaaaatta gtgcaaca aagtacagag 840
tggttaaagg atgcaatggc ggccttcatt gtcgcaac cacagtggaa tgaaactagt 900
gaagatatga gcaatgacca tttaaaaaat ggcgcatata cttatgtcaa cagtccactg 960
acacctgacg ctaattcaaa ctttagacta cttaatcgga caccaacaaa ccagactgggt 1020
gaacaagcgt ataatttaga taattcaaaa ggtggttttg aattgttgtt agccaatgac 1080
gttgataatt caaacctgt agtacaagca gaacaattga attggttata ttatttaatg 1140
aattttggta cgattacggc caacgacgcg gatgctaatt ttgatggat tcgtgtagat 1200
gcagtcgaca atgtggatgc tgatttgta caaattgctg ccgattattt caaactagct 1260
tacggtggtg atcaaatga tgctactgct aatcagcatc tttcaatttt ggaagattgg 1320
agtcacaatg atcctttgta tgtaacagat caaggaagca atcaattaac catggatgat 1380
tatgtgcaca cacaattaat ctggctctca acaaatcat ctgacatacg aggtacaatg 1440
cagcgcttcg tggattatta tatgggtggat cgatctaatt atagtacaga aaacgaagcc 1500
attcctaatt acagctttgt acgagctcac gactacgacg cgcaaaggt tattgccaa 1560
attgtttccg atttgtatcc tgatgttgaa aatagtttag caccaacaac agaacaattg 1620
gcagctgctt tcaaagtata caatgaagat gaaaaattag cagacaaaaa gtacacacaa 1680
tataatatgg ctagtgttta tgcatggtg ctaaccaata aggatactgt tcctcgtgct 1740
tattatggcg atttatatac agatgatgggt caatatatgg caacaaagtc accatactat 1800
gatgcaatta acactttgct aaaggctaga gttcagtag ttgctggtgg ccaatcagatg 1860
tccgttgata gtaatgacgt gttacaagt gttcgtatg gtaaagatgc catgacagct 1920
tctgacactg gaacatctga gacgcgtact gaaggatttg gagtcatcgt cagcaataac 1980
gaggagctac aattagagga tgggcatact gtcacattgc atatgggggc agctcataag 2040
aaccaagctt atcgtgcttt gttatcaaca actgcagatg gattagctta ttatgatact 2100
gatgaaaatg cacctgtggc gtacacagat gctaacggcg atttgatttt tacgaatgaa 2160
tcaatttatg gtgtacaaaa tccacaagtt tctggttact tggcagtttg ggttccggta 2220

ES 2 800 724 T3

ggtgCGcaac aagatcaaga tgcacgaacg gcctctgata caacaacaaa cacgagtgat 2280
 aaagtgttcc attcaaacgc tgctcttgat tctcaagtca tctacgaagg tttctcaaac 2340
 ttccaagcat ttgctacaga cagcagtgaa tatacaaacg tagtcatcgc tcagaatgcg 2400
 gaccaattta agcaatgggg tgtgacaagc ttccaattgg caccacaata tcgttcaagt 2460
 acagatacaa gtttcttgga ttcaattatt caaaacgggt atgcattcac ggatcgttat 2520
 gacttaggtt atggcacacc gacaaaatat ggaactgctg atcagttgcg cgatgctatt 2580
 aaagccttac atgctagcgg tattcaagcc attgccgatt gggtgccgga ccaaatttat 2640
 aatttgccag agcaagaatt agctactgtc acaagaacaa attcatttgg agatgacgat 2700
 acagattctg atattgacaa tgccttatat gttgtacaaa gtcgtggggg tggtaaatat 2760
 caagagatgt atgggtggtg cttcttagaa gagttacagg cactctatcc atccctattt 2820
 aaagtgaatc aaatctcaac, tggcgttcca attgatggca gtgtaaagat tactgagtgg 2880
 gcggctaagt acttcaatgg ctctaacatc caaggtaaag gtgctggata cgtattgaaa 2940
 gatatggggt ctaataagta cttaagggtc gtttcgaaca ctgaggatgg tgactactta 3000
 ccaaaacagt taactaatga tctgtcagaa actggcttta cacacgatga taaaggaatc 3060
 atctattata cattaagtgg ttatcgtgcc caaaatgcat ttattcaaga tgatgataat 3120
 aactattact attttgataa aacagggtcat ttagtaacag gtttgcaaaa gattaataac 3180
 catacctact tcttcttacc taatggtatc gaactggtca agagcttctt acaaaaacgaa 3240
 gatggtacaa ttgtttatth cgataagaaa ggtcatcaag tttttgatca atatataact 3300
 gatcaaaatg gaaatgcgta ttactttgat gatgctggtg taatgcttaa atcagggctt 3360
 gcaacgattg atggacatca acagtattht gatcaaaatg gtgtgcaggt taaggataag 3420
 tttgtgattg gcaactgatgg ttataagtat tactttgaac caggtagtgg taacttagct 3480
 atcctacgtt atgtgcaaaa tagtaagaat caatggttct attttgatgg taatggccat 3540
 gctgtcactg gtttccaaac aattaatggt aaaaaacaat atttctataa tgatgggtcat 3600
 caaagtaaag gtgaattcat tgatgcagac ggggataactt tctatacgag tgccactgat 3660
 ggtcgcctag taactggtgt tcagaagatt aatggtatta cctatgcttt tgataacaca 3720
 ggaaatttga tcacaaatca gtattatcaa ttagcagatg gtaaataat gttggttagat 3780
 gatagtggtc gtgcgaaaac agggtttgta ttgcaagatg gtgtactaag atacttcgat 3840
 caaaacggtg agcaagtga agatgctatc attgtggatc cagatactaa cttgagt 3897

<210> 22
 <211> 1299
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Dextrano sacarasa truncada

10

<400> 22

Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr

ES 2 800 724 T3

	275					280						285			
Phe	Ile 290	Val	Ala	Gln	Pro	Gln 295	Trp	Asn	Glu	Thr	Ser 300	Glu	Asp	Met	Ser
Asn	Asp	His	Leu	Gln	Asn 310	Gly	Ala	Leu	Thr	Tyr 315	Val	Asn	Ser	Pro	Leu 320
Thr	Pro	Asp	Ala	Asn 325	Ser	Asn	Phe	Arg	Leu 330	Leu	Asn	Arg	Thr	Pro 335	Thr
Asn	Gln	Thr	Gly 340	Glu	Gln	Ala	Tyr	Asn 345	Leu	Asp	Asn	Ser	Lys 350	Gly	Gly
Phe	Glu	Leu 355	Leu	Leu	Ala	Asn	Asp 360	Val	Asp	Asn	Ser	Asn 365	Pro	Val	Val
Gln	Ala 370	Glu	Gln	Leu	Asn	Trp 375	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Met 380	Asn	Phe	Gly	Thr
Ile	Thr	Ala	Asn	Asp	Ala 390	Asp	Ala	Asn	Phe	Asp 395	Gly	Ile	Arg	Val	Asp 400
Ala	Val	Asp	Asn	Val 405	Asp	Ala	Asp	Leu	Leu 410	Gln	Ile	Ala	Ala	Asp 415	Tyr
Phe	Lys	Leu	Ala 420	Tyr	Gly	Val	Asp	Gln 425	Asn	Asp	Ala	Thr	Ala 430	Asn	Gln
His	Leu	Ser 435	Ile	Leu	Glu	Asp	Trp 440	Ser	His	Asn	Asp	Pro 445	Leu	Tyr	Val
Thr	Asp 450	Gln	Gly	Ser	Asn	Gln 455	Leu	Thr	Met	Asp	Asp 460	Tyr	Val	His	Thr
Gln	Leu	Ile	Trp	Ser	Leu 470	Thr	Lys	Ser	Ser	Asp 475	Ile	Arg	Gly	Thr	Met 480
Gln	Arg	Phe	Val	Asp 485	Tyr	Tyr	Met	Val	Asp 490	Arg	Ser	Asn	Asp	Ser 495	Thr
Glu	Asn	Glu	Ala 500	Ile	Pro	Asn	Tyr	Ser 505	Phe	Val	Arg	Ala	His 510	Asp	Ser
Glu	Val	Gln 515	Thr	Val	Ile	Ala	Gln 520	Ile	Val	Ser	Asp	Leu 525	Tyr	Pro	Asp
Val	Glu 530	Asn	Ser	Leu	Ala	Pro 535	Thr	Thr	Glu	Gln	Leu 540	Ala	Ala	Ala	Phe
Lys	Val	Tyr	Asn	Glu	Asp	Glu	Lys	Leu	Ala	Asp	Lys	Lys	Tyr	Thr	Gln

ES 2 800 724 T3

820					825					830					
Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Asp	Arg	Tyr	Asp	Leu	Gly	Tyr	Gly	Thr	Pro	Thr
		835					840					845			
Lys	Tyr	Gly	Thr	Ala	Asp	Gln	Leu	Arg	Asp	Ala	Ile	Lys	Ala	Leu	His
	850					855					860				
Ala	Ser	Gly	Ile	Gln	Ala	Ile	Ala	Asp	Trp	Val	Pro	Asp	Gln	Ile	Tyr
865					870					875					880
Asn	Leu	Pro	Glu	Gln	Glu	Leu	Ala	Thr	Val	Thr	Arg	Thr	Asn	Ser	Phe
				885					890					895	
Gly	Asp	Asp	Asp	Thr	Asp	Ser	Asp	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Tyr	Val	Val
			900					905					910		
Gln	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Gln	Tyr	Gln	Glu	Met	Tyr	Gly	Gly	Ala	Phe
		915					920					925			
Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser	Leu	Phe	Lys	Val	Asn	Gln
	930					935					940				
Ile	Ser	Thr	Gly	Val	Pro	Ile	Asp	Gly	Ser	Val	Lys	Ile	Thr	Glu	Trp
945					950					955					960
Ala	Ala	Lys	Tyr	Phe	Asn	Gly	Ser	Asn	Ile	Gln	Gly	Lys	Gly	Ala	Gly
				965					970					975	
Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Met	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Phe	Lys	Val	Val	Ser
			980					985					990		
Asn	Thr	Glu	Asp	Gly	Asp	Tyr	Leu	Pro	Lys	Gln	Leu	Thr	Asn	Asp	Leu
		995					1000					1005			
Ser	Glu	Thr	Gly	Phe	Thr	His	Asp	Asp	Lys	Gly	Ile	Ile	Tyr	Tyr	
	1010					1015					1020				
Thr	Leu	Ser	Gly	Tyr	Arg	Ala	Gln	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln	Asp	Asp	
	1025					1030					1035				
Asp	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Lys	Thr	Gly	His	Leu	Val	Thr	
	1040					1045					1050				
Gly	Leu	Gln	Lys	Ile	Asn	Asn	His	Thr	Tyr	Phe	Phe	Leu	Pro	Asn	
	1055					1060					1065				
Gly	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Glu	Asp	Gly	Thr	
	1070					1075					1080				
Ile	Val	Tyr	Phe	Asp	Lys	Lys	Gly	His	Gln	Val	Phe	Asp	Gln	Tyr	

ES 2 800 724 T3

Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Phe Asp Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp
 20 25 30
 Asn Asn Ile Gln Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln
 35 40 45
 Tyr Val Thr Ile Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly
 50 55 60
 Asp Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe
 65 70 75 80
 Asn Asp Glu Gly Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn
 85 90 95
 Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile
 100 105 110
 Lys Asn Ile Glu Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu
 115 120 125
 Lys Lys Gly Phe Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp
 130 135 140
 Gln Glu Thr Gly Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu
 145 150 155 160
 Gly Leu Thr Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His
 165 170 175
 Gly Thr Asp Ala Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala
 180 185 190
 Ser Ser Trp Tyr Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp
 195 200 205
 Glu Pro Ser Thr Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp
 210 215 220
 Pro Asp Lys Asn Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu
 225 230 235 240
 Gly Phe Ile Ser Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser
 245 250 255
 Leu Leu Asn Glu Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys
 260 265 270

ES 2 800 724 T3

Ile Ser Ala Gln Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala
 275 280 285

Phe Ile Val Ala Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser
 290 295 300

Asn Asp His Leu Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu
 305 310 315 320

Thr Pro Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr
 325 330 335

Asn Gln Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly
 340 345 350

Phe Glu Leu Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val
 355 360 365

Gln Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr
 370 375 380

Ile Thr Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp
 385 390 395 400

Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr
 405 410 415

Phe Lys Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln
 420 425 430

His Leu Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val
 435 440 445

Thr Asp Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr
 450 455 460

Gln Leu Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met
 465 470 475 480

Gln Arg Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr
 485 490 495

Glu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser
 500 505 510

Glu Val Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp
 515 520 525

Val Glu Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe
 530 535 540

ES 2 800 724 T3

Lys Val Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln
 545 550 555 560
 Tyr Asn Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr
 565 570 575
 Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr
 580 585 590
 Met Ala Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys
 595 600 605
 Ala Arg Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser
 610 615 620
 Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala
 625 630 635 640
 Ser Asp Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile
 645 650 655
 Val Ser Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr
 660 665 670
 Leu His Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu
 675 680 685
 Ser Thr Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala
 690 695 700
 Pro Val Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu
 705 710 715 720
 Ser Ile Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val
 725 730 735
 Trp Val Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser
 740 745 750
 Asp Thr Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala
 755 760 765
 Leu Asp Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe
 770 775 780
 Ala Thr Asp Ser Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala
 785 790 795 800
 Asp Gln Phe Lys Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln
 805 810 815

ES 2 800 724 T3

Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn
 820 825 830

Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr
 835 840 845

Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His
 850 855 860

Ala Ser Gly Ile Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr
 865 870 875 880

Asn Leu Pro Glu Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe
 885 890 895

Gly Asp Asp Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val
 900 905 910

Gln Ser Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe
 915 920 925

Leu Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
 930 935 940

Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp
 945 950 955 960

Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly
 965 970 975

Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser
 980 985 990

Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp Leu
 995 1000 1005

Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp Lys Gly Ile Ile Tyr Tyr
 1010 1015 1020

Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala Phe Ile Gln Asp Asp
 1025 1030 1035

Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly His Leu Val Thr
 1040 1045 1050

Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe Phe Leu Pro Asn
 1055 1060 1065

Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn Glu Asp Gly Thr
 1070 1075 1080

ES 2 800 724 T3

Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val Phe Asp Gln Tyr
 1085 1090 1095

Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe Asp Asp Ala Gly
 1100 1105 1110

Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp Gly His Gln Gln
 1115 1120 1125

Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp Lys Phe Val Ile
 1130 1135 1140

Gly Thr Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro Gly Ser Gly Asn
 1145 1150 1155

Leu Ala Ile Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys Asn Gln Trp Phe
 1160 1165 1170

Tyr Phe Asp Gly Asn Gly His Ala Val Thr Gly Phe Gln Thr Ile
 1175 1180 1185

Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly His Gln Ser Lys
 1190 1195 1200

Gly Glu Phe Ile Asp Ala Asp Gly
 1205 1210

<210> 24
 <211> 1012
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Dextrano sacarasa truncada

<400> 24

Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr
 1 5 10 15

Tyr Tyr Phe Asp Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp
 20 25 30

Asn Asn Ile Gln Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln
 35 40 45

Tyr Val Thr Ile Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly
 50 55 60

Asp Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe
 65 70 75 80

Asn Asp Glu Gly Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn

ES 2 800 724 T3

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

ES 2 800 724 T3

900 905 910
 Gln Ser Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe
 915 920 925
 Leu Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
 930 935 940
 Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp
 945 950 955 960
 Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly
 965 970 975
 Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser
 980 985 990
 Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp Leu
 995 1000 1005
 Ser Glu Thr Gly
 1010

5 <210> 25
 <211> 882
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Dextrano sacarasa truncada

<400> 25

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

ES 2 800 724 T3

Ile Ser Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser Leu Leu
115 120 125

Asn Glu Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys Ile Ser
130 135 140

Ala Gln Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala Phe Ile
145 150 155 160

Val Ala Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser Asn Asp
165 170 175

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

Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln
195 200 205

Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu
210 215 220

Leu Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala
225 230 235 240

Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr
245 250 255

Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val
260 265 270

Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys
275 280 285

Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu
290 295 300

Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp
305 310 315 320

Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu
325 330 335

Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg
340 345 350

Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn
355 360 365

Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val
370 375 380

ES 2 800 724 T3

Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu
 385 390 395 400
 Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val
 405 410 415
 Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn
 420 425 430
 Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro
 435 440 445
 Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala
 450 455 460
 Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg
 465 470 475 480
 Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp
 485 490 495
 Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp
 500 505 510
 Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser
 515 520 525
 Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His
 530 535 540
 Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr
 545 550 555 560
 Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val
 565 570 575
 Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile
 580 585 590
 Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val
 595 600 605
 Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr
 610 615 620
 Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp
 625 630 635 640
 Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr
 645 650 655

ES 2 800 724 T3

Asp Ser Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln
660 665 670

Phe Lys Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg
675 680 685

Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr
690 695 700

Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr
705 710 715 720

Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser
725 730 735

Gly Ile Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu
740 745 750

Pro Glu Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp
755 760 765

Asp Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser
770 775 780

Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Glu
785 790 795 800

Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln Ile Ser
805 810 815

Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp Ala Ala
820 825 830

Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly Tyr Val
835 840 845

Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser Asn Thr
850 855 860

Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp Leu Ser Glu
865 870 875 880

Thr Gly

<210> 26
<211> 1299
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Mutada/truncada

10

<400> 26

ES 2 800 724 T3

Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Phe Asp Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp
 20 25 30
 Asn Asn Ile Gln Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln
 35 40 45
 Tyr Val Thr Ile Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly
 50 55 60
 Asp Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe
 65 70 75 80
 Asn Asp Glu Gly Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn
 85 90 95
 Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile
 100 105 110
 Lys Asn Ile Glu Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu
 115 120 125
 Lys Lys Gly Phe Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp
 130 135 140
 Gln Glu Thr Gly Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu
 145 150 155 160
 Gly Leu Thr Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His
 165 170 175
 Gly Thr Asp Ala Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala
 180 185 190
 Ser Ser Trp Tyr Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp
 195 200 205
 Glu Pro Ser Thr Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp
 210 215 220
 Pro Asp Lys Asn Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu
 225 230 235 240
 Gly Phe Ile Ser Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser
 245 250 255
 Leu Leu Asn Glu Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys

ES 2 800 724 T3

260 265 270
 Ile Ser Ala Gln Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala
 275 280 285
 Phe Ile Val Ala Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser
 290 295 300
 Asn Asp His Leu Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu
 305 310 315 320
 Thr Pro Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr
 325 330 335
 Asn Gln Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly
 340 345 350
 Phe Glu Leu Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val
 355 360 365
 Gln Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr
 370 375 380
 Ile Thr Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp
 385 390 395 400
 Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr
 405 410 415
 Phe Lys Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln
 420 425 430
 His Leu Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val
 435 440 445
 Thr Asp Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr
 450 455 460
 Gln Leu Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met
 465 470 475 480
 Gln Arg Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr
 485 490 495
 Glu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Tyr
 500 505 510
 Asp Ala Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp
 515 520 525
 Val Glu Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe

ES 2 800 724 T3

805 810 815
 Tyr Arg Ser Ser₈₂₀ Thr Asp Thr Ser Phe₈₂₅ Leu Asp Ser Ile Ile₈₃₀ Gln Asn
 Gly Tyr Ala₈₃₅ Phe Thr Asp Arg Tyr₈₄₀ Asp Leu Gly Tyr Gly₈₄₅ Thr Pro Thr
 Lys Tyr₈₅₀ Gly Thr Ala Asp Gln₈₅₅ Leu Arg Asp Ala Ile₈₆₀ Lys Ala Leu His
 Ala₈₆₅ Ser Gly Ile Gln Ala₈₇₀ Ile Ala Asp Trp Val₈₇₅ Pro Asp Gln Ile Tyr₈₈₀
 Asn Leu Pro Glu Gln₈₈₅ Glu Leu Ala Thr Val₈₉₀ Thr Arg Thr Asn₈₉₅ Ser Phe
 Gly Asp Asp Asp₉₀₀ Thr Asp Ser Asp Ile₉₀₅ Asp Asn Ala Leu Tyr₉₁₀ Val Val
 Gln Ser Arg₉₁₅ Gly Gly Gly Gln Tyr₉₂₀ Gln Glu Met Tyr Gly₉₂₅ Gly Ala Phe
 Leu Glu₉₃₀ Glu Leu Gln Ala Leu₉₃₅ Tyr Pro Ser Leu Phe₉₄₀ Lys Val Asn Gln
 Ile₉₄₅ Ser Thr Gly Val Pro₉₅₀ Ile Asp Gly Ser Val₉₅₅ Lys Ile Thr Glu Trp₉₆₀
 Ala Ala Lys Tyr Phe₉₆₅ Asn Gly Ser Asn Ile₉₇₀ Gln Gly Lys Gly Ala₉₇₅ Gly
 Tyr Val Leu Lys₉₈₀ Asp Met Gly Ser Asn₉₈₅ Lys Tyr Phe Lys Val₉₉₀ Val Ser
 Asn Thr Glu₉₉₅ Asp Gly Asp Tyr Leu₁₀₀₀ Pro Lys Gln Leu Thr₁₀₀₅ Asn Asp Leu
 Ser Glu₁₀₁₀ Thr Gly Phe Thr His₁₀₁₅ Asp Asp Lys Gly Ile₁₀₂₀ Ile Tyr Tyr
 Thr Leu₁₀₂₅ Ser Gly Tyr Arg Ala₁₀₃₀ Gln Asn Ala Phe Ile₁₀₃₅ Gln Asp Asp
 Asp Asn₁₀₄₀ Asn Tyr Tyr Tyr Phe₁₀₄₅ Asp Lys Thr Gly His₁₀₅₀ Leu Val Thr
 Gly Leu₁₀₅₅ Gln Lys Ile Asn Asn₁₀₆₀ His Thr Tyr Phe Phe₁₀₆₅ Leu Pro Asn
 Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn Glu Asp Gly Thr

ES 2 800 724 T3

1070						1075						1080		
Ile	Val	Tyr	Phe	Asp	Lys	Lys	Gly	His	Gln	Val	Phe	Asp	Gln	Tyr
	1085					1090					1095			
Ile	Thr	Asp	Gln	Asn	Gly	Asn	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Asp	Ala	Gly
	1100					1105					1110			
Val	Met	Leu	Lys	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Asp	Gly	His	Gln	Gln
	1115					1120					1125			
Tyr	Phe	Asp	Gln	Asn	Gly	Val	Gln	Val	Lys	Asp	Lys	Phe	Val	Ile
	1130					1135					1140			
Gly	Thr	Asp	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Glu	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn
	1145					1150					1155			
Leu	Ala	Ile	Leu	Arg	Tyr	Val	Gln	Asn	Ser	Lys	Asn	Gln	Trp	Phe
	1160					1165					1170			
Tyr	Phe	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Ala	Val	Thr	Gly	Phe	Gln	Thr	Ile
	1175					1180					1185			
Asn	Gly	Lys	Lys	Gln	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Asp	Gly	His	Gln	Ser	Lys
	1190					1195					1200			
Gly	Glu	Phe	Ile	Asp	Ala	Asp	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Thr	Ser	Ala
	1205					1210					1215			
Thr	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Gly	Val	Gln	Lys	Ile	Asn	Gly	Ile
	1220					1225					1230			
Thr	Tyr	Ala	Phe	Asp	Asn	Thr	Gly	Asn	Leu	Ile	Thr	Asn	Gln	Tyr
	1235					1240					1245			
Tyr	Gln	Leu	Ala	Asp	Gly	Lys	Tyr	Met	Leu	Leu	Asp	Asp	Ser	Gly
	1250					1255					1260			
Arg	Ala	Lys	Thr	Gly	Phe	Val	Leu	Gln	Asp	Gly	Val	Leu	Arg	Tyr
	1265					1270					1275			
Phe	Asp	Gln	Asn	Gly	Glu	Gln	Val	Lys	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Asp
	1280					1285					1290			
Pro	Asp	Thr	Asn	Leu	Ser									
	1295													

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una dextranasa que consiste en una secuencia que tiene el 90 %, el 95 % o el 98 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del fragmento del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1423 de SEQ ID NO: 6 y como se define en SEQ ID NO: 22, el fragmento del aminoácido en la posición 125 al aminoácido 1335 de SEQ ID NO: 7 y como se define en SEQ ID NO: 23, el fragmento del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1136 de SEQ ID NO: 8 y como se define en SEQ ID NO: 24, el fragmento del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1006 de SEQ ID NO: 9 y como se define en la SEQ ID NO: 25, y el fragmento del aminoácido en la posición 125 al aminoácido en la posición 1423 de SEQ ID NO: 10 y como se define en SEQ ID NO: 26, en donde la actividad enzimática de los dextranos que se forman se mantiene y en donde la dextranasa conserva su especificidad para sintetizar enlaces alfa-1,6.
- 15 2. La dextranasa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los dextranos formados tienen un tamaño controlado de 1.300 a 52.000 Da centrado alrededor de 10.000 Da o un tamaño controlado de 7.000 a $1,7 \times 10^5$ Da centrado alrededor de 40.000 Da.
- 20 3. La dextranasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde los dextranos formados tienen una masa molar alta de 10^6 a 10^8 Da y tiene propiedades reológicas modificadas.
- 25 4. La dextranasa de acuerdo con la reivindicación 3, en donde las propiedades reológicas modificadas son aquellas que tienen la propiedad de cambiar de un comportamiento de tipo solución a un gel después de la aplicación de una segunda serie de tensiones de cizalla.
- 30 5. La dextranasa de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha propiedad es el comportamiento no Newtoniano.
- 35 6. Una proteína de fusión que comprende en la posición N- terminal y/o C- terminal, una etiqueta de proteína seleccionada del grupo de una etiqueta poli-His, una etiqueta de epítipo c-myc, una etiqueta HA, una etiqueta T7, una etiqueta S, una etiqueta trpE, una etiqueta de avidina/estreptavidina, una etiqueta de estafilococo A, una etiqueta de proteína G, una etiqueta de dihidrofolato reductasa, etiquetas de dominio de unión a celulosa, una etiqueta de policisteína, una etiqueta de fenilalanina, una etiqueta bacteriana GST, una etiqueta de proteína de unión a maltosa, una etiqueta de tioredoxina, una etiqueta de beta-galactosidasa y una etiqueta de proteína VSV fusionada a la dextranasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína de fusión conserva su especificidad para sintetizar enlaces alfa-1,6.

secuencia DSR-S vardel Δ4N

M G : etiqueta tiorredoxina
 H H : etiqueta 6xHis
 T Q : proteína de interés

M	G	S	D	K	I	I	H	L	T	D	D	S	P	D	T	D	V	18
ATG	GGA	TCT	GAT	AAA	ATT	ATT	CAT	CTG	ACT	GAT	GAT	TCT	TTT	GAT	ACT	GAT	GTA	54
L	K	A	D	G	A	I	L	V	D	F	W	A	H	N	C	G	P	36
CTT	AAG	GCA	GAT	GGT	GCA	ATC	CTG	GTT	GAT	TTC	TGG	GCA	CAC	TGG	TGC	GGT	CCG	108
C	K	M	I	A	P	I	L	D	E	I	A	D	E	Y	Q	G	K	54
TGC	AAA	ATG	ATC	GCT	CCG	ATT	CTG	GAT	GAA	ATC	GCT	GAC	GAA	TAT	CAG	GGC	AAA	162
L	T	V	A	K	L	N	I	D	H	N	P	G	T	A	P	K	Y	72
CTG	ACC	GTT	GCA	AAA	CTG	AAC	ATC	GAT	CAC	AAC	CCG	GGC	ACT	GGG	CCG	AAA	TAT	216
G	I	R	G	I	P	T	L	L	L	F	X	N	G	E	V	A	A	90
GGC	ATC	CST	GGT	ATC	CCG	ACT	CTG	CTG	CTG	TTC	AAA	AAC	GGT	GAA	GTG	GCG	GCA	270
T	K	V	G	A	L	S	E	G	Q	L	K	E	F	L	D	A	N	108
ACC	AAA	GTG	GGT	GCA	CTG	TCT	AAR	GGT	CMG	TTG	AAA	GAG	TTC	CTC	GAC	GCT	AAC	324
L	A	G	S	G	S	G	D	D	D	D	K	L	A	L	M	T	Q	126
CTG	GCC	GGC	TCT	GGT	TCC	GGT	GAT	GAC	GAT	GAC	ARG	CTC	GCC	CTT	ATG	ACA	CAA	378
Q	V	S	G	E	Y	V	E	K	D	G	S	W	Y	I	Y	F	D	144
CAA	GTT	AGC	GGC	AAG	TAC	GTT	GAA	AAA	GAC	GGT	AGT	TGG	TAT	TAT	TAT	TTT	GAT	432
D	G	K	N	A	X	G	L	S	T	I	D	N	N	I	Q	Y	F	162
GAT	GCC	AAA	AAT	GCT	AAA	GGT	TTA	TCA	ACG	ATA	GAC	AAC	AAT	ATT	CAA	TAT	TTT	486
Y	E	S	G	E	Q	A	E	G	Q	Y	V	T	I	D	N	Q	T	180
TAC	GAG	AGT	GGT	AAA	CAA	GCC	AAA	GGT	CAG	TAT	GTC	ACA	ATT	GAT	AAT	CAA	ACA	540
Y	Y	F	D	K	G	S	G	D	E	L	T	G	L	Q	S	I	D	198
TAT	TAT	TTT	GAT	ARG	GGC	TCA	GST	GAT	GAG	TTA	ACT	GGT	CTG	CAA	AGC	ATT	GAT	594
G	N	I	V	A	F	N	D	E	G	Q	Q	I	F	N	Q	Y	Y	216
GGG	AAC	ATA	GTT	GCT	TTT	AAC	GAT	GAA	GGG	CAA	CAA	ATT	TTT	AAT	CAA	TAT	TAC	648
Q	S	R	N	G	T	T	Y	Y	F	D	D	K	G	E	A	A	T	234
CAA	TCT	GAA	AAT	GGT	ACA	ACA	TAC	TAC	TTT	GAT	GAT	AAA	GGA	CAC	GCT	GCT	ACC	702
G	I	K	N	I	E	G	E	H	Y	Y	F	D	N	L	G	Q	L	252
GGT	AAT	AAG	AAT	ATC	GAG	GGC	AAA	AAT	TAT	TAT	TTT	GAT	AAT	CIT	GGG	CAA	CTA	756
K	K	G	F	S	G	V	I	D	G	Q	I	N	T	F	D	Q	E	270
AAA	AAA	GGC	TTC	TCT	GGT	CTG	ATT	GAT	GGT	CAA	ATA	ATG	ACA	TTT	GAT	CAG	GAA	810
T	G	Q	E	V	S	N	T	T	S	H	I	X	E	G	L	T	T	288
ACA	GGG	CAA	GAA	GTT	TCT	AAC	ACA	ACT	TCT	GAA	ATA	AAA	GAA	GGT	TTG	ACG	ACT	864
Q	N	T	D	Y	S	E	H	N	A	A	H	Q	T	D	A	E	D	306
CAA	AAC	ACG	GAT	TAT	AGC	GAA	CAT	AAT	GCA	GCC	CAC	GGT	ACG	GAT	GCT	GAG	GAC	918
F	E	N	I	D	G	Y	L	T	A	S	S	N	Y	R	F	T	G	324
TTT	GAA	AAT	ATT	GAC	GGC	TAT	TTA	ACA	GCT	AGT	TCA	TGG	TAT	CGT	CCA	ACA	GGT	972
I	L	R	N	G	T	D	N	E	P	S	T	D	T	D	F	R	P	342
ATT	TTA	CGT	AAC	GGA	ACA	GAC	TGG	GAA	CCT	TCT	ACA	GAT	ACA	GAT	TTC	AGT	CCA	1026
I	L	S	V	N	N	F	D	K	N	T	Q	V	N	Y	L	N	Y	360
ATA	TIG	TCA	GTG	TGG	TGG	CCA	GAT	AAG	AAC	ACC	CAG	GTC	AAT	TAT	TTA	AAT	TAC	1080
K	A	D	L	G	F	I	S	N	A	D	S	F	E	T	G	D	S	378
ATG	GCT	GAT	TTA	GGG	TTT	ATC	AGT	AAT	GCG	GAC	AGT	TTT	GAA	ACT	GGG	GAT	AGC	1134

FIGURA 1

Q	S	L	L	N	K	A	S	N	Y	V	Q	K	S	I	K	N	K	396
CRA	AGC	TTA	TTA	AAT	GAA	GCA	AGT	AAC	TAT	GTT	CAA	AAA	TCA	ATT	GAA	ATG	AAA	1188
I	S	A	Q	Q	S	T	E	N	L	K	D	A	N	A	A	F	I	414
ATT	AGT	GCG	CRA	CRA	AGT	ACA	GAG	TGG	TTA	AAG	GAT	GCA	ATG	GCG	GCC	TTC	ATT	1242
V	A	Q	P	Q	N	N	E	E	S	E	D	M	S	N	D	E	L	432
GTC	GCG	CRA	CCA	CAG	TGG	AAT	GAA	ACT	AGT	GAA	GAT	ATG	AGC	AAT	GAC	CAT	TTA	1296
Q	N	G	A	L	T	Y	V	N	S	P	L	T	P	D	A	N	S	450
CRA	AAT	GCG	GCA	TTA	ACT	TAT	GTC	AAC	AGT	CCA	CTG	ACA	CCT	GAC	GCT	AAT	TCA	1350
N	F	R	L	L	N	R	T	P	T	N	Q	T	G	E	Q	A	Y	468
AAC	TTT	AGA	CTA	CTT	AAT	CGG	ACA	CCA	ACA	AAC	CAG	ACT	GGT	GAA	CRA	GCG	TAT	1404
N	L	D	N	S	K	G	G	P	K	L	L	L	A	N	D	V	D	486
AAT	TTA	GAT	AAT	TCA	AAA	GGT	GGT	TTT	GAA	TTG	TTG	TTA	GCC	AAT	GAC	GTT	GAT	1458
N	S	N	P	V	V	Q	A	R	Q	L	N	W	L	Y	Y	L	M	504
AAT	TCA	AAC	CCT	STA	GTA	CRA	GCA	GAA	CRA	TTG	AAT	TGG	TTA	TAT	TAT	TTA	ATG	1512
N	F	G	T	I	T	A	N	D	A	D	A	N	F	D	G	I	R	522
AAT	TTT	GGT	ACG	ATT	ACG	GCC	AAC	GAC	GCG	GAT	GCT	AAT	TTT	GAT	GGT	ATT	CCT	1566
V	D	A	V	D	N	V	D	A	D	L	L	Q	I	A	A	D	Y	540
GTA	GAT	GCA	GTC	GAC	AAT	GTC	GAT	GCT	GAT	TTG	TTA	CAA	ATT	GCT	GCC	GAT	TAT	1620
F	Z	L	A	Y	G	V	D	Q	H	D	A	T	A	N	Q	E	L	558
TTC	AAA	CTA	GCT	TAC	GGT	GTT	GAT	CAA	AAT	GAT	GCT	ACT	GCT	AAT	CAG	CAT	CTT	1674
S	I	L	E	D	W	S	H	N	D	P	L	Y	V	E	D	Q	G	576
TCA	ATT	TTG	GAA	GAT	TGG	AGT	CAC	AAT	GAT	CCT	TTG	TAT	GTA	ACA	GAT	CAA	GGA	1728
S	N	Q	L	E	M	D	D	Y	V	H	T	Q	L	I	W	S	L	594
AGC	AAT	CRA	TTA	ACC	ATG	GAT	GAT	TAT	GTC	CAC	ACA	CAA	TTA	ATC	TGG	TCT	CTA	1782
T	X	S	S	D	I	R	G	T	M	Q	R	F	V	D	Y	Y	M	612
ACA	AAA	TCA	TCT	GAC	ATA	CGA	GGT	ACA	ATG	CAG	CGC	TTC	GTC	GAT	TAT	TAT	ATG	1836
V	D	R	S	N	D	S	T	E	N	K	A	I	P	N	Y	S	Y	630
GTC	GAT	CGA	TCT	AAT	GAT	AGT	ACA	GAA	AAC	GAA	GCC	ATT	CCT	AAT	TAC	AGC	TTT	1890
V	R	A	H	D	S	E	V	Q	T	V	I	A	Q	I	V	S	D	648
GTA	CCT	GCA	CAC	GAC	AGC	GAA	GTC	CAA	ACG	GTT	ATT	GCC	CRA	ATT	GTT	TCC	GAT	1944
L	Y	F	D	V	E	N	S	L	A	P	T	T	E	Q	L	A	A	666
TTG	TAT	CCT	GAT	GTT	GAA	AAT	AGT	TTA	GCA	CCA	ACA	ACA	GAA	CAA	TTG	GCA	GCT	1998
A	F	X	V	Y	N	E	D	K	K	L	A	D	K	K	Y	T	Q	684
GCT	TTC	AAA	GTA	TAC	AAT	GAA	GAT	GAA	AAA	TTA	GCA	GAC	AAA	AAG	TAC	ACA	CAA	2052
Y	N	M	A	S	A	Y	A	M	L	L	T	N	K	D	E	V	P	702
TAT	AAT	ATG	GCT	AGT	GCT	TAT	GCG	ATG	TTG	CTA	ACC	AAT	AAG	GAT	ACT	GTT	CCT	2106
R	V	Y	Y	S	D	L	Y	T	D	D	G	Q	Y	M	A	T	X	720
CGT	GTC	TAT	TAT	GCC	GAT	TTA	TAT	ACA	GAT	GAT	GGT	CAA	TAT	ATG	GCA	ACA	AAG	2160
S	P	Y	Y	D	A	I	N	T	L	L	K	A	R	V	Q	Y	V	738
TCR	CCA	TAC	TAT	GAT	GCG	ATT	AAC	ACT	TTG	CTA	AAG	GCT	AGA	GTT	CAG	TAT	GTT	2214
A	G	G	Q	S	K	S	V	D	S	N	D	V	L	T	S	V	R	756
GCT	GGT	GCG	CRA	TCG	ATG	TCC	GTT	GAT	AGT	AAT	GAC	GTC	TTA	ACA	AGT	GTT	CGC	2268
Y	G	K	D	A	M	T	A	S	D	T	G	T	S	E	T	R	T	774
TAT	GGT	AAA	GAT	GCC	ATG	ACA	GCT	TCT	GAC	ACT	GGA	ACA	TCT	GAG	ACG	CGT	ACT	2322
E	G	I	G	V	I	V	S	N	N	A	E	L	Q	L	E	D	G	792
GAA	GGT	ATT	GGA	GTC	ATC	GTC	AGC	AAT	AAC	GCG	GAG	CTA	CRA	TTA	GAG	GAT	GGG	2376
H	T	V	T	L	K	N	G	A	A	H	K	N	Q	A	Y	R	A	810
CAT	ACT	GTC	ACA	TTG	CAT	ATG	GGG	GCA	GCT	CAT	AAG	AAC	CRA	GCT	TAT	CGT	GCT	2430

FIGURA 1 (continuación)

ES 2 800 724 T3

L L S T T A D G L A Y Y D T D E N A	828
TTG TTA TCA ACA ACT GCA GAT GGA TTA GCT TAT TAT GAT ACT GAT GAA AAT GCA	2484
P V A Y T D A N G D L I F T N E S I	846
CCT GCG GCG TAC ACA GAT GCT AAC GGC GAT TTG ATT TTT ACG AAT GAA TCA ATT	2538
Y G V Q E P Q V S G Y L A V W V P V	864
TAT GGT GTA CAA AAT CCA CAA GTT TCT GGT TAC TTG GCA GTT TGG GTT CCG GTA	2592
G A Q Q D Q D A R T A S D T T T N T	882
GGT GCG CAA CAA GAT CAA GAT GCA CCA ACG GCC TCT GAT ACA ACA ACA AAC ACG	2646
S D K V F E S N A A L D S Q V I Y E	900
AGT GAT AAA GTG TTC CAT TCA AAC GCT GCT CTT GAT TCT CAA GTC ATC TCA GAA	2700
G F S H F Q R F A T D S S E Y T N V	918
GGT TTC TCA AAC TTC CAA GCA TTT GCT ACA GAC AGC AGT GAA TAT ACA AAC GTA	3754
V I R Q N A D Q F K Q W G V T S F Q	936
GTC ATC GCT CAG AAT GCG GAC CAA TTT AAG CAA TGG GGT GTG ACA AGC TTC CAA	2808
L A P Q Y R S S T D T S F L D S I I	954
TTG GCA CCA CAA TAT CST TCA AGT ACA GAT ACA AGT TTC TTG GAT TCA ATT ATT	2862
Q N G Y A F T D R Y D L G Y G T P T	972
CAA AAC GGG TAT GCA TTC ACG GAT CST TAT GAC TTA GGT TAT GGC ACA CCG ACA	2916
K Y G T A D Q L R D A I K A L H A S	990
AAA TAT GGA ACT SCT GAT CAG TTG CCG GAT GCT ATT AAA GCC TTA CAT GCT AGC	2970
G I Q A I A D N V P D Q I Y H L P E	1008
GGT ATT CAA GCC ATT GCC GAT TGG GTG CCG GAC CAA ATT TAT AAT TTG CCA GAG	3024
Q E L A T V T R T N S F G D D D T D	1026
CAA GAA TTA GCT ACT GTC ACA AGA ACA AAT TCA TTT GGA GAT GAC GAT ACA GAT	3078
S D I D N A L Y V V Q S R G G G Q Y	1044
TCT GAT ATT GAC AAT GCC TTA TAT GTT GTA CAA AGT CGT GGG GGT GGT CAA TAT	3132
Q E N Y G G A F L H B L Q A L Y P S	1062
CAA GAG ATG TAT GGT GGT GCC TTC TTA GAA GAG TTA CAG GCA CTC TAT CCA TCC	3186
L F K V N Q I S T G V P I D Q S V K	1080
CTA TTT AAA GTG AAT CAA ATC TCA ACT GGC GTT CCA ATT GAT GGC AGT GTA AAG	3240
I T E W A A K Y F N G S N I Q G K G	1098
ATT ACT GAG TGG GCG GCT AAG TAC TTC AAT GGC TCT AAC ATC CAA GGT AAA GGT	3294
A G Y V L K D N G S W K Y F K V V S	1116
GCT GGA TAC GTA TTG AAA GAT ATG GGT TCT AAT AAG TAC TTT AAG GTC GTT TCG	3348
N T E D G D Y L F K Q L T N D L S E	1134
AAC ACT GAG GAT GGT GAC TAC TTA CCA AAA CAG TTA ACT AAT GAT CTG TCA GAA	3402
T G F T H D D K G I I Y Y T L S G Y	1152
ACT GGC TTT ACA CAC GAT GAT AAA GGA ATC ATC TAT TAT ACA TTA AGT GGT TAT	3456
R A Q N A F I Q D D D N N Y Y Y F D	1170
CGT GCC CAA AAT GCA TTT ATT CAA GAT GAT GAT AAT AAC TAT TAC TAT TTT GAT	3510
K T G H L V T G L Q K I N N H T Y F	1188
AAA ACA GGT CAT TTA GTA ACA GGT TTG CAA AAG ATT AAT AAC CAT ACC TAC TTC	3564
F L P N G I E L V K S F L Q N E D G	1206
TTC TTA CCT AAT GGT ATC GAA CTG GTC AAG AGC TTC TTA CAA AAC GAA GAT GGT	3618
T I V Y F D E K G H Q V F D Q Y I T	1224
ACR AIT GTT TAT TTC GAT AAG AAA GGT CAT CAA GTT TTT GAT CAA TAT ATA ACT	3672

FIGURA 1 (continuación)

ES 2 800 724 T3

D	Q	N	G	N	A	Y	Y	F	D	D	A	G	V	M	L	K	S	1242
GAT	CAA	AAT	GGA	AAT	GCG	TAT	TAC	TTT	GAT	GAT	GCT	GGT	GTA	ATG	CCT	AAA	TCA	3726
G	L	A	T	I	D	G	H	Q	Q	Y	F	D	Q	N	G	V	Q	1260
GGG	CTT	GCA	ACG	ATT	GAT	GGA	CAT	CAA	CAG	TAT	TTT	GAT	CBA	AAT	GGT	GTG	CAG	3780
V	K	D	K	F	V	I	G	T	D	G	Y	K	Y	Y	F	E	F	1278
GTT	AAG	GAT	AAG	TTT	GIG	ATT	GGC	ACT	GAT	GGT	TAT	AAG	TAT	TAC	TTT	GAA	CCA	3834
G	S	G	N	L	A	I	L	R	Y	V	Q	N	S	K	N	Q	W	1296
GGT	AGT	GGT	AAC	TTA	GCT	ATC	CTA	CGT	TAT	GTG	CAA	AAT	AGT	AAG	AAT	CAA	TGG	3888
F	Y	F	D	G	N	G	H	A	V	T	G	F	Q	T	I	N	G	1314
TTC	TAT	TTT	GAT	GGT	AAT	GGC	CAT	GCT	GTC	ACT	GGT	TTC	CAA	ACA	ATT	AAT	GGT	3942
K	K	Q	Y	Y	N	D	G	H	Q	S	K	G	E	F	I	D		1332
AAA	AAA	CBA	TAT	TTC	TAT	AAT	GAT	GGT	CAT	CAA	AGT	AAA	GGT	GAA	TTC	ATT	GAT	3996
A	D	G	D	T	F	Y	T	S	A	T	D	G	R	L	V	T	G	1350
GCA	GAC	GGG	GAT	ACT	TTC	TAT	ACG	AGT	GCC	ACT	GAT	GGT	CGC	CTA	GTA	ACT	GGT	4050
V	Q	K	I	N	G	I	T	Y	A	F	D	N	T	G	N	L	I	1368
GTT	CAG	AAG	ATT	AAT	GGT	ATT	ACC	TAT	GCT	TTT	GAT	AAC	ACA	GGA	AAT	TTG	ATC	4104
T	N	Q	Y	Y	Q	L	A	D	G	K	Y	M	L	L	D	D	S	1386
ACA	AAT	CAG	TAT	TAT	CAA	TTA	GCA	GAT	GGT	AAA	TAT	ATG	TTG	TTA	GAT	GAT	AGT	4158
G	R	A	K	T	G	F	V	L	Q	D	G	V	L	R	Y	F	D	1404
GGT	CGT	GCG	AAA	ACA	GGG	TTT	GTA	TTG	CAA	GAT	GGT	GTA	CTA	AGA	TAC	TTC	GAT	4212
Q	N	G	E	Q	V	R	D	A	I	I	V	D	P	D	T	N	L	1422
CAA	AAC	GGT	GAG	CAA	GTG	AAA	GAT	GCT	ATC	ATT	GTG	GAT	CCA	GAT	ACT	AAC	TTG	4266
S	Y	K	G	E	L	E	G	K	P	I	P	N	P	L	L	G	L	1440
AGT	TAC	AAG	GCC	GAG	CCT	GAA	GGT	AAG	CCT	ATC	CCT	AAC	CCT	CTC	CTC	GGT	CTC	4320
D	S	T	R	T	G	H	H	H	H	H								1452
GAT	TCT	ACG	CGT	ACC	GGT	CAT	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT							4356

FIGURA 1 (fin)

ES 2 800 724 T3

secuencia DSR-S vardel Δ3

M G : etiqueta tioredoxina
H H : etiqueta 6xHis
T Q : proteína de interés

<u>M</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	18
ATG	GGA	TCT	GAT	AAA	ATT	ATT	CAT	CTG	ACT	GAT	GAT	TCT	TTT	GAT	ACT	GAT	GTA	54
<u>L</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>W</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	36
CTT	AAG	GCA	GAT	GGT	GCA	ATC	CTG	GTT	GAT	TTC	TGG	GCA	CAC	TGG	TGC	GGT	CCG	108
<u>C</u>	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	54
TGC	AAA	ATG	ATC	GCT	CCG	ATC	CTG	GAT	GAA	ATC	GCT	GAC	GAA	TAT	CAG	GGC	AAA	162
<u>L</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	72
CTG	ACC	GTT	GCA	AAA	CTG	AAC	ATC	GAT	CAC	AAC	CCG	GGC	ACT	GCG	CCG	AAA	TAT	216
<u>G</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	90
GGC	ATC	CGT	GGT	ATC	CCG	ACT	CTG	CTG	CTG	TTC	AAA	AAC	GGT	GAA	GTG	GCG	GCA	270
<u>T</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	108
ACC	AAA	GTG	GGT	GCA	CTG	TCT	AAA	GGT	CAG	TTG	AAA	GAG	TTC	CTC	GAC	GCT	AAC	324
<u>L</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>Z</u>	<u>M</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	126
CTG	GCC	GGC	TCT	GGA	TCC	GGT	GAT	GAC	GAT	GAC	AAG	CTC	GCC	CTT	ATG	ACA	CAA	378
<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	144
CAA	GTT	AGC	GGC	AAG	TAC	GTT	GAA	AAA	GAC	GGT	AGT	TGG	TAT	TAT	TAT	TTT	GAT	432
<u>D</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>Z</u>	<u>Q</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	162
GAT	GGC	AAA	AAT	GCT	AAA	GGT	TTA	TCA	ACG	ATA	GAC	AAC	AAT	ATT	CAA	TAT	TTT	486
<u>Y</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	180
TAC	GAG	AGT	GGT	AAA	CAA	GCC	AAA	GGA	CAG	TAT	GTC	ACA	ATT	GAT	ATT	CAA	ACA	540
<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	198
TAT	TAT	TTT	GAT	AAG	GGC	TCA	GGT	GAT	GAG	TTA	ACT	GGT	CTG	CAA	AGC	ATT	GAT	594
<u>G</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	216
GGG	AAC	ATA	GTT	GCT	TTT	AAC	GAT	GAA	GGG	CAA	CAA	ATT	TTT	AAT	CAA	TAT	TAC	648
<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>H</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	234
CAA	TCT	GAA	AAT	GGT	ACA	ACA	TAC	TAC	TTT	GAT	GAT	AAA	GGA	CAC	GCT	GCT	ACC	702
<u>G</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	252
GGT	ATT	AAG	AAT	ATC	GAG	GGC	AAA	AAT	TAT	TAT	TTT	GAT	AAT	CTT	GGG	CAA	CTA	756
<u>K</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>M</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	270
AAA	AAA	GGC	ITC	TCT	GGT	GTG	ATT	GAT	GGT	CAA	ATA	ATG	ACA	TTT	GAT	CAG	GAA	810
<u>T</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	288
ACA	GGG	CAA	AAA	GTT	TCT	AAC	ACA	ACT	TCT	GAA	ATA	AAA	GAA	GGT	TIG	ACG	ACT	864
<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	306
CAA	AAC	ACG	GAT	TAT	AGC	GAA	CAT	AAT	GCA	GCC	CAC	GGT	ACG	GAT	GCT	GAG	GAC	918
<u>F</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	324
TTT	CAA	AAT	ATT	CAC	GCC	TAT	TTA	ACA	GCT	AGT	TCA	TGG	TAT	CGT	CCA	ACA	GGT	972
<u>I</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	342
ATT	TTA	CGT	AAC	GGA	ACA	GAC	TGG	GAA	CCT	TCT	ACA	GAT	ACA	GAT	TTC	AGA	CCA	1026
<u>I</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>W</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	360
ATA	TTG	TCA	GTG	TGG	TGG	CCA	GAT	AAG	AAC	ACC	CAG	GTC	AAT	TAT	TTA	AAT	TAC	1080

FIGURA 2

ES 2 800 724 T3

M A D L G F I S N A D S F E T G D S	378
ATG GCT GAT TTA GGG TTT ATC AGT AAT GCG GAC AGT TTT GAA ACT GGG GAT AGC	1134
Q S L L N E A S N Y V Q K S I E N K	396
CRA AGC TTA TTA AAT GAA GCA AGT AAC TAT GTT CAA AAA TCA ATT GAA ATG AAA	1188
I S A Q Q S T E N L K D A W A A F I	414
ATT AGT GCG CRA CRA AGT ACA GAG TGG TTA AAG GAT GCA ATG GCG GCC TTC ATT	1242
V A Q F Q N N E T S E D M S N D E L	432
GTC GCG CRA CCA CAG TGG AAT GAA ACT AGT GAA GAT ATG AGC AAT GAC CAT TTA	1296
Q N G A L T Y V N S P L T F D A N S	450
CRA AAT GGC GCA TTA ACT TAT GTC AAC AGT CCA CTG ACA CCT GAC GCT AAT TCA	1350
N F R L L N E T P T N Q T G E Q A Y	468
ATC TTT AGA CTA CTT AAT CCG ACA CCA ACA AAC CAG ACT GGT GAA CRA GCG TAT	1404
N L D N S K G G F E L L L A N D V D	486
AAT TTA GAT AAT TCA AAA GGT GGT TTT GAA TTG TTG TTA GCC AAT GAC GTT GAT	1458
N S M P V V Q A E Q L N W L Y Y L M	504
AAT TCA AAC CCT GTA GTA CRA GCA GAA CRA TTG AAT TGG TTA TAT TAT TTA ATG	1512
N F G T I T A N D A D A N F D G I R	522
AAT TTT GGT ACG AAT ACG GCC AAC GAC GCG GAT GCT AAT TTT GAT GGT AAT CGT	1566
V D A V D N V D A D L L Q I A A D Y	540
GTA GAT GCA GTC GAC AAT GTG GAT GCT GAT TTG TTA CRA ATT GCT GCC GAT TAT	1620
F K L A Y G V D Q N D A T A N Q K L	558
TTC AAA CTA GCT TAC GGT GGT GAT CRA AAT GAT GCT ACT GCT AAT CAG CAT CTT	1674
S I L E D W S H N D P L Y V T D Q G	576
TCA ATT TTG GAA GAT TGG AGT CAC AAT GAT CCT TTG TAT GTA ACA GAT CRA GGA	1728
S N Q L T M D D Y V H T Q L I W S L	594
AGC AAT CRA TTA ACC ATG GAT GAT TAT GTG CAC ACA CRA TTA ATC TGG TCT CTA	1782
T K S S D I R G T M Q R F V D Y Y M	612
ACA AAA TCA TCT GAC AIA CGA GGT ACA ATG CAG CGC TTC GTG GAT TAT TAT ATG	1836
V D R S N D S T E N E A I P N Y S F	630
GTG GAT CGA TCT AAT GAT AGT ACA GAA AAC GAA GCC ATT CCT AAT TAC AGC TTT	1890
V R A K D S E V Q T V I A Q I V S D	648
GTA CGT GCA CAC GAC AGC GAA GTG CRA ACG GTT ATT GCC CRA ATT GTT TCC GAT	1944
L Y P D V E N S L A P T T E Q L A A	666
TTG TAT CCT GAT GTT GAA AAT AGT TTA GCA CCA ACA ACA GAA CRA TTG GCA GCT	1998
A F K V Y N E D E K L A D K K Y T Q	684
GCT TTC ARA GTA TAC AAT GAA GAT GAA AAA TTA GCA GAC AAA AAG TAC ACA CRA	2052
Y N K A S A Y A M L L T N K D T V P	702
TAT AAT ATG GCT AGT GCT TAT GCG ATG TTG CTA ACC AAT AAG GAT ACT GTT CCT	2106
R V Y Y G D L Y T D D G Q Y M A T K	720
CGT GTC TAT TAT GCG GAT TTA TAT ACA GAT GAT GGT CRA TAT ATG GCA ACA AAG	2160
S P Y Y D A I N T L L K A R V Q I V	738
TCA CCA TAC TAT GAT GCG ATT AAC ACT TTG CTA AAG GCT AGA GTT CAG TAT GTT	2214
A G G Q S N S V D S N D V L T S Y R	756
GCT GGT GGC CAA TCG ATG TCC GTT GAT AGT AAT GAC GTG TTA ACA AGT GTT CGC	2268
Y G E D A M T A S D T G T S E T R T	774
TAT GGT AAA GAT GCC ATG ACA GCT TCT GAC ACT GGA ACA TCT GAG ACG CGT ACT	2322
E G I G V I Y S N N A E L Q L E D G	792
GAA GGT AAT GCA GTC ATC GTC AGC AAT AAC GCG GAG CTA CRA TTA GAG GAT GGG	2376

FIGURA 2 (continuación)

ES 2 800 724 T3

H T V T L H M G A A H K N Q A Y R A	810
CAT ACT GTC ACA TTG CAT ATG GGG GCA GCT CAT AAG AAC CAA GCT TAT CGT GCT	2430
L L S T T A D G L A Y Y D T D E N A	828
TTG TTA TCA ACA ACT GCA GAT GGA TTA GCT TAT TAT GAT ACT GAT GAA AAT GCA	2484
P V A Y T D A N G D L I Y T N E S I	846
CCT GTG GCG TAC ACA GAT GCT AAC GGC GAT TTG ATT TTT ACG AAT GAA TCA ATT	2538
Y G V Q N P Q V S G Y L A V N V P V	864
TAT GGT GTA CAA AAT CCA CAA GTT TCT GGT TAC TTG GCA GTT TGG GTT CCG GTA	2592
G A Q Q D Q D A R T A S D T T T N T	882
GGT GCG CAA CAA GAT CAA GAT GCA CCA ACG GCC TCT GAT ACA ACA ACA AAC ACG	2646
S D K V F H S N A A L D S Q V I Y H	900
ACT GAT AAA GTG TTC CAT TCA AAC GCT GCT CTT GAT TCT CAA GTC ATC TAC GAA	2700
G F S M F Q A F A T D S S E Y T N V	918
GGT TTC TCA AAC TTC CAA GCA TTT GCT ACA GAC AGC AGT GAA TAT ACA AAC GTA	2754
V I A Q N A D Q F K Q W G V T S F Q	936
GTC ATC GCT CAG AAT GCG GAC CAA TTT AAG CAA TGG GGT GTG ACA AGC TTC CAA	2808
L A P Q Y R S S T D T S F L D S I I	954
TTG GCA CCA CAA TAT CGT TCA AGT ACA GAT ACA AGT TTC TTG GAT TCA ATT ATT	2862
Q N G Y A F T D R Y D L G Y G T F T	972
CAA AAC GGG TAT GCA TTC ACG GAT CGT TAT GAC TTA GGT TAT GGC ACA CCG ACA	2916
X Y G T A D Q L R D A I K A L H A S	990
AAA TAT GGA ACT GCT GAT CAG TTG CCG GAT GCT ATT AAA GCC TTA CAT GCT AGC	2970
G I Q A I A D W V P D Q I Y N L P E	1008
GGT ATT CAA GCC ATT GCC GAT TGG GTG CCG GAC CAA ATT TAT AAT TTG CCA GAG	3024
Q E L A T V T R T N S F G D D D T D	1026
CAA GAA TTA GCT ACT GTC ACA AGA ACA AAT TCA TTT GGA GAT GAC GAT ACA GAT	3078
S D I D N A L Y V Y Q S R G G G Q Y	1044
TCT GAT ATT GAC AAT GCC TTA TAT GTT GTA CAA AGT CGT GGG GGT GGT CAA TAT	3132
Q E H Y G G A F L E E L Q A L Y P S	1062
CAA GAG ATG TAT GGT GGT GCC TTC TTA GAA GAG TTA CAG GCA CTC TAT CCA TCC	3186
L F K V N Q I S T G V P I D G S V K	1080
CTA TTT AAA GTG AAT CAA ATC TCA ACT GGC GTT CCA AAT GAT GGC AGT GTA AAG	3240
I T E W A A K Y F H G S N I Q G K G	1098
ATT ACT GAG TGG GCG GCT AAG TAC TTC AAT GGC TCT AAC ATC CAA GGT AAA GGT	3294
A G Y V L K D M G S N K Y F K V V S	1116
GCT GGA TAC GTA TTG AAA GAT ATG GGT TCT AAT AAG TAC TTT AAG GTC GTT TCG	3348
N T E D G D Y L P K Q L T N D L S E	1134
AAC ACT GAG GAT GGT GRC TAC TTA CCA AAA CAG TTA ACT AAT GAT CPG TCA GAA	3402
T G Y T H D D K G I I Y Y T L S S Y	1152
ACT GGC TTT ACA CAC GAT GAT AAA GGA ATC ATC TAT TAT ACA TTA AGT GGT TAT	3456
E A Q N A F I Q D D D N N Y Y Y F D	1170
CGT GCC CAA AAT GCA TTT ATT CAA GAT GAT GAT AAT AAC TAT TAC TAT TTT GAT	3510
K T G H L V T G L Q K I N N H T Y F	1188
AAA ACA GGT CAT TTA GTA ACA GGT TTG CAA AAG ATT AAT AAC CAT ACC TAC TTC	3564
F L P N G I E L V K S F L Q N E D G	1206
TTC TTA CCT AAT GGT ATC GAA CTG GTC AAG AGC TTC TTA CAA AAC GAA GAT GGT	3618
T I V Y F D K K G H Q V F D Q Y I T	1224
ACA ATT GTT TAT TTC GAT AAG AAA GGT CAT CAA GTT TTT GAT CAA TAT ATA ACT	3672

FIGURA 2 (continuación)

D	Q	N	G	H	A	Y	Y	F	D	D	A	G	V	M	L	K	S	1242
GAT	CAA	AAT	GGA	AAT	GCG	TAT	TAC	TIT	GAT	GAT	GCT	GGT	GTA	ATG	CIT	AAA	TCA	3726
G	L	A	T	I	D	G	H	Q	Q	Y	F	D	Q	N	G	V	Q	1260
GGG	CTT	GCA	ACG	ATT	GAT	GGA	CAT	CAA	CAG	TAT	TIT	GAT	CAA	AAT	GGT	GIG	CAG	3780
V	K	D	K	F	V	I	G	T	D	G	Y	K	Y	Y	F	E	F	1278
GTT	ARG	GAT	AAG	TTT	GIG	ATT	GGC	ACT	GAT	GGT	TAT	AAG	TAT	TAC	TTT	GAA	CCA	3834
G	S	G	N	L	A	I	L	R	Y	V	Q	N	S	K	N	Q	W	1296
GGT	AGT	GGT	AAC	TTA	GCT	ATC	CTA	CCT	TAT	GIG	CAA	AAT	AGT	AAG	AAT	CAA	TGG	3888
F	Y	F	D	G	N	G	H	A	V	T	G	F	Q	T	I	N	G	1314
TTC	TAT	TTT	GAT	GGT	AAT	GGC	CAT	GCT	GTC	ACT	GGT	TTC	CRA	ACA	ATT	ART	GGT	3942
K	K	Q	Y	F	Y	N	D	G	H	Q	S	K	G	E	F	I	D	1332
AAA	AAA	CAA	TAT	TTC	TAT	ATT	GAT	GGT	CAT	CRA	AGT	AAA	GGT	GAA	TTC	ATT	GAT	3996
A	D	G	Y	K	G	E	L	E	G	K	P	I	P	N	P	E	L	1350
GCA	GAC	GGG	TAC	AAG	GGC	GAG	CTT	GAA	GGT	AAG	CCT	ATC	GCT	AAC	CCT	CTC	CTC	4050
G	L	D	S	F	R	T	G	H	H	H	H	H	H					1364
GGT	CTC	GAT	TCT	ACG	CST	ACC	GGT	CAT	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT					4092

FIGURA 2 (fin)

Secuencia DSR-S vardel Core

M G : etiqueta tiorredoxina
 H H : etiqueta 6xHis
 T Q : proteína de interés

M	G	S	D	K	I	I	H	L	T	D	D	S	F	D	T	D	V	18
ATG	GGA	TCT	GAT	AAA	ATT	ATT	CAT	CTG	ACT	GAT	GAT	TCT	TTT	GAT	ACT	GAT	GTA	54
L	K	A	D	G	A	I	L	V	D	F	W	A	H	N	C	G	P	36
CTT	AAG	GCA	GAT	GGT	GCA	ATC	CTG	GTT	GAT	TTC	TGG	GCA	CAC	TGG	TGC	GGT	CCG	108
C	K	M	I	A	P	I	L	D	E	I	A	D	E	Y	Q	G	K	54
TGC	AAA	ATG	ATC	GCT	CCG	ATT	CTG	GAT	GAA	ATC	GCT	GAC	GAA	TAT	CAG	GGC	AAA	162
L	T	V	A	K	L	N	I	D	H	N	P	G	T	A	P	K	Y	72
CTG	ACC	GTT	GCA	AAA	CTG	AAC	ATC	GAT	CAC	AAC	CCG	GGC	ACT	GCG	CCG	AAA	TAT	216
G	I	R	G	I	P	T	L	L	L	F	K	N	G	E	V	A	A	90
GGC	ATC	CGT	GGT	ATC	CCG	ACT	CTG	CTG	CTG	TTC	AAA	AAC	GGT	GAA	GTG	GCG	GCA	270
T	K	V	G	A	L	S	K	G	Q	L	K	E	P	L	D	A	N	108
ACC	AAA	GTG	GGT	GCA	CTG	TCT	AAA	GGT	CAG	TTG	AAA	GGG	TTC	CTC	GAC	GCT	AAC	324
L	A	G	S	G	S	G	D	D	D	D	K	L	A	L	M	T	Q	126
CTG	GCC	GGC	TCT	GGA	TCC	GGT	GAT	GAC	GAT	GAC	AAG	CTC	GCC	CIT	ATG	ACA	CRA	378
Q	V	S	G	K	Y	V	E	K	D	G	S	W	Y	Y	Y	F	D	144
CAR	GTT	AGC	GGC	AAG	TAC	GTT	GAA	AAA	GAC	GGT	AGT	TGG	TAT	TAT	TAT	TTT	GAT	432
D	G	K	N	A	K	G	L	S	T	I	D	N	H	I	Q	Y	F	162
GAT	GGC	AAA	AAT	GCT	AAA	GGT	TTA	TCA	ACG	ATA	GAC	AAC	AAT	ATT	CRA	TAT	TTT	486
T	E	S	G	X	Q	A	K	G	Q	Y	V	T	I	D	N	Q	F	180
TAC	GAG	AGT	GGT	AAA	CRA	GCC	AAA	GGA	CAG	TAT	GTC	ACA	ATT	GAT	AAT	CRA	ACA	540
T	Y	F	D	K	G	S	G	D	E	L	T	G	L	Q	S	I	D	198
TAT	TAT	TTT	GAT	AAG	GGC	TCA	GGT	GAT	GAG	TTA	ACT	GGT	CTG	CRA	AGC	ATT	GAT	594
G	N	I	V	A	F	N	D	E	G	Q	Q	I	F	N	Q	Y	Y	216
GGG	AAC	ATA	GTG	GCT	TTT	AAC	GAT	GAA	GGG	CAA	CRA	ATT	TTT	AAT	CRA	TAT	TAC	648
Q	S	E	N	G	T	T	Y	Y	F	D	D	K	G	H	A	A	T	234
CAR	TCT	GAA	AAT	GGT	ACA	ACA	TAC	TAC	TTT	GAT	GAT	AAA	SGA	CAC	GCT	GCT	ACC	702
G	I	K	N	I	E	G	X	N	Y	Y	F	D	N	L	G	Q	L	252
GGT	ATT	ARG	AAT	ATC	GAG	GGC	AAA	AAT	TAT	TAT	TTT	GAT	AAT	CIT	GGG	CAA	CTA	756
X	K	G	F	S	G	V	I	D	G	Q	I	M	T	F	D	Q	E	270
AAA	AAA	GGC	TTC	TCT	GGT	GTG	ATT	GAT	GGT	CAA	ATA	ATG	ACA	TTT	GAT	CAG	GAA	810
T	G	Q	E	V	S	N	T	T	E	E	I	X	E	G	L	T	T	288
ACA	GGG	CRA	GAA	GTT	TCT	AAC	ACA	ACT	TCT	GAA	ATA	AAA	GAA	GGT	TTG	ACG	ACT	864
Q	N	T	D	Y	S	E	H	N	A	A	H	G	T	D	A	E	D	306
CRA	AAC	ACG	GAT	TAT	AGC	GAA	CAT	AAT	GCA	GCC	CAC	GGT	ACG	GAT	GCT	GAG	GAC	918
F	H	N	I	D	G	Y	L	T	A	S	S	W	Y	R	P	T	G	324
TTT	GAA	AAT	ATT	GAC	GGC	TAT	TTA	ACA	GCT	AGT	TCA	TGG	TAT	CGT	CCA	ACA	GGT	972
I	L	R	N	G	T	D	W	E	P	S	T	D	T	D	F	R	P	342
ATT	TTA	CGT	AAC	GGA	ACA	GAC	TGG	GAA	CCT	TCT	ACA	GAT	ACA	GAT	TTC	AGA	CCA	1026
I	L	S	V	W	W	P	D	K	N	E	Q	V	N	Y	L	N	Y	360
ATA	TTG	TCA	GTG	TGG	TGG	CCA	GAT	AAG	AAC	ACC	CAG	GTC	AAT	TAT	TCA	AAT	TAC	1080
M	A	D	L	G	F	I	S	N	A	D	S	F	E	T	G	D	S	378
ATG	GCT	GAT	TTA	GGG	TTT	ATC	AGT	AAT	GCG	GAC	AGT	TTT	GAA	ACT	GGG	GAT	AGC	1134

FIGURA 3

ES 2 800 724 T3

Q S L L N E A S N Y V Q K S I E M K	396
CAA AGC TTA TTA AAT GAA GCA AGT AAC TAT GTT CAA AAA TCA ATT GAA ATG AAA	1188
I S A Q Q S T E W L K D A M A A F I	414
ATT AGT GCG CAA CAA AGT ACA GAG TGG TTA AAG GAT GCA ATG GCG GCC TTC ATT	1242
V A Q P Q W N E T S E D M S N D H L	432
GTC GCG CAA CCA CAG TGG AAT GAA ACT AGT GAA GAT ATG AGC AAT GAC CAT TTA	1296
Q N G A L T Y V N S P L T P D A N S	450
CAA AAT GGC GCA TTA ACT TAT GTC AAC AGT CCA CTG ACA CCT GAC GCT AAT TCA	1350
N F R L L N R T P T M Q T G E Q A Y	468
AAC TTT AGA CTA CTT AAT CCG ACC CCA ACA AAC CAG ACT GGT GAR CAA GCG TAT	1404
N L D N S K G G F E L L L A N D V D	486
AAT TTA GAT AAT TCA AAA GGT GGT TTT GAR TTG TTG TTA GCC AAT GAC GTT GAT	1458
N S H P V V Q A E Q L N W L Y Y L M	504
AAT TCA AAC CCT GTA GTA CAA GCA GAA CAA TTG AAT TGG TTA TAT TAT TTA ATG	1512
N F G T I T A N D A D A N F D G I R	522
AAT TTT GGT ACG AAT ACG GCC AAC GAC GCG GAT GCT AAT TTT GAT GGT AAT CGT	1566
V D A V D N V D A D L L Q I A A D E	540
GTA GAT GCA GTC GAC AAT GTG GAT GCT GAT TTG TTA CAA ATT GCT GCC GAT TAT	1620
F I L A Y G V D Q N D A T A N Q E L	558
TTC AAA CTA GCT TAC GGT GTT GAT CAA AAT GAT GCT ACT GCT AAT CAG CAT CTT	1674
S I L E D W S H N D P L Y V T D Q G	576
TCA AAT TTG GAA GAT TGG AGT CAC AAT GAT CCT TTG TAT GTA ACA GAT CAA GGA	1728
S N Q L T M D D Y V H T Q L I W S L	594
AGC AAT CAA TTA ACC ATG GAT GAT TAT GTG CAC ACA CAA TTA ATC TGG TCT CTA	1782
T K S S D I E G T N Q R F V D Y Y M	612
ACA AAA TCA TCT GAC ATA CGA GGT ACA ATG CAG CGC TTC GTG GAT TAT TAT ATG	1836
Y D R S N D S T E N E A I P N Y S F	630
GTC GAT CGA TCT AAT GAT AGT ACA GAA AAC GAA GCC ATT CCT AAT TAC AGC TTT	1890
V R A H D E H V Q T V I A Q I V S D	648
GTA CGT GCA CAC GAC AGC GAA GTG CAA ACG GTT ATT GCC CAA ATT GTT TCC GAT	1944
L Y P D V E H S L A P T T E Q L A A	666
TTG TAT CCT GAT GTT GAA AAT AGT TTA GCA CCA ACA ACA GAA CAA TTG GCA GCT	1998
A F K V Y N E D E K L A D K K Y T Q	684
GCT TTC AAA GTA TAC AAT GAA GAT GAA AAA TTA GCA GAC AAA AAG TAC ACA CAA	2052
Y N H A S A Y A M L L T N K D T V P	702
TAT AAT ATG GCT AGT GCT TAT GCG ATG TTG CTA ACC AAT AAG GAT ACT GPT CCT	2106
R V Y Y G D L Y T D D G Q Y H A T K	720
CGT GTC TAT TAT GGC GAT TTA TAT ACA GAT GAT GGT CAA TAT ATG GCA ACA AAG	2160
S P Y Y D A I N T L L K A R V Q Y V	738
TCA CCA TAC TAT GAT GCG ATT AAC ACT TTG CTA AAG GCT AGA GTT CAG TAT GTT	2214
A G G Q S M S V D S N D V L T S V R	756
GCT GGT GGC CAA TCG ATG TCC GTT GAT AGT AAT GAC GTG TTA ACA AGT GTT CGC	2268
Y G E D A M T A S D T G T S H T R T	774
TAT GGT AAA GAT GCC ATG ACA GCT TCT GAC ACT GGA ACA TCT GAG ACG CGT ACT	2322
E G I G V I V S N N A H L Q L E D G	792
GAA GGT AAT GGA GTC ATC GTC AGC AAT AAC GCS GAG CTA CAA TTA GAG GAT GGG	2376
H T V T L H M G A A H K N Q A Y R A	810
CAT ACT GTC ACA TTG CAT ATG GGG GCA GCT CAT AAG AAC CAA GCT TAT CGT GCT	2430

FIGURA 3 (continuación)

ES 2 800 724 T3

L L S T T A D G L A Y Y D T D E N A	828
TTG TTA TCA ACA ACT GCA GAT GGA TTA GCT TAT TAT GAT ACT GAT GAA AAT GCA	2484
P V A Y T D A N G D L I F T H E S I	846
CCT GTG GCG TAC ACA GAT GCT AAC GGC GAT TTG ATT TTT ACG AAT GAA TCA ATT	2538
Y G V Q W P Q V S G Y L A V W V P V	864
TAT GGT GTA CAA AAT CCA CAA GTT TCT GGT TAC TTG GCA GTT TGG GIT CCG GTA	2592
G A Q Q D Q D A R T A S D T F T N T	882
GGT GCG CAA CAA GAT CAA GAT GCA CCA ACG GCC TCT GAT ACA ACA ACA AAC ACG	2646
S D K V F H S W A A L D S Q V I Y E	900
AGT GAT AAA GTG TTC CAT TCA AAC GCT GCT CTT GAT TCT CAA GTC ATC TAC GAA	2700
G F S N F Q A F A T D S S E Y T W V	918
GGT TTC TCA AAC TTC CAA GCA TTT GCT ACA GAC AGC AGT GAA TAT ACA AAC GTA	2754
V I A Q N A D Q F K Q W G V T S Y Q	936
GTC ATC GCT CAG AAT GCG GAC CAA TTT ARG CAA TGG GGT GTG ACA AGC TTC CAA	2808
L A P Q T R S S T D T S F L D S I I	954
TTG GCA CCA CAA TAT CGT TCA AGT ACA GAT ACA AGT TTC TTG GAT TCA ATT ATT	2862
Q N G T A F T D R Y D L G Y G T P T	972
CAA AAC GGG TAT GCA TTC ACG GAT CGT TAT GAC TTA GGT TAT GGC ACA CCG ACA	2916
K Y G T A D Q L R D A I K A L H A S	990
AAR TAT GGA ACT GCT GAT CAG TTG CCG GAT GCT ATT AAA GCC TTA CAT GCT AGC	2970
G I Q A I A D W V P D Q I Y N L P E	1008
GGT ATT CAA GCC ATT GCC GAT TGG GTG CCG GAC CAA ATT TAT AAT TTG CCA GAG	3024
Q E L A F V T R T N S F G D D D T D	1026
CAA GAA TTA GCT ACT GTC ACA AGA ACA AAT TCA TTT GGA GAT GAC GAT ACA GAT	3078
S D I D N A L Y V V Q S R G G G Q Y	1044
TCT GAT ATT GAC AAT GCC TTA TAT GTT GTA CAA AGT CGT GGG GGT GGT CAA TAT	3132
Q E N Y G G A F L E E L Q A L Y P S	1062
CNA GAG ATG TAT GGT GGT GCC TTC TTA GAA GAG TTA CAG GCA CTC TAT CCA TCC	3186
L F K V N Q I S T G V P I D G S V K	1080
CTA TTT AAA GTG AAT CAA ATC TCA ACT GGC GTT CCA ATT GAT GGC AGT GTA AAG	3240
I T E W A A K Y F W G S N I Q G K G	1098
ATT ACT GAG TGG GCG GCT AAG TAC TTC AAT GGC TCT AAC ATC CAA GGT AAA GGT	3294
A G Y V L K D H G S N K Y F K V V S	1116
GCT GGA TAC STA TTG AAA GAT ATG GGT TCT AAT AAG TAC TTT AAG GTC GTT TCG	3348
N T E D G D Y L P K Q L T N D L S E	1134
AAC ACT CAG GAT GGT CAC TAC TTA CCA AAA CAG TTA ACT AAT GAT CTC TCA GAA	3402
T G Y K G E L E G K P I P N P L L G	1152
ACT GGC TAC AAG GGC GAG CTT GAA GGT AAG CCF ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT	3456
L D S T R T G H H H H H H	1165
CTC GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CRT CAC CRT CAC CRT	3495

FIGURA 3 (fin)

secuencia DSR-S Core ΔA

M G : etiqueta tiorredoxina
H H : etiqueta 6xHis
T Q : proteína de interés

M	G	S	D	K	I	I	E	L	T	D	D	S	F	D	T	D	V	18
ATG	GGA	TCT	GAT	AAA	ATT	ATT	CAT	CTG	ACT	GAT	GAT	TCT	TTT	GAT	ACT	GAT	GTA	54
L	K	A	D	G	A	I	L	V	D	F	W	A	H	N	C	G	P	36
CTT	AAG	GCA	GAT	SGT	GCA	ATC	CTG	GTT	GAT	TTC	TGG	GCA	CAC	FGG	TGC	GGT	CCG	108
C	K	M	I	A	P	I	L	D	R	I	A	D	E	Y	Q	G	K	54
TGC	AAA	ATG	ATC	SCT	CCG	ATT	CTG	GAT	GAA	ATC	GCT	GAC	GAA	TAT	CAG	GGC	AAA	162
L	T	V	A	K	L	N	I	D	H	H	P	G	T	A	F	K	Y	72
CTG	ACC	GTT	GCA	AAA	CTG	ATC	ATC	GAT	CAC	AAC	CCG	GGC	ACT	GCG	CCG	AAA	TAT	216
G	I	R	G	I	P	T	L	L	L	P	K	N	G	E	V	A	A	90
GGC	ATC	CGT	GGT	ATC	CCG	ACT	CTG	CTG	TTC	AAA	AAC	GGT	GAA	GTG	GCG	GCA	270	
T	K	V	G	A	L	S	K	G	Q	L	K	E	F	L	D	A	H	108
ACC	AAA	GTG	GGT	GCA	CTG	TCT	AAA	GGT	CAG	TTG	AAA	GAG	TTC	CTC	GAC	GCT	AAC	324
L	A	G	S	G	S	G	D	D	D	D	K	L	A	L	M	G	F	126
CTG	GCC	GGC	TCT	GGG	TCC	GGT	GAT	GAC	GAT	GAC	AAG	CTC	GCC	CTT	ATG	GGC	TTC	378
S	G	V	I	D	G	Q	I	M	T	F	D	Q	E	T	G	Q	E	144
TCI	GGT	GTG	ATT	GAT	GGT	CAA	ATA	ATG	ACA	TTT	GAT	CAG	GAA	ACA	GGG	CAA	GAA	432
V	S	N	T	T	S	E	I	K	E	G	L	T	T	Q	N	T	D	162
GTT	TCT	AAC	ACA	ACT	TCT	GAA	ATA	AAA	GAA	GGT	TTG	ACG	ACT	CAA	AAC	ACG	GAT	486
Y	S	E	H	N	A	A	H	G	T	D	A	E	D	F	E	N	I	180
TAT	AGC	GAA	CAT	AAT	GCA	GCC	CAC	GGT	ACG	GAT	GCT	GAG	GAC	TTT	GAA	AAT	ATT	540
D	G	Y	L	T	A	S	S	W	Y	R	P	T	G	I	L	R	N	198
GAC	GGC	TAT	TTA	ACA	GCT	AGT	TCA	TGG	TAT	CGT	CCA	ACA	GGT	ATT	TTA	CGT	AAC	594
G	T	D	W	E	P	S	T	D	T	D	F	R	P	I	L	S	V	216
GCA	ACA	GAC	TGG	GAA	CCT	TCT	ACA	GAT	ACA	GAT	TTC	AGA	CCA	ATA	TTG	TCA	GTG	648
W	W	P	D	K	N	T	Q	V	N	Y	L	N	Y	M	A	D	L	234
TGG	TGG	CCA	GAT	AAG	AAC	ACC	CAG	GTC	AAT	TAT	TTA	AAT	TAC	ATG	GCT	GAT	TTA	702
G	F	I	S	N	A	D	S	F	E	T	G	D	S	Q	S	L	L	252
GGG	TTT	ATC	AGT	AAT	GCG	GAC	AGT	TTT	GAA	ACT	GGG	GAT	AGC	CAA	ACC	TTA	TTA	756
H	E	A	S	N	Y	V	Q	K	S	I	E	M	K	I	S	A	Q	270
AAT	GAA	GCA	AGT	AAC	TAT	GTT	CAA	AAA	TCA	ATT	GAA	ATG	AAA	ATT	AGT	GCG	CAA	810
Q	S	T	E	W	L	E	D	A	N	A	A	F	I	V	A	Q	P	288
CAA	AGT	ACA	GAG	TGG	TTA	AAG	GAT	GCA	ATG	GCG	GCC	TTC	ATT	GTC	GCG	CAA	CCA	864
Q	N	N	E	T	S	E	D	N	S	N	D	H	L	Q	N	G	A	306
CAG	TGG	AAT	GAA	ACT	AGT	GAA	GAT	ATG	AGC	AAT	GAC	CAT	TTA	CAA	AAT	GGC	GCA	918
L	T	Y	V	N	S	P	L	T	P	D	A	N	S	N	F	R	L	324
TTA	ACT	TAT	GTC	AAC	AGT	CCA	CTG	ACA	CCT	GAC	GCT	AAT	TCA	AAC	TTT	AGA	CTA	972
L	N	R	T	P	T	N	Q	T	G	E	Q	A	Y	N	L	D	N	342
CTT	AAT	CGG	ACA	CCA	ACA	AAC	CAG	ACT	GGT	GAA	CAA	GCG	TAT	AAT	TTA	GAT	AAT	1026
S	K	G	G	F	E	L	L	L	A	N	D	V	D	N	S	N	P	360
TCA	AAA	GGT	GGT	TTT	GAA	TTG	TTG	TTA	GCC	AAT	GAC	GTT	GAT	AAT	TCA	AAC	CCT	1080

FIGURA 4

V	Y	Q	A	K	Q	L	M	N	L	Y	Y	L	M	N	F	G	T	378
GTA	GTA	CAA	GCA	GAA	CAA	TTG	AAT	TGG	TTR	TAT	TAT	TTA	ATG	AAT	TTT	GGT	ACG	1134
I	T	A	N	D	A	D	A	N	F	D	G	I	R	V	D	A	V	396
ATT	ACG	GCC	AAC	GAC	GCG	GAT	GCT	AAT	TTT	GAT	GGT	ATT	CGT	GTA	GAT	GCA	GTC	1188
D	N	V	D	A	D	L	L	Q	I	A	A	D	Y	F	K	L	A	414
GAC	AAT	GTG	GAT	GCT	GAT	TTG	TTA	CAA	ATT	GCT	GCC	GAT	TAT	TTC	AAA	CTA	GCT	1242
Y	G	V	D	Q	N	D	A	T	A	N	Q	H	L	S	I	L	K	432
TAC	GGT	GTT	GAT	CAA	AAT	GAT	GCT	ACT	GCT	AAT	CAG	CAT	CTT	TCA	ATT	TTG	GAA	1296
D	W	B	H	N	D	P	L	Y	V	T	D	Q	G	S	N	Q	L	450
GAT	TGG	AGT	CAC	AAT	GAT	CCT	TTG	TAT	GTA	ACA	GAT	CAA	GGA	AGC	AAT	CAA	TTA	1350
T	M	D	D	Y	V	H	T	Q	L	I	W	S	L	T	K	S	B	468
ACC	ATG	GAT	GAT	TAT	GTG	CAC	ACA	CAA	TTA	ATC	TGG	TCT	CTA	ACA	AAA	TCA	TCT	1404
D	I	R	G	T	N	Q	R	F	V	D	Y	Y	H	V	D	R	S	486
GAC	ATA	CGA	GGT	ACA	ATG	CAG	CGC	TTC	GTG	GAT	TAT	TAT	ATG	GTG	GAT	CGA	TCT	1458
N	D	S	T	E	N	E	A	I	P	N	Y	S	F	V	R	A	H	504
AAT	GAT	AGT	ACA	GAA	AAC	GAA	GCC	ATT	CCT	ART	TAC	AGC	TTT	GTA	CGT	GCA	CAC	1512
D	S	E	V	Q	T	V	I	A	Q	I	V	S	D	L	Y	P	D	522
GAC	AGC	GAA	GTG	CAA	ACG	GTT	ATT	GCC	CAA	ATT	GTT	TCC	GAT	TTG	TAT	CCT	GAT	1566
V	E	N	S	L	A	P	T	T	E	Q	L	A	A	A	F	K	V	540
GTT	GAA	AAT	AGT	TTA	GCA	CCA	ACA	ACA	GAA	CAA	TTG	GCA	GCT	GCT	TTC	AAA	GTA	1620
Y	N	K	D	E	K	L	A	D	K	K	I	T	Q	Y	N	M	A	558
TAC	AAT	GAA	GAT	GAA	AAA	TTA	GCA	GAC	AAA	ARG	TAC	ACA	CAA	TAT	AAT	ATG	GCT	1674
S	A	Y	A	M	L	L	T	W	K	D	T	V	P	R	V	Y	Y	576
AGT	GCT	TAT	GCG	ATG	TTG	CTA	ACC	AAT	ARG	GAT	ACT	GTT	CCT	CGT	GTC	TAT	TAT	1728
G	D	L	Y	T	D	D	G	Q	Y	H	A	T	K	S	P	Y	Y	594
GGC	GAT	TTA	TAT	ACA	GAT	GAT	GGT	CAA	TAT	ATG	GCA	ACA	AAG	TCA	CCA	TAC	TAT	1782
D	A	I	N	T	L	L	K	A	R	V	Q	Y	V	A	G	G	Q	612
GAT	GCG	ATT	AAC	ACT	TTG	CTA	AAG	GCT	AGA	GTT	CAG	TAT	GTT	GCT	GGT	GGC	CAA	1836
S	N	S	V	D	S	N	D	V	L	T	S	V	R	Y	G	K	D	630
TOG	ATG	TCC	GTT	GAT	AGT	AAT	GAC	GTG	TTA	ACA	AGT	GTT	CGC	TAT	GGT	AAA	GAT	1890
R	M	T	A	S	D	T	G	T	S	E	T	R	T	E	G	I	G	648
GCC	ATG	ACA	GCT	TCT	GAC	ACT	GGA	ACA	TCT	GAG	ACG	CGT	ACT	GAA	GGT	ATT	GGA	1944
V	I	V	S	N	N	A	E	L	Q	L	E	D	G	H	T	V	T	666
GTC	ATC	GTC	AGC	AAT	AAC	GCG	GAG	CTA	CAA	TTA	GAG	GAT	GGG	CAT	ACT	GTC	ACA	1998
L	H	M	G	A	A	H	K	N	Q	A	Y	R	A	L	L	S	T	684
TTG	CAT	ATG	GGG	GCA	GCT	CAT	AAG	AAC	CAA	GCT	TAT	CGT	GCT	TTG	TTA	TCA	ACA	2052
T	A	D	G	L	A	Y	Y	D	T	D	E	N	A	P	V	A	Y	702
ACT	GCA	GAT	GGA	TTA	GCT	TAT	TAT	GAT	ACT	GAT	GAA	AAT	GCA	CCT	GTG	GCG	TAC	2106
T	D	A	N	G	D	L	I	F	T	N	E	S	I	Y	G	V	Q	720
ACA	GAT	GCT	AAC	GGC	GAC	TTG	ATT	TTT	ACG	AAT	GAA	TCA	ATT	TAT	GGT	GTA	CAA	2160
N	P	Q	V	S	G	Y	L	A	V	N	V	P	V	G	A	Q	Q	738
AAT	CCA	CAA	GTT	TCT	GGT	TAC	TTG	GCA	GTT	TGG	GTT	CCG	GTA	GGT	GCG	CAA	CAA	2214
D	Q	D	A	R	T	A	S	D	T	T	T	N	T	S	D	K	V	756
GAT	CAA	GAT	GCA	CGA	ACG	GCC	TCT	GAT	ACA	ACA	ACA	AAC	ACG	AGT	GAT	AAA	GTG	2268
F	H	S	N	A	A	L	D	S	Q	V	I	Y	E	G	F	S	N	774
TTT	CAI	TCA	AAC	GCT	GCT	CTT	GAT	TCT	CAA	GTC	ATC	TAC	GAA	GGT	TTC	TCA	AAC	2322
F	Q	A	F	A	T	D	S	S	E	Y	T	N	V	V	I	A	Q	792
TTT	CAA	SCA	TTT	GCT	ACA	GAC	AGC	AGT	GAA	TAT	ACA	AAC	GTA	GTC	ATC	GCT	CAG	2376

FIGURA 4 (continuación)

ES 2 800 724 T3

N	A	D	Q	F	K	Q	N	G	V	T	S	F	Q	L	A	P	Q	810
AAT	GCG	GAC	CAA	TTT	AAG	CAA	TGG	GGT	GTG	ACA	AGC	TTC	CAA	TTG	GCA	CCA	CRA	2430
Y	R	S	S	T	D	T	S	F	L	D	S	I	I	Q	N	G	Y	828
TAT	CGT	TCA	AGT	ACA	GAT	ACA	AGT	TTC	TTG	GAT	TCA	ATT	ATT	CAA	AAC	GGG	TAT	2484
R	F	T	D	R	Y	D	L	G	Y	G	T	P	T	K	Y	Q	T	846
GCA	TTC	ACG	GAT	CGT	TAT	GAC	TTA	GGT	TAT	GGC	ACA	CCG	ACA	AAA	TAT	GGA	ACT	2538
A	D	Q	L	R	D	A	I	K	A	L	H	A	S	G	I	Q	A	864
GCT	GAT	CAG	TTG	CGC	GAT	GCT	ATT	AAA	GCC	TTA	CAT	GCT	AGC	GGT	ATT	CRA	GCC	2592
I	A	D	N	V	P	D	Q	I	Y	H	L	P	E	Q	E	L	A	882
ATT	GCC	GAT	TGG	GTG	CCG	GAC	CRA	ATT	TAT	AAT	TTG	CCA	GAG	CAA	GAA	TTA	GCT	2646
T	V	T	R	T	N	S	F	G	D	D	D	T	D	S	D	I	D	900
ACT	GTC	ACA	AGA	ACA	AAT	TCA	TTT	GGA	GAT	GAC	GAT	ACA	GAT	TCT	GAT	ATT	GAC	2700
N	A	L	Y	V	V	Q	S	R	G	G	G	Q	Y	Q	E	N	Y	918
AAT	GCC	TTA	TAT	GTT	GTA	CAA	AGT	CGT	GGG	GGT	GGT	CAA	TAT	CAA	GAG	ATG	TAT	2754
G	G	A	F	L	E	H	L	Q	A	L	Y	P	S	L	F	K	Y	936
GGT	GGT	GCC	TTC	TTA	GAA	GAG	TTA	CAG	GCA	CTC	TAT	CCA	TCC	CTA	TIT	ABA	GTG	2808
N	Q	I	S	T	G	V	P	I	D	G	S	V	K	I	T	H	N	954
AAT	CAA	ATC	TCA	ACT	GGC	GTT	CCA	ATT	GAT	GGC	AGT	GTA	AAG	ATT	ACT	GAG	TGG	2862
A	A	K	Y	F	H	G	S	N	I	Q	G	K	G	A	G	I	V	972
GCG	GCT	AAG	TAC	ITC	AAT	GGC	TCT	ABC	ATC	CAA	GGT	AAA	GGT	GCT	GGA	TAC	GTA	2916
L	K	D	H	G	S	N	X	Y	F	X	V	V	S	N	T	E	D	990
TTG	AAA	GAT	ATG	GGT	TCT	AAT	AAG	TAC	TTT	AAG	GTC	GTT	TCG	AAC	ACT	GAG	GAT	2970
G	D	Y	L	P	K	Q	L	T	N	D	L	S	E	T	G	Y	K	1008
GGT	GAC	TAC	TTA	CCA	AAA	CAG	TTA	ACT	AAT	GAT	CTG	TCA	GAA	ACT	GSC	TAC	AAG	3024
G	E	L	S	G	K	P	I	P	N	P	L	L	G	L	D	S	T	1026
GGC	GAG	CTT	GAA	GGT	AAG	CCT	ATC	CCT	ACC	CCT	CTC	CTC	GGT	CTC	GAT	TCT	ACG	3078
R	T	G	H	H	H	H	H	H										1035
CGT	ACC	GGT	CAT	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT										3105

FIGURA 4 (fin)

ES 2 800 724 T3

secuencia mutante DSR-S vardel ΔA SEV663YDA

M G : etiqueta tiorredoxina
H H H : etiqueta 6xHis
T Q : proteína de interés
D D : aminoácido catalítico
E E : aminoácidos modificados
YDA : aminoácidos modificados
TC TC : bases modificadas

<u>M</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	18
ATG	GGA	TCT	GAT	AAA	ATT	ATT	CAT	CTG	ACT	GAT	GAT	TCT	TTT	GAT	ACT	GAT	GTA	54
<u>L</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>W</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>W</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	36
CTT	AAG	GCA	GAT	GGT	GCA	ATC	CTG	GTT	GAT	TTC	TGG	GCA	CAC	TGG	TGC	GGT	CCG	108
<u>C</u>	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	54
TGC	AAA	ATG	ATC	GCT	COG	ATT	CTG	GAT	GAA	ATC	GCT	GAC	GAA	TAT	CAG	GGC	AAA	162
<u>L</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	72
CTG	ACC	GTT	GCA	AAA	CTG	ATC	ATC	GAT	CAC	AAC	CCG	GGC	ACT	GCG	CCG	AAA	TAT	216
<u>G</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	90
GGC	ATC	CGT	GGT	ATC	CCG	ACT	CTG	CTG	CTG	TTC	AAA	AAC	GGT	GAA	GTG	GCG	GCA	270
<u>T</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	108
ACC	AAA	GTG	GGT	GCA	CTG	TCT	AAA	GGT	CAG	TTG	AAA	GAG	TTC	CTC	GAC	GCT	ATC	324
<u>L</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>M</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	126
CTG	GCC	GGC	TCT	GGA	TCC	GGT	GAT	GAC	GAT	GAC	ATG	CTC	GCC	CCT	ATG	ACA	CAA	378
<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	144
CAA	GTT	AGC	GGC	ATG	TAC	GTT	GAA	AAA	GAC	GGT	AGT	TGG	TAT	TAT	TAT	TTT	GAT	432
<u>D</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>Q</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	162
GAT	GGC	AAA	AAT	GCT	AAA	GGT	TTA	TCA	ACG	ATA	GAC	AAC	AAT	ATT	CAA	TAT	TTT	486
<u>Y</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	180
TAC	GAG	AGT	GGT	AAA	CAA	GCC	AAA	GGA	CAG	TAT	GTC	ACA	ATT	GAT	AAT	CAA	ACA	540
<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	198
TAT	TAT	TTT	GAT	AAG	GGC	TCA	GGT	GAT	GAG	TTA	ACT	GGT	CTG	CAA	AGC	ATT	GAT	594
<u>G</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	216
GGG	AAC	ATA	GTT	GCT	TTT	ATC	GAT	GAA	GGG	CAA	CAA	ATT	TTT	AAT	CAA	TAT	TAC	648
<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>H</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	234
CAA	TCT	GAA	AAT	GGT	ACA	ACA	TAC	TAC	TTT	GAT	GAT	AAA	GGA	CAC	GCT	GCT	ACC	702
<u>G</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>X</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	252
GGI	ATT	AAG	AAT	ATC	GAG	GGC	AAA	AAT	TAT	TAT	TTT	GAT	AAT	CCT	GGG	CAA	CTA	756
<u>K</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>M</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	270
AAA	AAA	GGC	TTC	TCT	GGT	GTG	ATT	GAT	GGT	CAA	ATA	ATG	ACA	TTT	GAT	CAG	GAA	810
<u>T</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>X</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	288
ACA	GGG	CAA	GAA	GTT	TCT	ATC	ACA	ACT	TCT	GAA	ATA	AAA	GAA	GGT	TTG	ACG	ACT	864
<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>Z</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	306
CAA	AAC	ACG	GAT	TAT	AGC	GAA	CAT	AAT	GCA	GCC	CAC	GGT	ACG	GAT	GCT	GAG	GAC	918
<u>F</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	324
TTT	GAA	AAT	ATT	GAC	GGC	TAT	TTA	ACA	GCT	AGT	TCA	TGG	TAT	CGT	CCA	ACA	GGT	972
<u>I</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	342
ATT	TTA	CGT	AAC	GGA	ACA	GAC	TGG	GAA	CCT	TCT	ACA	GAT	ACA	GAT	TTC	ACA	CCA	1026

FIGURA 5

ES 2 800 724 T3

I	L	S	V	K	N	P	D	K	N	T	Q	V	N	Y	L	N	Y	360
ATA	TTG	TCA	GTG	TGG	TGG	CCA	GAT	AAG	AAC	ACC	CAG	GTC	AAT	TAT	TTA	AAT	TAC	1080
M	A	D	L	G	F	I	S	N	A	D	S	P	E	T	G	D	S	378
ATG	GCT	GAT	TTA	GGG	TTT	ATC	AGT	AAT	GCG	GAC	AGT	TTT	GAA	ACT	GGG	GAT	AGC	1134
Q	S	L	L	N	E	A	S	N	Y	V	Q	K	S	I	E	N	K	396
CAA	AGC	TTA	TTA	AAT	GAA	GCA	AGT	AAC	TAT	GTT	CAA	AAA	TCA	ATT	GAA	ATG	AAA	1188
I	S	A	Q	Q	S	T	E	N	L	E	D	A	N	A	A	F	I	414
ATT	AGT	GCG	CAA	CAA	AGT	ACA	GAG	TGG	TTA	AAG	GAT	GCA	ATG	GCG	GCC	TTC	ATT	1242
V	A	Q	P	Q	N	N	E	T	S	E	D	N	S	N	D	H	L	432
GTC	GCG	CAA	CCA	CAG	TGG	AAT	GAA	ACT	AGT	GAA	GAT	ATG	AGC	AAT	GAC	CAT	TTA	1296
Q	N	G	A	L	E	Y	V	N	S	P	L	T	P	D	A	N	S	450
CAA	AAT	GGC	GCA	TTA	ACT	TAT	GTC	AAC	AGT	CCA	CTG	ACA	CCT	GAC	GCT	AAT	TCA	1350
N	F	R	L	L	N	R	T	P	T	N	Q	T	G	E	Q	A	Y	468
AAC	TTT	AGA	CTA	CTT	AAT	CGG	ACA	CCA	ACA	AAC	CAG	ACT	GGT	GAA	CAA	GCG	TAT	1404
N	L	D	N	S	K	G	G	F	E	L	L	L	A	N	D	V	D	486
AAT	TTA	GAT	AAT	TCA	AAA	GGT	GGT	TTT	GAA	TTG	TTG	TTA	GCC	AAT	GAC	GTT	GAT	1458
N	S	N	P	V	V	Q	A	E	Q	L	N	W	L	Y	Y	L	M	504
AAT	TCA	AAC	OCT	GTA	GTA	CAA	GCA	GAA	CAA	TTG	AAT	TGG	TTA	TAT	TAT	TTA	ATG	1512
N	F	G	T	I	T	A	M	D	A	D	A	N	F	D	G	I	R	522
AAT	TTT	GGT	ACG	ATT	ACG	GCC	AAC	GAC	GCG	GAT	GCT	AAT	TTT	GAT	GGT	ATT	CGT	1566
V	D	A	V	D	N	V	D	A	D	L	L	Q	I	A	A	D	Y	540
GTA	GAT	GCA	GTC	GAC	AAT	GIG	GAT	GCT	GAT	TTG	TTA	CAA	ATT	GCT	GCC	GAT	TAT	1620
F	K	L	A	Y	S	V	D	Q	N	D	A	T	A	H	Q	H	L	558
TTC	AAA	CTA	GCT	TAC	GGT	GTT	GAT	CAA	AAT	GAT	GCT	ACT	GCT	AAT	CAG	CAT	CTT	1674
S	I	L	E	D	N	S	H	N	D	P	L	Y	V	T	D	Q	G	576
TCA	ATT	TTG	GAA	GAT	TGG	AGT	CAC	AAT	GAT	CCT	TTG	TAT	GTA	ACA	GAT	CAA	GGA	1728
B	N	Q	L	T	M	D	D	Y	V	H	T	Q	L	I	W	S	L	594
AGC	AAT	CAA	TTA	ACC	ATG	GAT	GAT	TAT	GIG	CAC	ACA	CAA	TTA	ATC	TGG	TCT	CTA	1782
T	K	S	S	D	I	R	G	T	M	Q	R	T	V	D	Y	Y	M	612
ACA	AAA	TCA	TCT	GAC	ATA	CGA	GGT	ACA	ATG	CAG	CGC	TTC	GTG	GAT	TAT	TAT	ATG	1836
V	D	R	S	N	D	S	T	E	N	E	A	I	P	N	Y	S	F	630
GTG	GAT	CGA	TCT	AAT	GAT	AGT	ACA	GAA	AAC	GAA	GCC	ATT	CCT	AAT	TAC	AGC	TTT	1890
V	R	A	H	D	Y	D	A	Q	T	V	I	A	Q	I	V	S	D	648
GTA	CGA	GCT	CAC	GAC	TAC	GAC	GCG	CAA	ACG	GTT	ATT	GCC	CAA	ATT	GTT	TCC	GAT	1944
L	Y	P	D	V	E	N	S	L	A	P	T	T	E	Q	L	A	A	666
TIG	TAT	CCT	GAT	GTT	GAA	AAT	AGT	TTA	GCA	CCA	ACA	ACA	GAA	CAA	TTG	GCA	GCT	1998
A	F	K	V	Y	N	E	D	E	K	L	A	D	K	K	Y	T	Q	684
GCT	TTC	AAA	GTA	TAC	AAT	GAA	GAT	GAA	AAA	TTA	GCA	GAC	AAA	AAG	TAC	ACA	CAA	2052
Y	N	M	A	S	A	Y	A	M	L	L	E	T	N	K	D	T	V	702
TAT	AAT	ATG	GCT	AGT	GCT	TAT	GCG	ATG	TTG	CTA	ACC	AAT	AAG	GAT	ACT	GTT	CCT	2106
R	V	Y	Y	G	D	L	Y	T	D	D	G	Q	Y	N	A	T	K	720
CST	GTC	TAT	TAT	GGC	GAT	TTA	TAT	ACA	GAT	GAT	GGT	CAA	TAT	ATG	GCA	ACA	AAG	2160
S	P	Y	Y	D	A	I	N	T	L	L	K	A	R	V	Q	Y	V	738
TCA	CCA	TAC	TAT	GAT	GCG	ATT	AAC	ACT	TTG	CTA	AAG	GCT	AGA	GTT	CAG	TAT	GTT	2214
A	G	G	Q	S	M	S	V	D	S	N	D	V	L	T	S	V	R	756
GCT	GGT	GGC	CAA	TCG	ATG	TCC	GTT	GAT	AGT	AAT	GAC	GTG	TTA	ACA	AGT	GTT	CGC	2268
Y	G	K	D	A	N	T	A	S	D	T	G	T	S	E	T	R	T	774
TAT	GGT	AAA	GAT	GCC	ATG	ACA	GCT	TCT	GAC	ACT	GGA	ACA	TCT	GAG	ACG	CGT	ACT	2322

FIGURA 5 (continuación)

E G I G V I V S N N A E L Q L R D G	792
GAA GGT ATT GGA GTC ATC GTC AGC AAT AAC GCG GAG CTA CAA TTA GAG GAT GGG	2376
H T V T L H M G A A H K N Q A Y R A	810
CAT ACT GTC ACA TTG CAT ATG GGG GCA GCT CAT AAG AAC CAA GCT TAT CGT GCT	2430
L L S T T A D G L A Y Y D T D E N A	828
TTG TTA TCA ACA ACT GCA GAT GGA TTA GCT TAT TAT GAT ACT GAT GAA AAT GCA	2484
P V A Y T D A N G D L I F T H E S I	846
CGT GTG GCG TAC ACA GAT GCT AAC GGC GAT TTG ATT TTT ACG AAT GAA TCA ATT	2538
Y G V Q N P Q V S G Y L A V W V P V	864
TAT GGT GTA CAA AAT CCA CAA GTT TCT GGT TAC TTG GCA GTT TGG GTT CCG GTA	2592
G A Q Q D Q D A R T A S D T T T N T	882
GGT GCG CAA CAA GAT CAA GAT GCA CGA ACG GCC TCT GAT ACA ACA ACA AAC ACG	2646
S D K V F H S H A A L D S Q V I Y E	900
AGT GAT AAA GTG TTC CAT TCA AAC GCT GCT CTT GAT TCT CAA GTC ATC TAC GAA	2700
G F S N F Q A F A T D S S E Y T N V	918
GGT TTC TCA AAC TTC CAA GCA TTT GCT ACA GAC ACG AGT GAA TAT ACA AAC GTA	2754
V I A Q H A D Q F K Q W G V T S F Q	936
GTC ATC GCT CAG AAT GCG GAC CAA TTT AAG CAA TGG GGT GTG ACA AGC TTC CAA	2808
L A P Q Y R S S T D T S F L D S I I	954
TTG GCA CCA CAA TAT CGT TCA AGT ACA GAT ACA AGT TTC TTG GAT TCA ATT ATT	2862
Q N G Y A F T D R Y D L G Y G T P T	972
CBA AAC GGG TAT GCA TTC ACG GAT CGT TAT GAC TTA GGT TAT GGC ACA CCG ACA	2916
K Y G T A D Q L R D A I E A L H A S	990
AAA TAT GGA ACT GCT GAT CAG TTG CGC GAT GCT ATT AAA GCC TTA CAT GCT AGC	2970
G I Q A I A D W V P D Q I Y N L P E	1008
GGT ATT CAA GCC ATT GCC GAT TGG GTG CCG GAC CAA ATT TAT AAT TTG CCA GAG	3024
Q E L A T V T R T H B F G D D D T D	1026
CBA GAA TTA GCT ACT GTC ACA AGA ACA AAT TCA TTT GGA GAT GAC GAT ACA GAT	3078
S D I D N A L Y V Y Q S R G G G Q Y	1044
TCT GAT ATT GAC AAT GCC TTA TAT GTT GTA CAA AGT CGT GGG GGT GGT CAA TAT	3132
Q H N Y G G A F L E E L Q A L Y P S	1062
CBA GAG ATG TAT GGT GGT GCC TTC TTA GAA GAG TTA CAG GCA CTC TAT CCA TCC	3186
L F K Y N Q I S T G V P I D G S V K	1080
CTA TTT AAA GTG AAT CAA ATC TCA ACT GGC GTT CCA ATT GAT GGC AGT GTA AAG	3240
I T E W A A K Y F N G S N I Q G K G	1098
ATT ACT GAG TGG GCG GCT AAG TAC TTC AAT GGC TCT AAC ATC CAA GGT AAA GGT	3294
A G Y V L K D M G S H X Y F K V V S	1116
GCT GGA TAC GTA TTG AAA GAT ATG GGT TCT AAT AAG TAC TTT AAG GTC GTT TCG	3348
N T E D G D Y L P K Q L T H D L S E	1134
AAC ACT GAG GAT GGT GAC TAC TTA CCA AAA CAG TTA ACT AAT GAT CTG TCA GAA	3402
T G F T H D D K G I I Y Y T L S G Y	1152
ACT GGC TTT ACA CAC GAT GAT AAA GGA ATC ATC TAT TAT ACA TTA AGT GGT TAT	3456
R A Q N A F I Q D D D F N Y Y Y F D	1170
CGT GCC CAA AAT GCA TTT ATT CAA GAT GAT GAT AAT AAC TAT TAC TAT TTT GAT	3510
X T G H L V T G L Q K I N N H T Y F	1188
AAA ACA GGT CAT TTA GTA ACA GGT TTG CAA AAG ATT AAT AAC CAT ACC TAC TTC	3564
F L P N G I E L V K S F L Q N E D G	1206
TTC TTA CCT AAT GGT ATC GAA CTG GTC AAG AGC TTC TTA CAA AAC GAA GAT GGT	3618

FIGURA 5 (continuación)

ES 2 800 724 T3

T	I	V	Y	F	D	K	K	G	H	Q	V	F	D	Q	Y	I	T	1224
ACA	ATT	GTT	TAT	TTC	GAT	AGG	AAA	GGT	CAT	CAA	GTT	TTT	GAT	CAA	TAT	ATA	ACT	3672
D	Q	N	G	M	A	Y	Y	F	D	D	A	G	V	M	L	K	S	1242
GAT	CAA	AAT	GGA	ANT	GCG	TAT	TAC	TTT	GAT	GAT	GCT	GGT	GTA	ATG	CTT	AAA	TCA	3726
G	L	A	T	I	D	G	H	Q	Q	Y	F	D	Q	N	G	V	Q	1260
GGG	CTT	GCA	ACG	ATT	GAT	GGA	CAT	CAA	CAG	TAT	TTT	GAT	CAA	AAT	GGT	GTG	CAG	3780
V	K	D	K	F	V	I	G	T	D	G	Y	K	Y	Y	F	E	P	1278
GTT	ARG	GAT	AAG	TTT	GTG	ATP	GGC	ACT	GAT	GGT	TAT	ARG	TAT	TAC	TTT	GAA	CCA	3834
G	S	G	N	L	A	I	L	R	Y	V	Q	N	S	K	N	Q	N	1296
GGT	AGT	GGT	AAC	TTA	GCT	ATC	CTA	CGT	TAT	GTG	CAA	AAT	AGT	AAG	AAT	CAA	TGG	3888
F	Y	F	D	G	N	G	H	A	V	T	G	F	Q	T	I	N	G	1314
TTC	TTT	TTT	GAT	GGT	AAT	GGC	CAT	GCT	GTG	ACT	GGT	TTC	CAA	ACA	ATT	AAT	GGT	3942
K	K	Q	Y	F	Y	N	D	G	H	Q	S	K	G	E	F	I	D	1332
AAA	AAA	CAA	TAT	TTC	TAT	AAT	GAT	GGT	CAT	CAA	AGT	AAA	GGT	GAA	TTC	ATT	GAT	3996
A	D	G	D	T	F	Y	T	S	A	T	D	G	R	L	V	T	G	1350
GCA	GAC	GGG	GAT	ACT	TTC	TAT	ACG	AGT	GCC	ACT	GAT	GGT	CGC	CTA	GTA	ACT	GGT	4050
V	Q	K	I	N	G	I	T	Y	A	F	D	M	T	G	N	L	I	1368
GTT	CRG	AAG	ATT	ANT	GGT	ATT	ACC	TAT	GCT	TTT	GAT	AAC	ACA	GGA	AAT	TTG	ATC	4104
T	N	Q	Y	Y	Q	L	A	D	G	K	Y	M	L	L	D	D	S	1386
ACA	AAT	CAG	TAT	TAT	CAA	TAA	GCA	GAT	GGT	AAA	TAT	ATG	TTG	TAA	GAT	GAT	AGT	4158
G	R	A	K	T	G	F	V	L	Q	D	G	Y	L	R	Y	F	D	1404
GGT	CGT	GCG	AAA	ACA	GGG	TTT	GTA	TTG	CAA	GAT	GGT	GTA	CTA	AGA	TAC	TTC	GAT	4212
Q	N	G	E	Q	Y	K	D	A	I	I	V	D	P	D	T	N	L	1422
CAA	AAC	GGT	GAG	CAA	GTG	AAA	GAT	GCT	ATC	ATT	GTG	GAT	CCA	GAT	ACT	AAC	TTG	4266
S	Y	K	G	E	L	E	G	K	P	I	P	N	P	L	L	G	L	1440
AGT	TAC	AAG	GGC	GAG	CTT	GAA	GGT	AAG	CCT	ATC	CCT	AAC	CCT	CTC	CTC	GGT	CTC	4320
D	S	T	R	T	G	H	H	H	H	H	H							1452
GAT	TCT	ACG	CGT	ACC	GGT	CAT	CAT	CRG	CAT	CAC	CAT							4356

FIGURA 5 (fin)

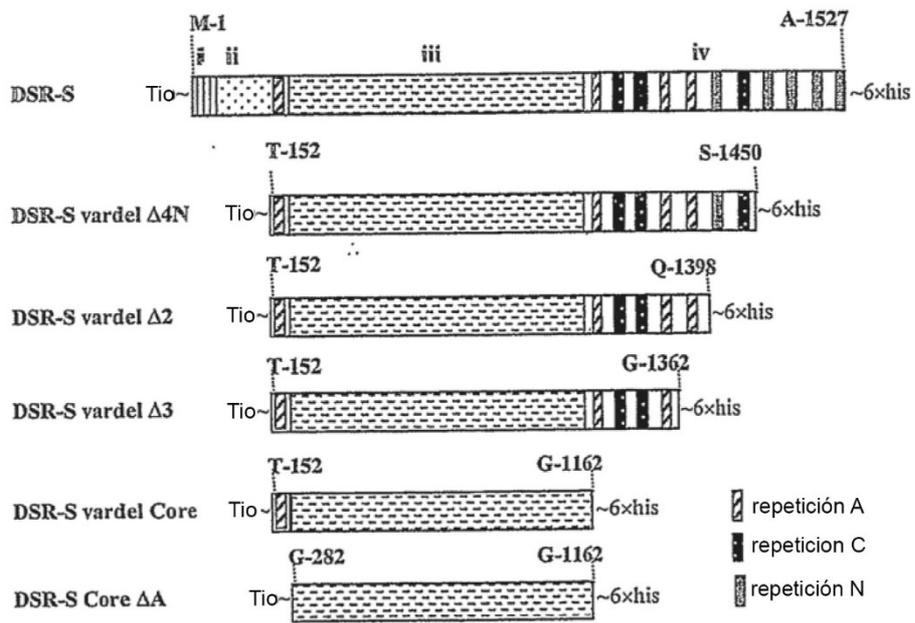


FIGURA 6

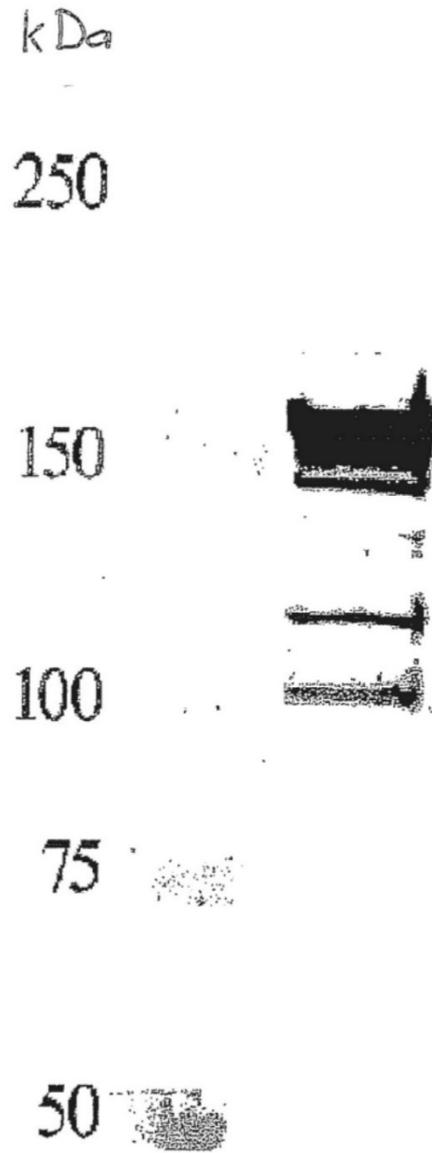


FIGURA 7A

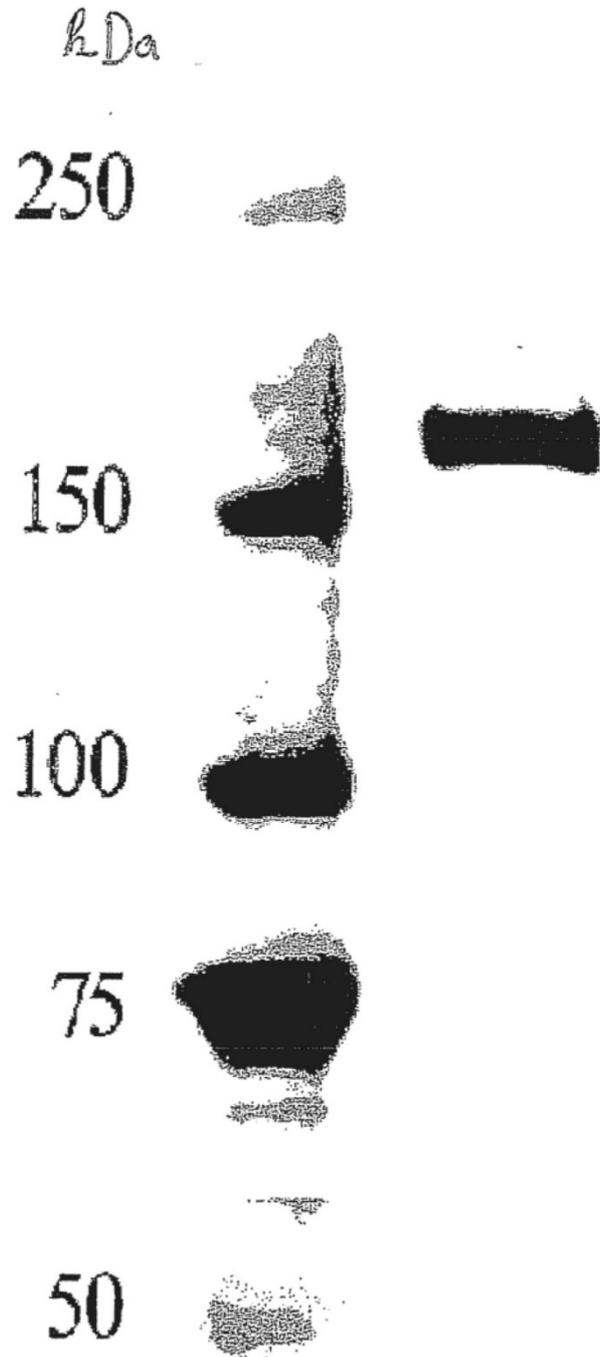


FIGURA 7B

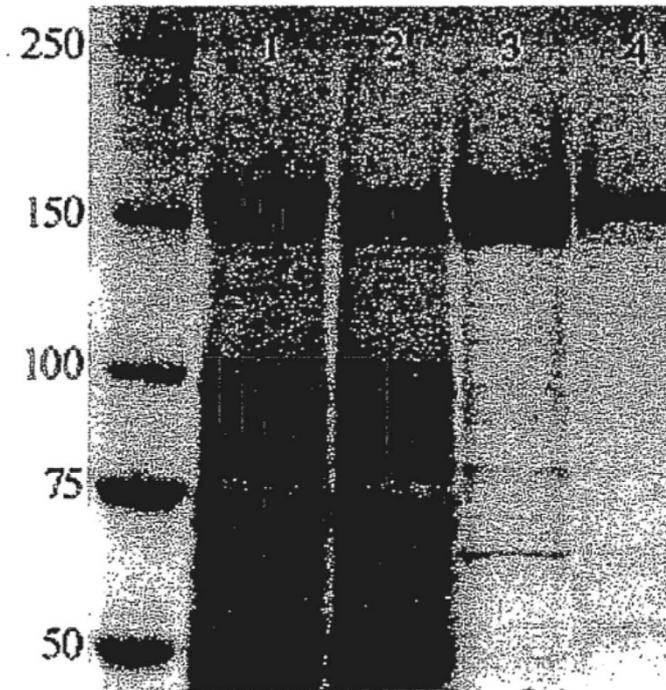


FIGURA 8

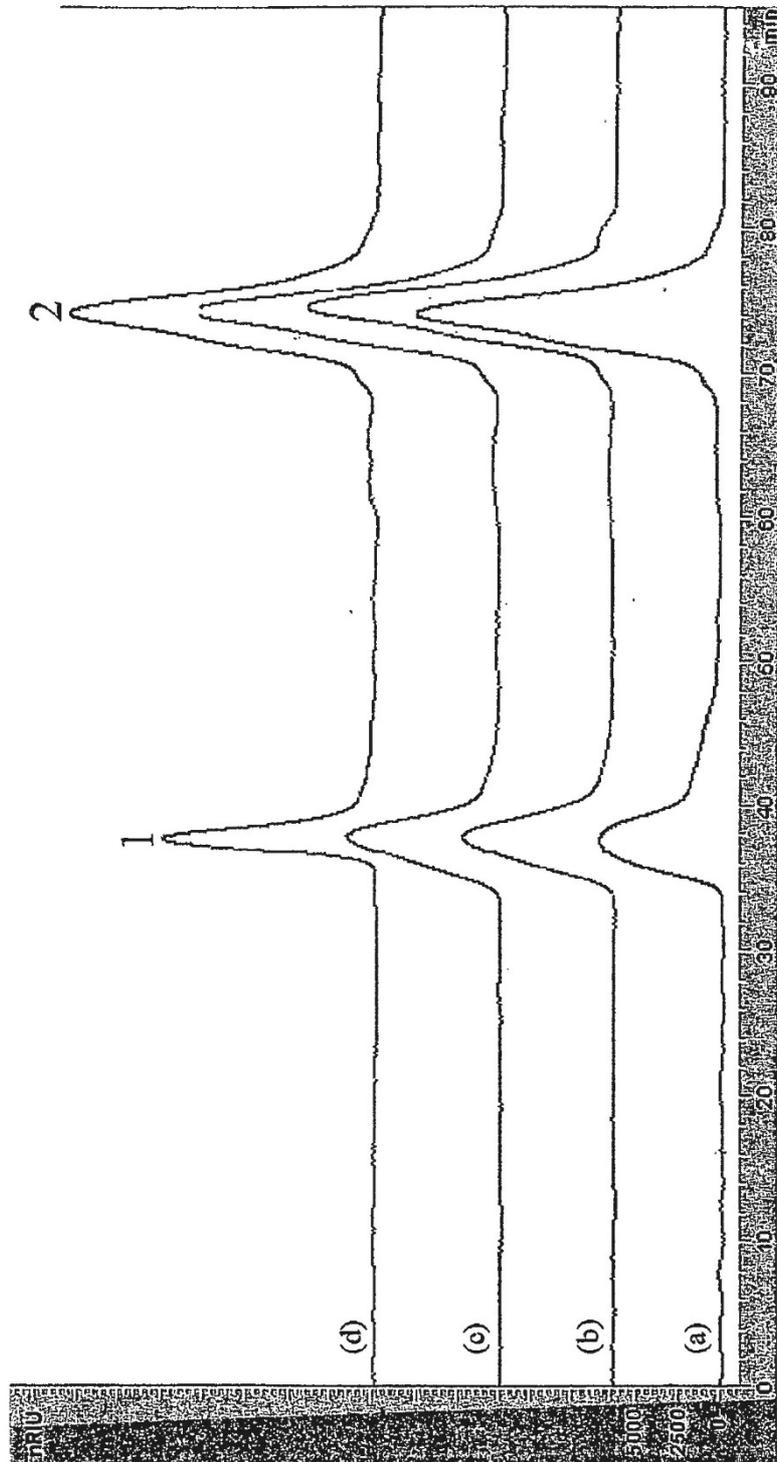


FIGURA 9

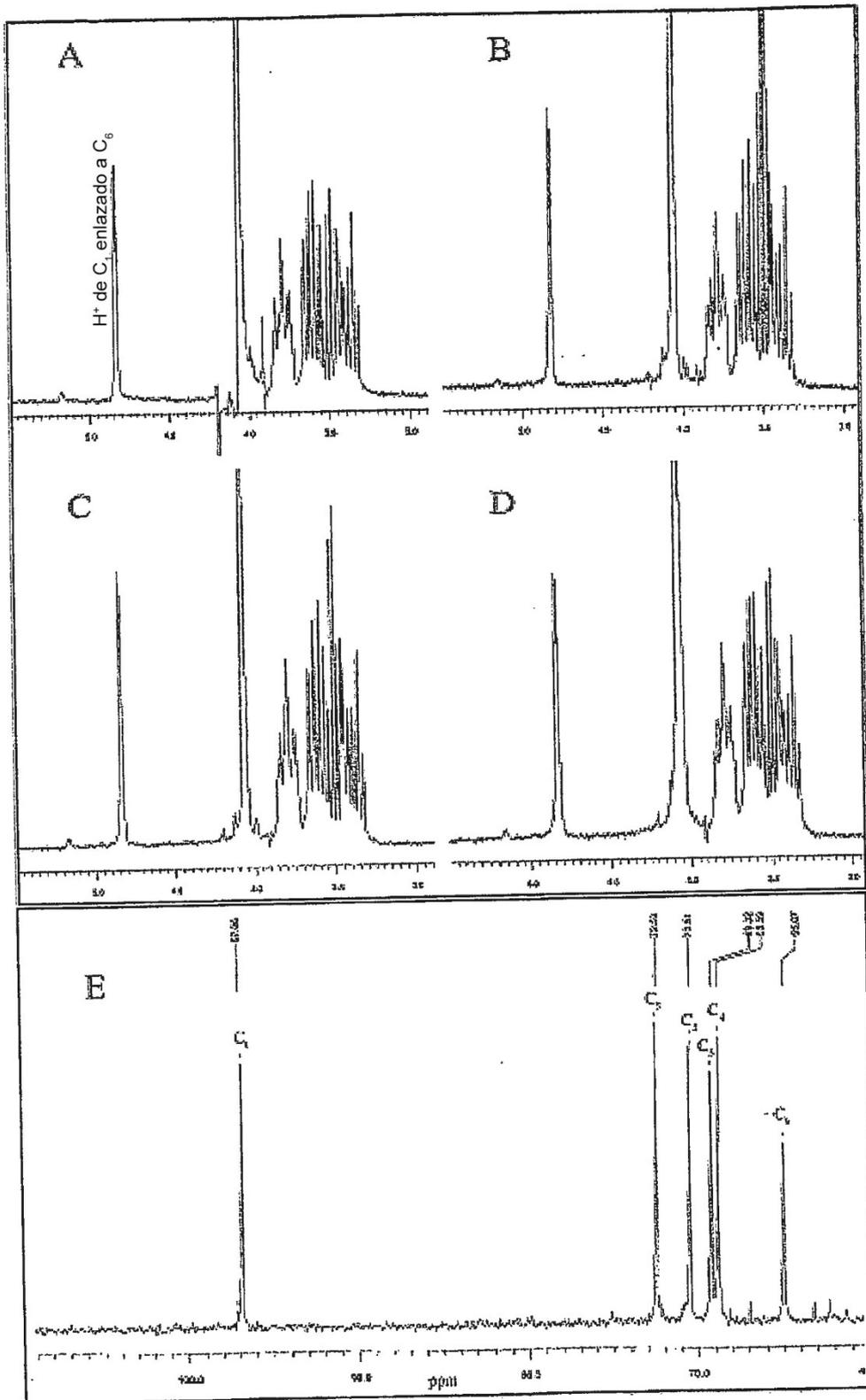


FIGURA 10

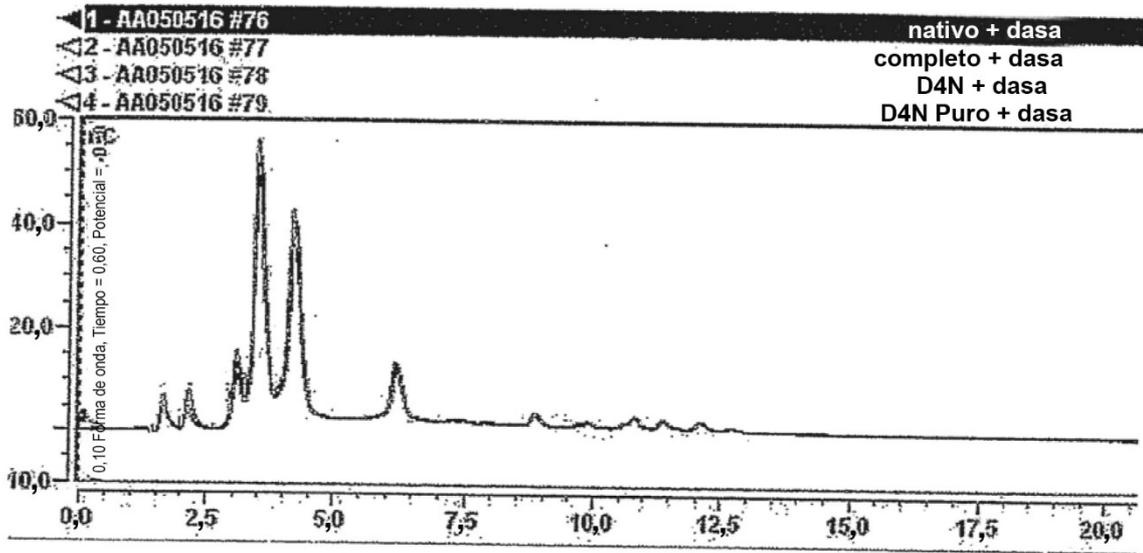


FIGURA 11

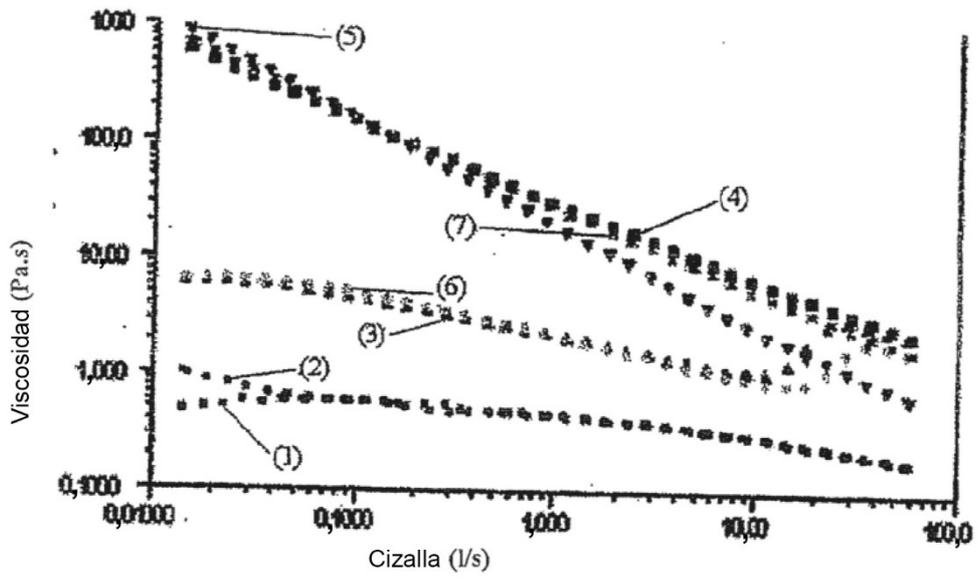


FIGURA 12A

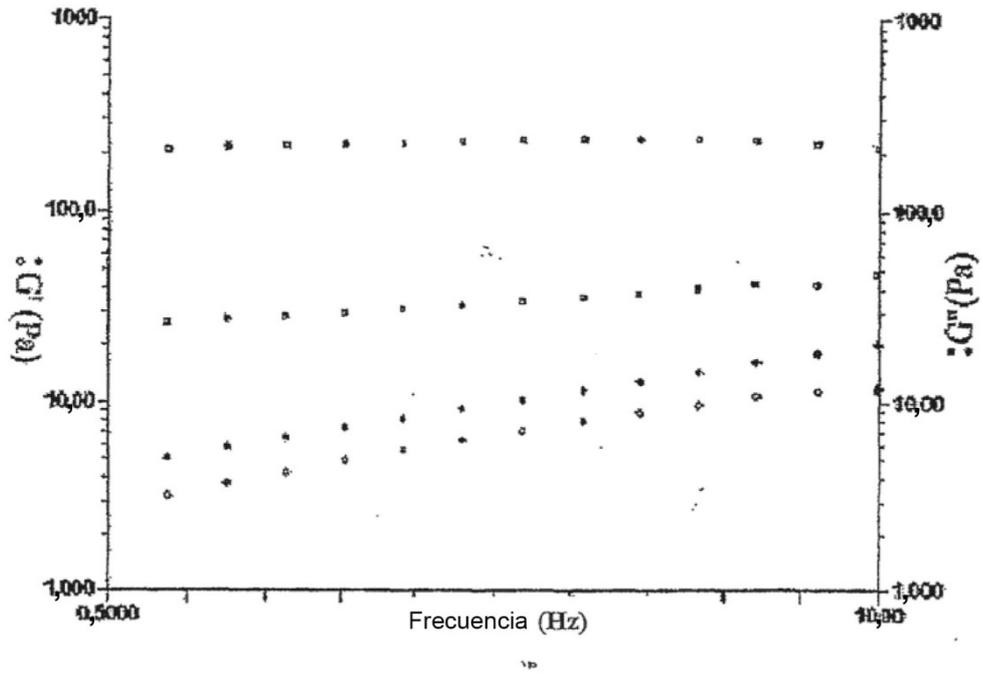


FIGURA 12B

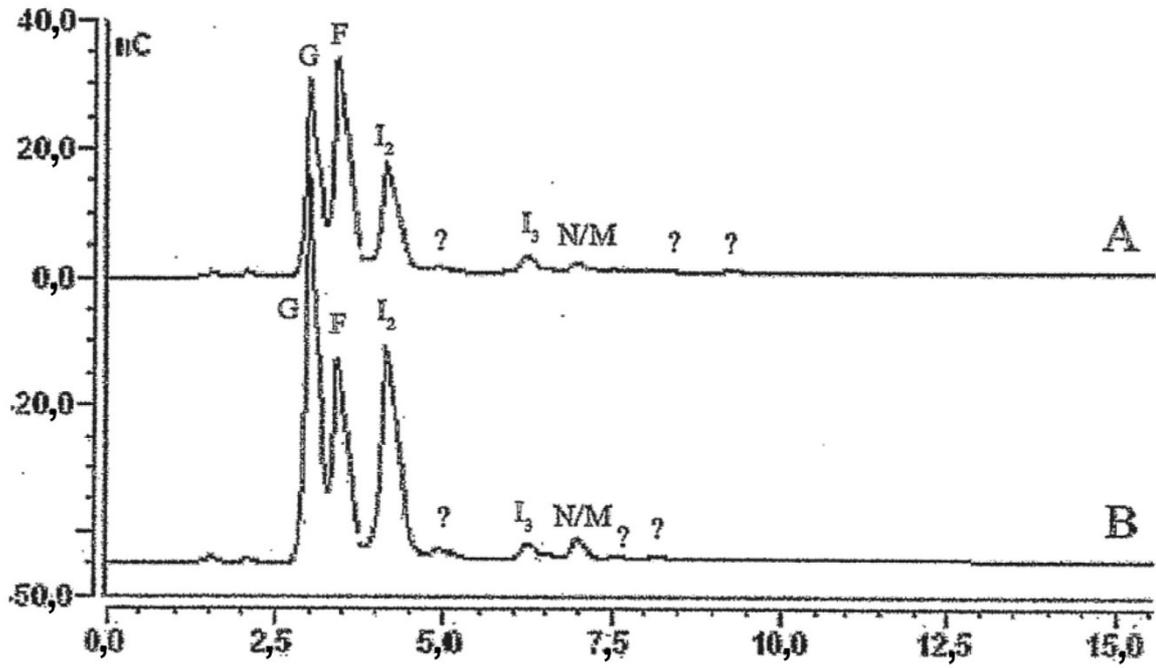


FIGURA 13

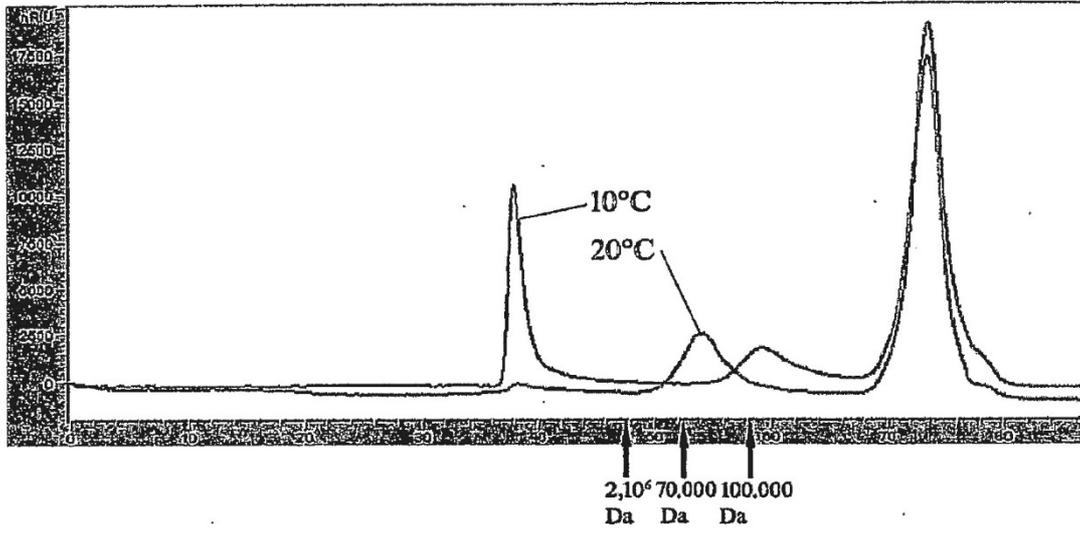


FIGURA 14

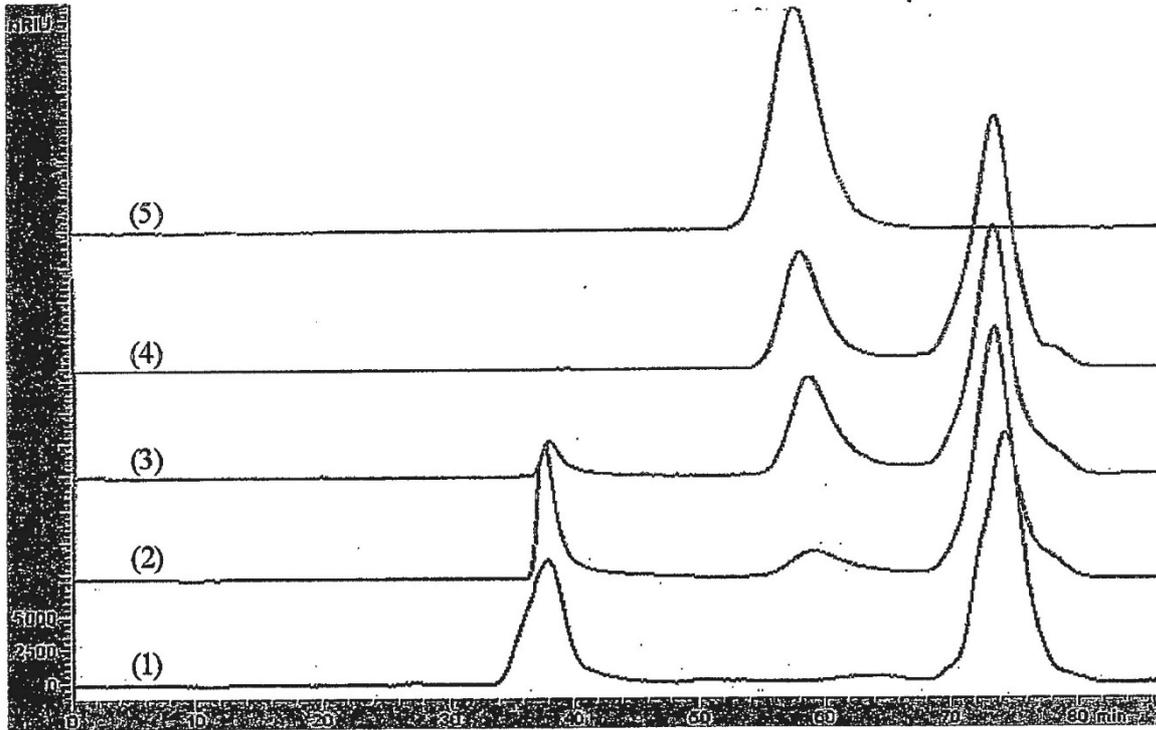


FIGURA 15

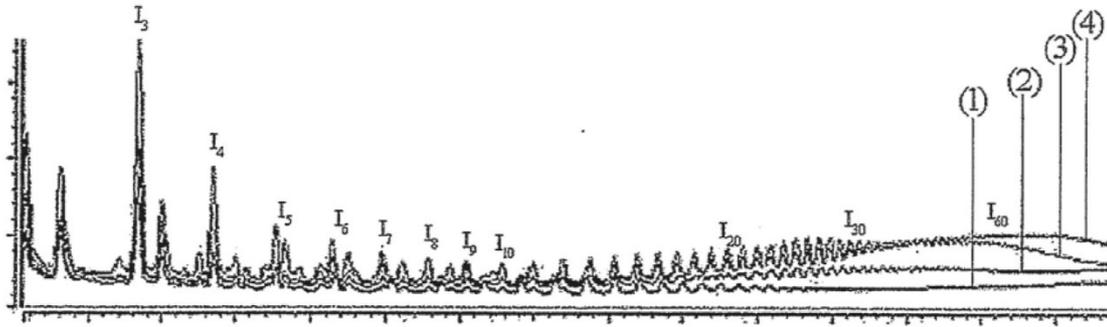


FIGURA 16

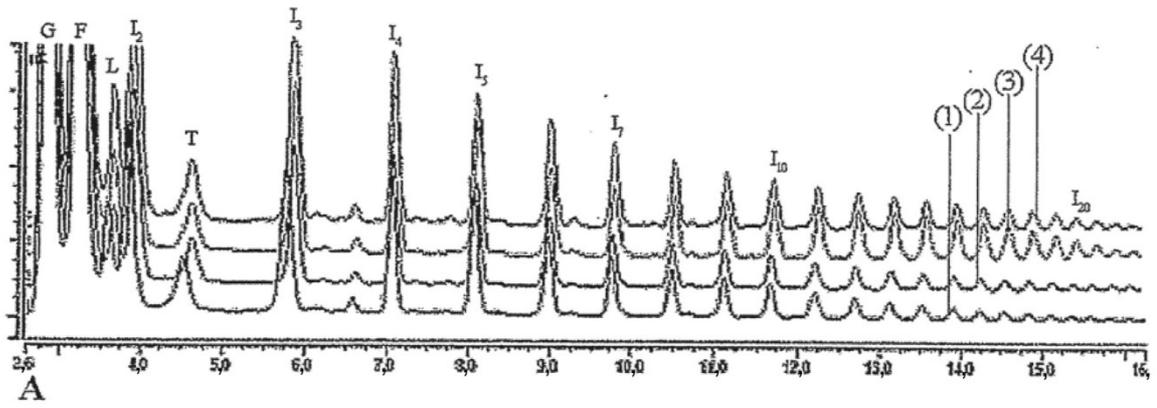


FIGURA 17A

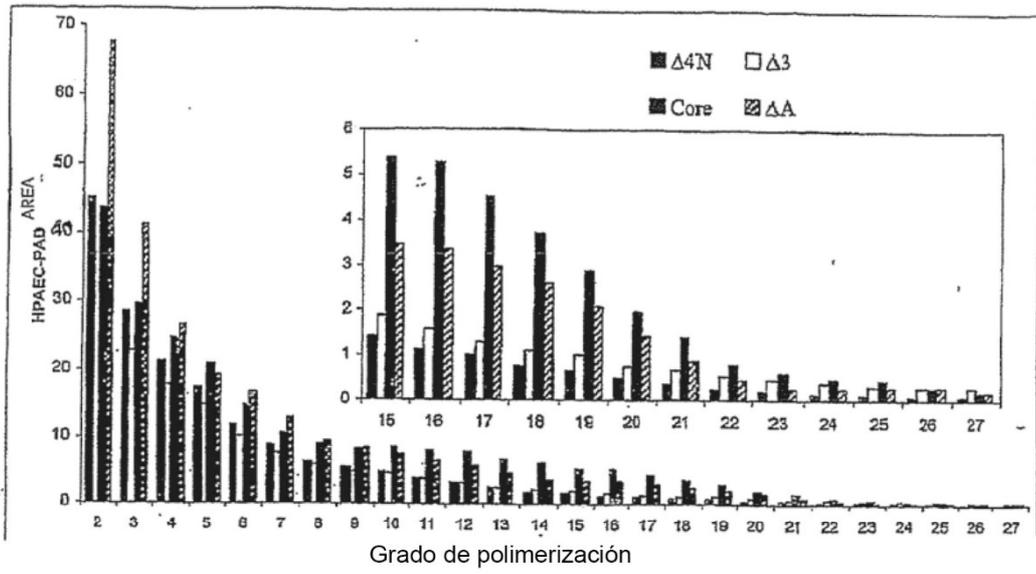


FIGURA 17B