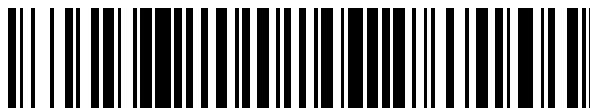


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 195**

21 Número de solicitud: 201330222

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.12.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070113

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CSIC) (100.0%)**

C/ Serrano, nº 117

28006 MADRID ES

72 Inventor/es:

ALCALDE GALEOTE, Miguel;

MATE MATE, Diana;

GONZALEZ PEREZ, David;

PITA MARTINEZ, Marcos;

LOPEZ DE LACEY, Antonio;

LUDWIG, Roland y

KITTL, Roman

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **LACASA DE ALTO POTENCIAL REDOX FUNCIONAL EN SANGRE MEDIANTE EVOLUCIÓN DIRIGIDA MÉTODO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES**

57 Resumen:

Lacasa de alto potencial redox funcional en sangre mediante evolución dirigida método de obtención y sus aplicaciones.

La presente invención describe una lacasa de alto potencial redox obtenida mediante evolución molecular dirigida que es activa en condiciones electrofisiológicas, que resiste elevadas concentraciones de haluros, que tiene una actividad significativa a pHs neutros/alcalinos y que es activa en sangre y plasma humano. La presente invención se refiere a la secuencia aminoacídica de dicha lacasa, a la secuencia nucleotídica que codifica para dicha lacasa y células que permiten su obtención. La lacasa de la invención presenta aplicaciones en diversos sectores: nano-biotecnología, biomedicina, procesos de biorremediación, industria papelera y química fina.

ES 2 525 195 A1

DESCRIPCIÓN

**LACASA DE ALTO POTENCIAL REDOX FUNCIONAL EN SANGRE MEDIANTE
EVOLUCIÓN DIRIGIDA MÉTODO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES**

ESTADO DE LA TÉCNICA

5 Debido a su extraordinaria versatilidad, el estudio de enzimas oxidorreductasas ligninolíticas secretadas por hongos de podredumbre blanca es de especial interés biotecnológico, especialmente, las lacasas de alto potencial redox, las peroxidasas y las enzimas suministradoras de peróxido de hidrógeno (Martínez, Ruiz-Dueñas et al. 2009). Particularmente, las lacasas de alto potencial redox son consideradas por muchos como los
10 biocatalizadores ecológicos del siglo XXI ya que oxidan fácilmente cientos de compuestos utilizando el oxígeno del aire y liberando agua como único subproducto (Mate, García-Ruiz et al. 2011). No obstante, la ausencia de actividad catalítica a pHs neutros/básicos, junto con la inhibición por moderadas concentraciones de diferentes sustancias (haluros, iones metálicos, ácidos grasos, detergentes), siguen siendo un serio obstáculo para su
15 explotación.

Lacasas de alto potencial redox (EC 1.10.3.2) activas bajo condiciones tan adversas son muy deseables para ser utilizadas en aplicaciones que abarcan desde la síntesis orgánica a la biorremediación (Gianfreda, Xu et al. 1999, Alcalde 2007). Además, esta clase de lacasas
20 pertenece al exclusivo grupo de oxidorreductasas capaces de aceptar electrones directamente desde el cátodo de una biopila de combustible o de un biosensor amperométrico. En efecto, el conjunto de ventajas que ofrecen las lacasas de alto potencial redox (p. ej. altas densidades de corriente, transferencia electrónica directa, bajo sobre potencial para la reducción del oxígeno y elevada estabilidad operacional) las sitúa entre los
25 candidatos más adecuados para la construcción de dispositivos bioelectrónicos conteniendo enzimas inmovilizadas (Shleev and Ruzgas 2008).

Probablemente, uno de los desafíos más atractivos en este campo se centra en conseguir nanobiodispositivos inalámbricos implantables que trabajen en diferentes fluidos fisiológicos
30 (sangre, saliva, lágrimas) con el fin de detectar y registrar la presencia de diversos metabolitos *in vivo*. Las principales deficiencias en la ingeniería de tales dispositivos provienen de las dificultades en la miniaturización de sus elementos individuales (antena, transductor), y en el diseño de enzimas fiables y estables para catalizar la reacción del biocátodo, en el cual el oxígeno disuelto en los fluidos se reduce a agua (Castillo, Gaspar et al. 2004, Bullen, Arnot et al. 2006). Desafortunadamente, las lacasas de alto potencial redox
35 son inactivas a pH sanguíneo (~7.4) y están fuertemente inhibidas por concentraciones de

cloruro muy inferiores a las presentes en la sangre (140-150 mM), lo que limita su aplicación específica en biodispositivos así como su utilización en otros procesos que tienen lugar a pH básico y/o en los que hay iones cloruro involucrados (p. ej. el procesamiento de material derivado de colorantes, el tratamiento de aguas residuales, la remediación de
5 contaminantes, la síntesis de compuestos farmacéuticos o el procesamiento de alimentos)(Gianfreda, Xu et al. 1999, Alcalde 2007, Rodgers, Blanford et al. 2010).

En esta invención se presenta la primera lacasa de alto potencial redox funcional en fluidos fisiológicos, como la sangre humana. Dicha lacasa fue creada mediante evolución dirigida y
10 tiene una extraordinaria resistencia a haluros y una actividad significativa a pHs neutros/alcalinos. Además, los beneficios de esta lacasa de alto potencial redox pueden ser extendidos a aplicaciones tales como ensayos biomédicos, procesos de biorremediación (p. ej. oxidación de pesticidas y de hidrocarburos aromáticos policíclicos o procesamiento de tintes y aguas residuales), bioblanqueo de pastas kraft y síntesis orgánica, entre otros
15 procesos en los cuales los altos pHs y las elevadas concentraciones salinas presentes constituyen serios impedimentos (Alcalde, Ferrer et al. 2006, Rodriguez Couto and Toca Herrera 2006, Kunamneni, Camarero et al. 2008, Witayakran and Ragauskas 2009).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 Breve descripción

Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado que es posible obtener lacasas termoestables funcionales en condiciones fisiológicas de pH neutro o ligeramente básicos y/o a altas concentraciones de iones haluros, como el ión cloruro, manteniendo un
25 alto potencial redox, mediante la modificación o mutación en, al menos, un aminoácido clave de la lacasa original o parental de partida (lacasa mutante OB-1), más concretamente mediante la mutación F396I de dicha lacasa OB-1. Además, se describen otras mutaciones de esta lacasa en posiciones en la secuencia original OB-1 adicionales a la mutación F396I, ya sea de forma aislada o en combinación de varias ellas, y que es común a todas esta
30 familia de lacasas.

La presente invención describe una lacasa de alto potencial redox de secuencia SEQ ID NO
10 (Ejemplo 1), que es activa a condiciones electrofisiológicas (Ejemplo 2.1) con gran resistencia a haluros (Ejemplo 2.2) y una actividad significativa a pHs neutros/alcalinos
35 (Ejemplo 2.2) y que presenta actividad en sangre y plasma humano (Ejemplo 2.3). Igualmente, se describe la secuencia de nucleótidos codificante de la lacasa de la invención

(por ejemplo, la secuencia SEQ ID NO 9) así como construcciones genéticas necesarias para su producción.

El punto de partida fue la lacasa termoestable, lacasa OB-1, protegida por la patente
 5 ES201030723 depositada el 17 de mayo de 2010, titulada "Lacasa de alto potencial redox"
 (Maté et al., 2010). La lacasa OB-1 se sometió a cuatro ciclos de evolución dirigida en
 combinación con enfoques semi-racionales dio origen al último mutante de este proceso, la
 lacasa ChU-B de la invención de SEQ ID NO 10 (Ejemplo 1) cuyo sitio catalítico presenta
 10 unas características (Ejemplo 3) que lo convierten en una valiosa herramienta para diseñar
 lacasas con un amplio espectro de aplicaciones biotecnológicas. Esta adaptación de las
 lacasas a condiciones muy diferentes a las determinadas por su naturaleza permite la
 catálisis en condiciones extremas y abre un extenso abanico de oportunidades para su
 utilización en nanobiodispositivos implantables, síntesis química y en procesos de
 detoxificación.

15

Un resumen de los polinucleótidos y péptidos descritos en la presente invención se resumen en Tabla 1.

VARIANTE	SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS	VARIANTE	SECUENCIAS AMINOACÍDICAS
	SEQ ID N°		SEQ ID N°
OB-1	1	OB-1	2
35H10	3	35H10	4
20F1	5	20F1	6
27C7	7	27C7	8
ChU-B	9	ChU-B	10
14F1	11	14F1	12
1B1	13	1B1	14
3A7	15	3A7	16
19B12	17	19B12	18
18A10	19	18A10	20
21D9	21	21D9	22
17D4	23	17D4	24
20C3	25	20C3	26

14C5	27	14C5	28
OB-1 sin prepro-líder del factor α	29	OB-1 sin prepro-líder del factor α	30

Los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de secuencias aminoacídicas descritos en la invención corresponden a variantes obtenidas mediante evolución dirigida de la lacasa de alto potencial redox OB-1 (patente ES201030723). Dicha proteína se corresponde a la secuencia de nucleótidos, o polinucleótidos, que constituyen la secuencia codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO 2.

Por tanto, un primer objeto de la invención se refiere al polinucleótido aislado que codifica un polipéptido con actividad lacasa activo a condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o que presenta actividad en sangre y plasma humano, en adelante **polinucleótido de la invención**, caracterizado porque la secuencia aminoacídica del polipéptido que codifica presenta una identidad de al menos un 50% con la SEQ ID NO 2 (OB-1), y porque comprende al menos una alteración aminoacídica (como pueden ser por ejemplo, sustituciones, deleciones, y/o inserciones) en la posición homóloga a la posición 487 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por el aminoácido isoleucina (I). Dicha mutación se corresponde con la mutación F396I en el polipéptido maduro con actividad lacasa sin el prepro-líder del factor α .

Con la información suministrada en la presente invención un experto en la materia es capaz de identificar secuencias de nucleótidos homólogas a las descritas en la presente invención y que codifican para lacasas con características idénticas a las descritas para la lacasa de la invención. Por tanto, el polinucleótido de la invención constituye la secuencia codificante de una variante de la lacasa OB-1 con la actividad mejorada descrita, cuya secuencia de nucleótidos se corresponde a:

- a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada o en su cadena complementaria,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar en condiciones astringentes con una secuencia polinucleotídica de (a), o
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético.

Los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de secuencias aminoacídicas descritos en la invención corresponden a variantes obtenidas mediante evolución dirigida de la lacasa de alto potencial redox OB-1 (patente ES201030723). Dicha proteína se corresponde a la secuencia de nucleótidos, o polinucleótidos, que constituyen la secuencia
 5 codificante del polipéptido con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO 2.

Así, en un objeto preferido de la invención, la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) en la posición 396 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2 es una isoleucina (I), y se corresponde con la posición 487 de SEQ ID NO 2. En una realización
 10 particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 3 (lacasa mutante 35H10).

Además, se describen otras mutaciones de la lacasa de alto potencial redox OB-1 adicionales a la mutación F396I de la lacasa madura sin el prepro-líder del factor α , que es
 15 común a todas estas lacasas, ya sea de forma aislada o en combinación de varias de ellas, y que mejoran la actividad en condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o que presenta actividad en sangre y plasma humano de la mutación F396I. Estas mutaciones pertenecen, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

- 20 a) La sustitución del aminoácido serina (S) por el aminoácido arginina (R) en la posición homóloga a la posición 135 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (S135R) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 226 de SEQ ID NO 2,
- 25 b) La sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) por el aminoácido asparagina (N) en la posición homóloga a la posición 205 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (D205N) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 296 de SEQ ID NO 2,
- 30 c) La sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 218 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (T218V) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 309 de SEQ ID NO 2,
- d) La delección del aminoácido alanina (A) en la posición homóloga a la posición 389 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (A389-) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 480 de SEQ ID NO 2,
- 35 e) La sustitución del aminoácido asparagina (N) por el aminoácido ácido aspártico (D) en la posición homóloga a la posición 426 de la lacasa madura SEQ ID NO

30 (N426D) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 517 de SEQ ID NO 2,

f) La sustitución del aminoácido isoleucina (I) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 452 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (I452V) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 543 de SEQ ID NO 2,

g) La sustitución del aminoácido fenilalanina (F) por un aminoácido que se escoge de entre los siguientes: serina (S), prolina (P), treonina (T), alanina (A), glicina (G), arginina (R) o glutámico (E), en la posición homóloga a la posición 454 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (F454S, F454P, F454T, F454A, F454G, F454R, F454E, respectivamente) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 545 de SEQ ID NO 2,

h) La sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido serina (S) en la posición homóloga a la posición 487 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 (T487S) comprendida en SEQ ID NO 2, que se corresponde a su vez con la posición 578 de SEQ ID NO 2.

Así, en otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además N426D de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 517 de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 5 (lacasa mutante 20F1).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 543 de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 7 (lacasa mutante 27C7).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además F454E de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 545 de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 9 (lacasa mutante ChU-B).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la delección del aminoácido en la posición 389 (A389-) y N426D de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 480 y 517, respectivamente, de la SEQ ID NO 2
5 (lacasa con el preprolíder del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 11 (lacasa mutante 14F1).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas
10 D205N y I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 296 y 543, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolíder del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 13 (lacasa mutante 1B1).

15 En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas N426D y I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 517 y 543, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolíder del factor α). En otra realización particular de la invención, el
20 polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 15 (lacasa mutante 3A7).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454P de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se
25 corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolíder del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 17 (lacasa mutante 19B12).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración
30 aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454T de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolíder del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 19 (lacasa mutante 18A10).

35

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454A de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2
5 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 21 (lacasa mutante 21D9).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V
10 y F454G, de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 23 (lacasa mutante 17D4).

15 En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454R de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización objeto particular de la invención,
20 el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 25 (lacasa mutante 20C3).

En otro objeto de la invención, el polinucleótido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas
25 N426D, F454S y T487S de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 517 y 578, respectivamente, de la SEQ ID NO 2 (lacasa con el preprolídido del factor α). En otra realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 27 (lacasa mutante 14C5).

30 Considerando que las lacasas de alto potencial redox secretadas por hongos basidiomicetos ligninolíticos pueden considerarse afines en cuanto a su evolución, es de esperar que la identidad global de los genes sea de un 50% o mayor, y más concretamente al nivel de la secuencia aminoacídica correspondiente a la SEQ ID NO 2 (lacasa OB-1), sea de un 80% o mayor. La correspondencia entre la secuencia aminoacídica de la(s) lacasa(s) artificiales
35 objetos de la invención y la secuencia de otras lacasas de alto potencial redox se pueden

determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquéllas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia aminoacídica de la lacasa putativa y la secuencia aminoacídica correspondiente a la SEQ ID NO 10 de esta memoria.

5

Con la información suministrada en la presente invención, además un experto en la materia es capaz de combinar las mutaciones anteriormente descritas en la presente invención para generar nuevas variantes de lacasas con similar o mejorada actividad en condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistentes a elevadas concentraciones de haluros y/o que presentan actividad en sangre y plasma humano.

10

El término "homología", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente a la semejanza o identidad entre los nucleótidos de dos o más polinucleótidos.

15

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos polinucleótidos que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA. Puesto que dos proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen función y estructura similares, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 30% indican estructuras homólogas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80% mantendrán las mismas propiedades de dicho péptido.

20

El término "aislado", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a nucleótidos o péptidos que: 1) se encuentran sustancialmente libres de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con él en la naturaleza, o 2) si se encuentran en su medio natural, han sido sintéticamente (no naturalmente) alterados por la intervención humana y/o introducidos en una célula que no los posee de forma nativa. Por ejemplo, un polinucleótido natural se convierte en "aislado" si ha sido alterado por medio de la intervención humana (por medio de, por ejemplo pero sin limitarnos, mutagénesis dirigida, inserciones, deleciones, etc.). De la misma manera, un polinucleótido natural se convierte en "aislado" si se introduce por medios no naturales en un organismo no nativo a dicho polinucleótido (transfección). Por tanto, el término "aislado" en este último caso, es equivalente al término "heterólogo".

30

35

Un segundo objeto de la invención hace referencia a la secuencia aminoacídica codificada por el polinucleótido de la invención, de ahora en adelante polipéptido de la invención, y que presenta actividad lacasa activa en condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o activa en sangre y plasma humano
5 caracterizado porque su secuencia presenta una identidad de al menos un 50% con la SEQ ID NO 2 (OB-1), y porque comprende al menos una alteración aminoacídica (como pueden ser, por ejemplo, sustituciones, deleciones, y/o inserciones) en la posición homóloga a la posición 487 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por el
10 aminoácido isoleucina (I) (mutación F396I de la lacasa madura sin el preprolíder del factor α con SEQ ID NO 30).

Así en un objeto preferido de la invención, la sustitución del aminoácido fenilalanina (F) en la posición 396 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2 es una
15 isoleucina (I) y se corresponde con la posición 487 de SEQ ID NO 2. En una realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 4 (lacasa mutante 35H10).

El polipéptido de la invención también puede presentar mutaciones adicionales a la
20 sustitución del aminoácido fenilalanina (F) en la posición 396 de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2 por una isoleucina (I) (F396I) y mejoran su actividad a condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o que presenta actividad en sangre y plasma humano. Estas mutaciones descritas anteriormente en esta invención pueden presentarse en diversas
25 combinaciones conjuntamente con F396I como será conocido para un experto en la materia.

Así, en otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además N426D de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en
30 SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 517 de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 6 (lacasa mutante 20F1).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en
35 SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 543 de la SEQ ID NO 2. En

otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 8 (lacasa mutante 27C7).

5 En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además F454E de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487 y 545 de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 10 (lacasa mutante ChU-B).

10 En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la delección del aminoácido en la posición 389 (A389-) y N426D de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 480 y 517, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con
15 la SEQ ID NO 12 (lacasa mutante 14F1).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas D205N y I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se
20 corresponden con las posiciones 487, 296 y 543, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 14 (lacasa mutante 1B1).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración
25 aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas N426D y I452V de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 517 y 543, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 16 (lacasa mutante 3A7).

30 En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454P de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En
35 otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 18 (lacasa mutante 19B12).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454T de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 20 (lacasa mutante 18A10).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454A de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 22 (lacasa mutante 21D9).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454G de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 24 (lacasa mutante 17D4).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas I452V y F454R de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 543 y 545, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 26 (lacasa mutante 20C3).

En otro objeto de la invención, el polipéptido de la invención presenta la alteración aminoacídica F396I y además la siguiente combinación de alteraciones aminoacídicas N426D, F454S y T487S de la lacasa madura SEQ ID NO 30 comprendida en SEQ ID NO 2, y que se corresponden con las posiciones 487, 545 y 578, respectivamente, de la SEQ ID NO 2. En otra realización particular de la invención, el polipéptido de la invención se corresponde con la SEQ ID NO 28 (lacasa mutante 14C5).

Con la información suministrada en la presente invención, además un experto en la materia es capaz de combinar las mutaciones anteriormente descritas en la presente invención para generar nuevas variantes de lacasas con similar actividad.

5 El polinucleótido de la invención puede encontrarse aislado como tal o formando parte de los vectores que permiten la propagación de dichos polinucleótidos en células hospedadoras adecuadas. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un vector, en adelante vector de la invención, que comprende el polinucleótido de la invención como se describe anteriormente.

10

Los vectores adecuados para la inserción de dicho polinucleótido son vectores derivados de los vectores de expresión en procariotas tales, a título ilustrativo, como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, Co1E1, pCR1, RP4, fagos y vectores "lanzadera", tales como pSA3 y pAT28; vectores de expresión en levaduras tales como el plásmido de 2 micras de *Saccharomyces cerevisiae*), plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centrómeros y similares; vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la pVL vectores de expresión; vectores de expresión en células de plantas tales como piBi, pEarleyGate, PAVA, pCAMBIA, PGSA, PGWB, PMDC, PMY, serie de poros y similares, y otros vectores de expresión en células eucariotas, incluyendo baculovirus adecuados para la transfección de células de insecto usando cualquier sistema de baculovirus disponible comercialmente. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una "célula hospedadora" incluye cualquier célula cultivable que puede ser modificada mediante la introducción de ADN no contenido de manera natural en la célula, de aquí en adelante célula hospedadora de la invención. Preferiblemente, una célula hospedadora es aquella en la que el polinucleótido de la invención puede ser expresado, dando lugar a un polipéptido estable, modificado post-traduccionalmente y localizado en el compartimento subcelular apropiado. La elección de una célula hospedadora adecuada puede también estar influida por la elección de la señal de detección. Por ejemplo, el uso de construcciones con genes reporteros (por ejemplo, lacZ, luciferasa, timidina quinasa o GFP) puede proporcionar una señal seleccionable mediante la activación o inhibición de la transcripción del gen de interés en respuesta a una proteína reguladora de la transcripción. De cara a conseguir una selección o screening óptimo, el fenotipo de la célula hospedadora deberá ser considerado. Una célula hospedadora de la presente invención incluye células procariotas y eucariotas. Las procariotas incluyen organismos gram negativos (por ejemplo, *Escherichia coli*) o gram positivos (por ejemplo, bacterias del género *Bacillus*). Las células procariotas se usarán, preferiblemente, para la propagación de la secuencia del control de la

15
20
25
30
35

transcripción del vector que contiene el(los) polinucleótido(s) objeto(s) de la invención, lo que permitirá conseguir un mayor número de copias del vector conteniendo el(los) polinucleótido(s) objeto(s) de la invención. Entre las células hospedadoras procariontas adecuadas para la transformación de este vector se encuentran, por ejemplo, *E. coli*,
5 *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y otras especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. Las células eucariotas incluyen, entre otras, células de levadura, células de plantas, células de hongos, células de insectos, células de mamífero, y células de organismos parásitos (por ejemplo, Trypanosomas). Tal y como se emplea en esta memoria, el término levadura no incluye sólo levadura en el sentido
10 taxonómico estricto, es decir, organismos unicelulares, sino también hongos multicelulares similares a las levaduras u hongos filamentosos. Ejemplos de especies son *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Ustilago maydis*, con *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* como organismos preferidos. Otras levaduras que pueden utilizarse en la producción de la(s) secuencia(s) poliaminoacídica(s) de la presente invención son
15 *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Candida tropicalis*, y *Hansenula polymorpha*. Los sistemas de cultivo con células hospedadora de mamífero incluyen líneas celulares establecidas como las células COS, células L, células 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO), células madre embrionarias, con las células BHK, HeK o HeLa como células preferidas. Las células eucariotas son, preferiblemente, utilizadas para la expresión
20 del gen recombinante mediante la aplicación de la secuencia de regulación de la transcripción o el vector de expresión de la presente invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención del polipéptido de la invención, que comprende:

- 25 1) Introducir el vector de la invención en una célula hospedadora adecuada (célula hospedadora de la invención),
- 2) Cultivar la célula hospedadora de la invención en un medio adecuado, y,
- 3) Purificar el polipéptido de la invención con actividad lacasa

El término "purificar" tal y como se emplea en la descripción, se refiere al aislamiento
30 del polipéptido de la invención y a su concentración, del resto de polipéptidos presentes en el medio de cultivo de la célula hospedadora de la invención. El aislamiento de la lacasa puede llevarse a cabo mediante técnicas de solubilidad diferencial, cromatografía, electroforesis o isoelectroenfoque. Las técnicas de cromatografía pueden estar basadas en el peso molecular, la carga iónica (basada en el estado de ionización de los aminoácidos en
35 las condiciones de trabajo) o la afinidad de la proteína y puede realizarse en columna, en papel o en placa. El aislamiento de la proteína puede realizarse, por ejemplo, mediante

precipitación con sulfato amónico, cromatografía líquida rápida (FPLC, del inglés Fast Protein Liquid Chromatography) o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography), empleando sistemas automatizados que reducen notablemente el tiempo de purificación e incrementan el rendimiento de la purificación.

Un cultivo de células hospedadoras se refiere al proceso de mantener y crecer las células hospedadoras. Los cultivos celulares necesitan condiciones controladas de temperatura, pH, porcentajes de gases (oxígeno y dióxido de carbono), así como la presencia de los nutrientes adecuados para permitir la viabilidad y la división celular. Los cultivos celulares pueden desarrollarse en sustratos sólidos como el agar, o en medio líquido, lo que permite cultivar grandes cantidades de células en suspensión.

Otro objeto de la invención se refiere al uso del polinucleótido de la invención para la obtención del polipéptido de la invención con actividad lacasa.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de la célula hospedadora de la invención para la obtención del polipéptido de la invención. Preferentemente, la célula hospedadora de la invención es una levadura, más preferentemente de los géneros *Saccharomyces* sp. o *Pichia* sp, y más preferentemente aún las especies son *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*.

Las lacasas de alto potencial redox, como es el caso del polipéptido de la invención, son conocidas por su gran número de aplicaciones como pueden ser, por ejemplo, su empleo en procesos de biorremediación (p. ej. oxidación de pesticidas y de hidrocarburos aromáticos policíclicos o procesamiento de tintes y aguas residuales), bioblanqueo de pastas kraft y síntesis orgánica; procesos, todos ellos, en los cuales los altos pHs y las elevadas concentraciones salinas presentes constituyen serios impedimentos. Así, el polipéptido de la invención y la célula hospedadora de la invención pueden tener cualquiera de los usos ya conocidos en el estado de la técnica para estas enzimas.

Como se ha comentado anteriormente en la presente invención, el desarrollo de una lacasa activa en condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o activa en sangre y plasma humano, tiene amplias aplicaciones en ensayos biomédicos. Así, otro objeto de la de la invención se refiere al uso del polipéptido de la invención en la elaboración de kits de diagnóstico con fines biomédicos

para la detección de metabolitos y medición de su concentración en, por ejemplo, sangre, saliva, lágrimas y/u orina.

Otro objeto particular de la invención se refiere al uso del polipéptido de la invención en la elaboración de dispositivos bioelectrónicos que contienen enzimas inmovilizadas para, por ejemplo, el diagnóstico biomédico mediante la detección de metabolitos y medición de su concentración *in vivo*, a través de, a modo ilustrativo, nanobiodispositivos inalámbricos implantables que trabajen en diferentes fluidos fisiológicos (sangre, saliva, lágrimas y/u orina).

Los Kits de diagnóstico con fines biomédicos y los dispositivos bioelectrónicos que contienen enzimas inmovilizadas descritos forman parte de la presente invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración de la invención y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Evolución dirigida de la lacasa mutante OB-1. El gen de fusión del tipo parental (mutante OB-1) (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010) está formado por el prepro-líder del factor α –reemplazando la secuencia señal nativa con el fin de aumentar la secreción en *S. cerevisiae*– y por la lacasa madura. El pre-líder del factor α está representado en negro, el pro-líder del factor α en blanco y la lacasa madura en gris. Las nuevas mutaciones están señaladas como estrellas y las mutaciones acumuladas como cuadrados; A389- indica la deleción de la Ala389. MAT (mejora de la actividad total en buffer de sangre): valor que indica el número de veces de mejora de la actividad lacasa detectada en el sobrenadante de cada mutante proveniente de microcultivo de *S. cerevisiae* comparada con la actividad del parental OB-1. Las medidas se hicieron por quintuplicado a partir de sobrenadantes de cultivos independientes crecidos en placas de 96 pocillos y utilizando 3 mM de ABTS como sustrato. La $_{ap}I_{50Cl}$ (I_{50} aparente para NaCl) indica la concentración de cloruro sódico a la cual la enzima retiene la mitad de su actividad inicial, determinada con sobrenadantes de cada mutante procedentes de microcultivos de *S. cerevisiae* tras 2 h de incubación. La actividad relativa a diferentes valores de pH fue evaluada utilizando 3 mM de ABTS como

sustrato. Las flechas discontinuas indican el mutante empleado como parental en cada generación. N.d., no determinado. Las mutaciones silenciosas no están incluidas.

Figura 2.- Actividad en fluidos fisiológicos y caracterización espectroelectroquímica.

5 (a) Actividad de la lacasa de la invención mutante ChU-B determinada por medida del consumo de oxígeno. Para monitorizar la actividad lacasa en sangre y plasma humanos, ambos fluidos se suplementaron con 10 mM de ácido ascórbico y el pH se ajustó a 7.4 antes de añadir la enzima. (b) Valoración redox de la lacasa ChU-B a pH fisiológico. Cada valoración redox se llevó a cabo en ambos sentidos (es decir, de la enzima en estado

10 totalmente oxidado a estado totalmente reducido –valoración reductora– y *vice versa* –valoración oxidativa–). Se registraron los espectros de la lacasa una vez alcanzado el equilibrio redox, obteniéndose espectros típicos de la enzima oxidada, parcialmente reducida y totalmente reducida, los cuales están representados en la figura. La equilibración del centro de cobre T1 a cada potencial aplicado fue evidente por estabilización de la

15 absorbancia a 600 nm. Como los mediadores redox que se emplearon son transparentes a longitudes de onda superiores a 500 nm, los cambios espectroscópicos a 600 nm fueron atribuidos al Cu T1 de la lacasa. Se muestran los espectros de la valoración reductora correspondientes a la lacasa oxidada (línea continua, potencial aplicado +1000 mV vs ENH), a la lacasa parcialmente reducida (línea discontinua y discontinua con puntos, +700 mV y

20 +600 mV vs ENH, respectivamente) y a la lacasa totalmente reducida (línea de puntos, +600 mV vs ENH). Inserto: representación de la dependencia del potencial aplicado frente a la absorbancia a 600 nm, y los parámetros promedio calculados a partir de las valoraciones reductora y oxidativa (valor del punto medio +720 mV vs. ENH y valor de la pendiente 110 mV). (c) Voltamogramas cíclicos de reducción del oxígeno obtenidos utilizando un electrodo

25 de grafito de baja densidad pulido con el mutante ChU-B adsorbido sobre su superficie (línea continua) y en ausencia de enzima (línea discontinua). Las medidas se llevaron a cabo en una celda electroquímica de tres electrodos conteniendo buffer fosfato sódico 100 mM pH 7.4 y tras burbujear oxígeno a una presión de 1 atm durante 15 min, y utilizando un alambre de platino como contraelectrodo y un electrodo de Ag|AgCl|KCl como electrodo de

30 referencia. Las medidas se realizaron empleando el equipo Autolab PGSTAT30 controlado por el software GPES 4.9.

Figura 3.- Caracterización bioquímica de la lacasa de la invención ChU-B. Círculos blancos, tipo parental; círculos negros, mutante ChU-B. Los perfiles de actividad frente al pH se midieron en buffer Britton y Robinson a diferentes valores de pH con 3 mM de DMP (a) o de ABTS (b) como sustratos. La actividad lacasa se normalizó con respecto al valor de pH

35

óptimo. (c-e) Inhibición por haluros: (c) Inhibición por cloruro medida con 2.4 mM de ABTS en buffer acetato sódico 100 mM pH 4.0. (d) Inhibición por fluoruro medida con 2.4 mM de ABTS en buffer acetato sódico 100 mM pH 4.0. (e) Inhibición por cloruro de la lacasa ChU-B medida a pH 7.4 con 2.4 mM de ABTS en buffer fosfato sódico 100 mM pH 7.4. Cada valor
5 representa el valor promedio y la desviación estándar resultado de tres experimentos independientes.

Figura 4.- Detalles de las mutaciones en la lacasa de la invención ChU-B (b) comparado con los correspondientes aminoácidos en el tipo parental (a). La estructura catalítica general
10 está formada por el sitio de Cu T1 cercano a la superficie, aunque el cobre no está directamente expuesto al disolvente. El Cu T1 está trigonalmente coordinado por la His455, la His394 y la Cys450, ésta última formando parte del tripéptido altamente conservado en las lacasas His449-Cys450-His451, el cual conecta el sitio T1 con el cluster trinuclear situado a una distancia de 12 Å. Los electrones son transferidos desde el Cu T1 a través de una ruta
15 de transferencia electrónica intramolecular formada por el tripéptido ya mencionado hacia el cluster trinuclear T2/T3, donde tiene lugar la unión del oxígeno y su reducción a dos moléculas de agua. Este segundo sitio activo se encuentra en el interior de la estructura de la lacasa, con el Cu T2 tricoordinado por dos residuos de His y una molécula de agua, y dos cobres T3 tetracoordinados. La entrada del oxígeno y la salida del agua al sitio T2/T3 tiene
20 lugar a través de dos canales presentes en la estructura. Se muestran las mutaciones F396I y F454E y I452V (revertida en ChU-B). Las esferas representan iones cobre. También se representan los residuos de la vía de transferencia electrónica desde el Cu T1 al cluster T2/T3 y los aminoácidos involucrados en la primera esfera de coordinación de los cobres catalíticos y sus interacciones. La superficie electrostática de la estructura proteica se
25 muestra en el fondo. El modelo tridimensional está basado en la estructura cristalina de la lacasa de *Trametes trogii* (con un 97% de identidad de secuencia, PDB: 2HRG) (Matera, Gullotto et al. 2008).

**Figura 5.- Perfiles de actividad frente al pH de la lacasa parental y de las lacasas
30 mutantes.** Las actividades se midieron en buffer Britton y Robinson 100 mM a diferentes valores de pH con 3 mM de DMP (a) o de ABTS (b) como sustratos. La actividad lacasa se normalizó con respecto al valor de pH óptimo y cada punto representa el promedio y la desviación estándar resultado de tres experimentos independientes.

Figura 6.- Visión de conjunto de las mutaciones en la estructura de la lacasa. Se
35 detallan los residuos mutados por evolución. La primera esfera de coordinación del Cu T1

(His394, His455 y Cys450) está señalada con un círculo. El círculo concéntrico discontinuo indica la segunda esfera de coordinación. Los residuos de His de la vía de transferencia electrónica interna desde el Cu T1 al cluster T2/T3 también se resaltan. Las esferas representan iones cobre. El modelo tridimensional está basado en la estructura cristalina de la lacasa de *Trametes trogii* (con un 97% de identidad de secuencia, PDB: 2HRG) (Matera, Gullotto et al. 2008).

Figura 7.- Mutagénesis saturada en la posición 454: (a) mutante 19B12; (b) mutante 18AA10; (c) mutante 17D4; (d) mutante 21D9; (e) mutante 20C3; (f) mutante ChU-B. Las esferas representan iones cobre. También se detallan los residuos de la vía de transferencia electrónica desde el Cu T1 al cluster T2/T3. Los aminoácidos involucrados en la primera esfera de coordinación de los cobres catalíticos y sus interacciones también están representados. La superficie electrostática de la estructura proteica se muestra en el fondo. El modelo tridimensional está basado en la estructura cristalina de la lacasa de *Trametes trogii* (con un 97% de identidad de secuencia, PDB: 2HRG) (Matera, Gullotto et al. 2008).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Generación de mutantes por evolución dirigida y obtención de la lacasa de la invención (mutante ChU-B)

El punto de partida de este estudio fue una lacasa de alto potencial redox (el mutante OB-1) previamente modificada a partir de la lacasa del basidiomiceto PM1 por evolución *in vitro* y diseño racional para ser altamente activa, termoestable y fácilmente secretada por levaduras (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010). Para convertir OB-1 en una lacasa tolerante a la sangre, se diseñó un ensayo de screening basado en la composición de la sangre humana. Como el plasma o la sangre reales no son adecuados para la exploración de librerías de mutantes en el contexto experimental de la evolución dirigida de enzimas, se desarrolló un medio complejo sustituto ("buffer de sangre") con el objetivo de imitar la composición de la sangre humana. Este buffer contenía un sustrato colorimétrico (ABTS) y carecía de células sanguíneas y de factores de coagulación. Además, se realizaron tres re-screenings consecutivos para descartar la selección de falsos positivos. Al igual que todas las lacasas de alto potencial redox, el mutante OB-1 no muestra actividad ni transferencia electrónica interna a pH 7.4 (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010). En consecuencia, en la primera generación el pH del buffer de sangre se estableció en 6.5, lo que resultó en un descenso en la actividad lacasa de más del 90%. En generaciones sucesivas la presión selectiva fue aumentada de manera progresiva hasta alcanzar el valor del pH fisiológico. Además, se aprovechó la elevada frecuencia de recombinación homóloga del ADN, característica de la

maquinaria celular de *Saccharomyces cerevisiae*, para la generación de diversidad genética (Alcalde 2010, Gonzalez-Perez, Garcia-Ruiz et al. 2012). Así, en cada ciclo de evolución se combinaron diferentes métodos de recombinación del ADN (tanto *in vivo* como *in vitro*) para aumentar la complejidad de las librerías de mutantes. El último ciclo de evolución se dedicó a la evaluación en detalle desde un enfoque racional -mediante mutagénesis saturada y mutagénesis dirigida- de varias posiciones que conllevaron aumentos sustanciales en la actividad total (Figura 1, Tabla 2).

Tabla 2. Mutaciones introducidas durante el proceso de evolución dirigida. +, nueva mutación; o, mutación acumulada; ●, mutación introducida por mutagénesis dirigida; ■, mutación introducida por mutagénesis saturada; □, mutación revertida (V452I, GTC/ATC). Las mutación silenciosas están subrayadas; los subíndices indican el uso de codones en *S. cerevisiae*. MAT, mejora de la actividad total en buffer de sangre.

Generación		1G			2G			3G			4G						CNU- B		
Aminoácido	Mutación	35H10	18G5	20H4	2E3	20F1	27C7	14F1	14C5	1B1	7B12	14B1	3A7	19B12	18A10	21D9		17D4	20C3
E(α27)K	AGA/AAA									o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
D(α49)D	GAT ₁₈ /GAC ₂₀	+			o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
I(α66)M	ATA/ATG						+			o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
E(α86)K	GAG/AAG								+										
S135R	AGC/AGG			+															
D205N	GAC/AAC									•									
T218V	ACC/ATC				+														
D363D	GAC ₂₀ /GAT ₁₈	+																	
E380E	GAG ₁₇ /GAA ₄₄						+			o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
A389-	GCC/-...							+											
A389A	GCC ₁₃ /GCG ₄										■								
F396I	TTC/ATC	+			o	o	o	o	o	o	o	■	o	o	o	o	o	o	o
F403F	TTC ₁₈ /TTT ₂₄		+																
T413I	ACG ₃ /ACA ₁₃						+			o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
N426D	AAC/GAC							o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
I452V	ATC/GTC				+		o			o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
F454S	TTC/TCC		+																
F454P	TTC/CCC																		
F454T	TTC/ACG													■					
F454A	TTC/GCG														■				
F454G	TTC/GGC																		
F454R	TTC/CGG																		
F454E	TTC/GAG																		■
A458A	GCT ₅₁ /GCC ₁₃								+										
F460F	TTC ₁₈ /TTT ₂₄								+										
T487S	ACC/AGC																		
MAT (número de veces)		157	101	99	4082	1884	16736	13062	12654	15900	16736	16736	10041	23430	25104	28702	28033	26778	41840
Mutante/OB-1 (parental)		427	n.d.	n.d.	800	500	452	513	622	n.d.	n.d.	n.d.	400	580	857	270	211	377	615
Iso aparente NaCl (mM)		1.3	0.0	0.0	6.2	6.3	8.9	11.4	22.0	4.9	n.d.	n.d.	n.d.	8.5	9.6	8.6	10.3	9.6	17.0
Actividad relativa (%) a pH 7.0		69.5	68.1	65.1	68.0	69.0	68.5	66.8	60.0	n.d.	n.d.	n.d.	68.9	65.7	62.8	61.8	61.8	64.0	63.7
T ₅₀ (°C)																			

Concretamente, se exploraron más de 10000 clones en cuatro ciclos de evolución molecular combinada con métodos mutagénicos y de recombinación *in vivo* (lvAM, barajado *in vivo* del ADN, IVOE) e *in vitro* (PCR propensa a error, StEP mutagénico).

5 En el último ciclo de evolución, la variante final (mutante ChU-B) se obtuvo tras analizar las siguientes posiciones por mutagénesis dirigida o mutagénesis saturada:

- 10 • D205N: esta mutación provocó un desplazamiento del pH óptimo de actividad de la lacasa de *Trametes versicolor* (concretamente, el pH óptimo para el DMP como sustrato aumentó 1.4 unidades) (Madzak, Mimmi et al. 2006). La misma sustitución aminoacídica fue probada en este estudio, dando lugar al mutante 1B1, que presentó un comportamiento similar al de la lacasa de *T. versicolor*: el pH óptimo de actividad con DMP fue 2.0 unidades más básico. Este mutante fue finalmente excluido debido a su bajo valor de MAT y a su escasa actividad con compuestos no fenólicos a pH fisiológico.
- 15 • N426D: esta mutación beneficiosa se descubrió en el mutante 20F1 (2G) pero se perdió debido a la baja probabilidad del entrecruzamiento con la mutación cercana I452V. El cambio N426D se introdujo en el mutante 27C7 (3G) dando lugar a la variante 3A7, la cual presentó una actividad 0.6 veces inferior.
- 20 • Mutagénesis saturada en las posiciones 389, 396 y 454: el residuo Ala389 se deletionó en el tercer ciclo de evolución (mutante 14F1, 3G), dando lugar a un valor de MAT en torno a 3 veces mayor que el del mejor parental de la generación anterior (mutante 2E3). Tras mutagénesis saturada y screening, sólo se descubrieron mutantes con la Ala inicial, lo que indica que a no ser que el residuo sea eliminado, ningún otro aminoácido ejerce un efecto más beneficioso en esta

25 posición. La Phe396 fue objeto de mutagénesis saturada ya que la mutación F396I confirmó la mayor mejora de todo el experimento de evolución (un incremento de 157 veces en el mutante 35H10, 1G). Tras mutagénesis saturada y screening, todas las variantes encontradas presentaron el mismo cambio, confirmando que la Ile396 es el aminoácido más adecuado para esta posición en

30 el contexto del ensayo de screening en buffer de sangre. La mutación F454S fue descubierta en diferentes etapas del proceso de evolución (mutante 18G5 y 20H4, 1G; mutante 14C5, 3G) lo que sugiere que dicho cambio desempeña un papel importante en la tolerancia de la enzima a haluros e hidroxilos. Tras mutagénesis saturada y screening, se detectaron importantes aumentos para diferentes

35 variantes con sustituciones aminoacídicas tanto polares como apolares (F454P/T/A/G/R/E). De este conjunto de variantes, se eligió el mutante ChU-B en base a sus valores de MAT, sus perfiles de actividad frente al pH, su $_{ap}I_{50Cl}$ y su

estabilidad. ChU-B contiene: tres mutaciones en la secuencia pro-líder del factor α (E[α 27]K e I[α 66]M y la mutación silenciosa D[α 49]D), relacionadas con la secreción de la enzima; y cinco mutaciones en la proteína madura (dos mutaciones beneficiosas, F396I y F454E; dos mutaciones silenciosas, E380E y T413T; y una mutación revertida, V452I).

Una vez obtenido el último mutante de la ruta evolutiva (mutante ChU-B), éste mostró un aumento de la actividad total en buffer de sangre de más de 40000 veces respecto al tipo parental.

10

Ejemplo 2. Caracterización de la actividad de la lacasa mutante ChU-B de la invención.

Ejemplo 2.1 Actividad de Chu-B en sangre y plasma humanos.

El comportamiento de la lacasa ChU-B mutante de la invención fue probado en sangre y plasma humanos. Para ello, el consumo de oxígeno en fluidos fisiológicos enriquecidos con ácido ascórbico (un sustrato pobre de las lacasas que se encuentra de forma natural en la sangre) fue monitorizado con un electrodo de Clark, revelando respuestas comparables para plasma y sangre (185 y 127 min^{-1} , respectivamente; Figura 2a). El incremento de 1.5 veces de la actividad de ChU-B en plasma respecto a la registrada en suero sugiere que las células sanguíneas interfieren en el método de detección. De cara a confirmar que la enzima es activa bajo condiciones fisiológicas independientemente del sustrato reductor utilizado, se midió la reducción del oxígeno frente a sustratos típicos de las lacasas (ABTS, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) en buffer de sangre, obteniéndose valores similares para todos los compuestos probados (Figura 2a).

25

Las lacasas contienen cuatro cobres catalíticos organizados en dos sitios diferentes: el sitio de cobre T1, en el que tiene lugar la oxidación del sustrato; y un cluster de cobre trinuclear (con un Cu T2 y dos Cu T3), donde el oxígeno es reducido a agua (Morozova, Shumakovich et al. 2007). Si la lacasa es apropiadamente conectada a un electrodo, esto es, con el Cu T1 orientado hacia la superficie del dispositivo, dicha superficie puede reemplazar al sustrato como donador de electrones, necesarios para la catálisis. La valoración redox del sitio T1 se llevó a cabo a pH fisiológico usando una microcelda espectroelectroquímica con un electrodo capilar de oro (Figura 2b). El mutante ChU-B exhibió un alto potencial redox ($+720 \text{ mV vs. ENH}$) a pH 7.4, cambiando de manera reversible y cíclica desde la forma oxidada a la forma reducida. A fin de verificar que el mutante es electroquímicamente activo bajo condiciones fisiológicas, ChU-B fue adsorbido sobre electrodos de grafito de baja densidad,

35

registrándose la respuesta electrocatalítica de reducción del oxígeno por transferencia electrónica directa a pH 7.4 (Figura 2c). No se detectó respuesta para ninguna de las otras lacasas de alto potencial redox probadas bajo las mismas condiciones.

5 Ejemplo 2.2.- Tolerancia de la lacasa de la invención ChU-B a cambios de pH y concentraciones de iones haluros.

Las propiedades de la lacasa ChU-B fueron investigadas en términos de su actividad frente al pH y de la inhibición por haluros. Los perfiles de actividad frente a compuestos fenólicos (DMP, 2,6-dimetoxifenol) y no fenólicos (ABTS, ácido 2,2'-azino-
10 bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)) revelaron un desplazamiento notable hacia valores más básicos, incluyendo el cambio del pH óptimo de actividad de 4.0 a 5.0-6.0 (Figuras 3a, b; y Figuras 5a,b). A pH 7.0, la lacasa ChU-B retuvo en torno al 50% y al 20% de su actividad para DMP y ABTS respectivamente, mientras que el tipo parental presentó actividad despreciable bajo dichas condiciones. Del mismo modo, la actividad
15 de la lacasa ChU-B a pH 6.0 fue de más del 90% y del 50% para DMP y ABTS respectivamente, mientras que la del parental fue de en torno al 20%. Este drástico aumento de la actividad a pH neutro conllevó un pequeño pero perceptible incremento en la actividad de la lacasa ChU-B a un pH tan básico como es pH 8.0. Esta lacasa constituye la primera lacasa de alto potencial redox activa a pH neutros/alcalinos.
20 Hasta la fecha, sólo la ingeniería de lacasas químéricas había conseguido un ligero desplazamiento del perfil de pH hacia pHs alcalinos, aunque a expensas de la disminución del potencial redox (Cusano, Mekmouche et al. 2009).

Las lacasas de alto potencial redox son típicamente inhibidas por los iones haluro
25 (fluoruro, cloruro y bromuro, pero no yoduro, el cual es sustrato de las lacasas), con una potencia inhibitoria inversamente proporcional al diámetro del anión ($F^- > Cl^- > Br^-$). Este orden es debido a la mayor dificultad que tienen los haluros más voluminosos para acceder a los sitios catalíticos de la enzima (Xu 1996, Xu 1997). La I_{50} obtenida para diferentes haluros (la concentración de haluro a la cual la enzima retiene el 50%
30 de su actividad inicial) fue independiente del sustrato empleado (Tabla 3). La I_{50} de la lacasa ChU-B para cloruro mejoró de 176 a 1025 mM con ABTS como sustrato (Figura 3c), lo que la convierte en la I_{50Cl^-} más alta descrita hasta la fecha para lacasas de alto potencial redox producidas por hongos basidiomicetos. No fue posible medir la inhibición de la lacasa ChU-B por efecto de los iones bromuro, dado que la I_{50} para el
35 parental ya fue superior a 1300 mM, lo cual impidió la medida por sobrepasar el límite de la solubilidad del sustrato en concentraciones salinas tan altas. Como era de esperar, la inhibición en presencia de fluoruro fue muy fuerte (del orden μM), y aunque

la inhibición por fluoruro no era objetivo del estudio de evolución dirigida, la I_{50F^-} aumentó ligeramente (de 70 a 109 μM , Figura 3d). La inhibición por haluros fue también medida a pH fisiológico y la lacasa ChU-B resultó no ser sensible a concentraciones crecientes de cloruro (comprendidas entre 100 y 800 mM) (Figura 3e). La comparación de la lacasa de la invención ChU-B con otras lacasas de alto potencial redox evidenció que, dependiendo del sustrato, la lacasa de la invención ChU-B mutante fue entre 12 y 20 veces menos sensible al fluoruro que las lacasas de alto potencial redox de *Trametes trogii* y *Trametes villosa* (Xu 1996, Garzillo, Colao et al. 1998). De igual manera, la I_{50Cl^-} de la lacasa ChU-B fue entre 26 y 164 veces más alta que dichas lacasas del género *Trametes*. La lacasa del ascomiceto *Botrytis aclada* tiene la I_{50Cl^-} más alta descrita hasta la fecha (1.4 M con DMP como sustrato) (Kittl, Gonaus et al. 2012), aunque su insignificante actividad a pH neutro y su baja estabilidad impiden su uso en biocátodos implantables o en otros procesos ambientales. Además, la comparación de ChU-B con lacasas bacterianas reveló una tolerancia al cloruro 1.5 veces más alta que la de la polifenol oxidasa resistente a haluros de *Marinomonas mediterranea* (Jimenez-Juarez, Roman-Miranda et al. 2005). La tolerancia a haluros del mutante ChU-B es excepcional dado que, por regla general, las lacasas fúngicas son mucho más sensibles a la inhibición por haluros que las lacasas de bajo potencial redox propias de bacterias (Niladevi, Jacob et al. 2008, Singh, Bhalla et al. 2011).

Tabla 3. Valores de I_{50} (en mM) de la lacasa parental (mutante OB-1) y del mutante ChU-B para diferentes haluros. ^aLos experimentos se llevaron a cabo al pH óptimo de oxidación de cada sustrato. ^bn.m., no medible.

Inhibidor	Sustrato	pH ^a	Parental	Mutante ChU-B
NaF	ABTS	4.0	0.070	0.109
	DMP	5.0	0.167	0.183
NaCl	ABTS	4.0	176	1025
	DMP	5.0	208	818
NaBr	DMP	4.0	1306	n.m. ^b

Ejemplo 2.3. Actividad de la lacasa ChU-B en condiciones óptimas y en buffer de sangre.

Se evaluó la velocidad máxima de transformación de sustratos de la lacasa de la invención ChU-B en buffer de sangre. El efecto sinérgico de la mejora de la actividad a pH fisiológico y la fuerte tolerancia a cloruro dio lugar a velocidades iniciales de 427 y 144 mol de sustrato/min/mol de enzima para DMP y ABTS, respectivamente. En idénticas condiciones, el tipo parental apenas mostró actividad. Además, cabe destacar que las velocidades de transformación del mutante ChU-B fueron 3 y 4 veces inferiores a las del parental bajo condiciones óptimas (es decir, pH ácido y en ausencia de inhibidores, Tabla 4).

Tabla 4. Velocidades máximas de transformación (mol sustrato/min/mol enzima) de la lacasa parental (mutante OB-1) y del mutante ChU-B bajo condiciones óptimas y en buffer de sangre. ^apH óptimo de actividad (4.0 y 5.0 para el parental y ChU-B, respectivamente). n.m., no medible.

Sustrato	pH	Parental	Mutante ChU-B
ABTS	3.0	44215 ± 1061	14895 ± 654
	7.4 (buffer de sangre)	n.m.	143 ± 9
DMP	Óptimo ^a	20820 ± 710	4767 ± 216
	7.4 (buffer de sangre)	n.m.	427 ± 32

Ejemplo 3. Análisis detallado de las mutaciones en la estructura de la lacasa ChU-B

Teniendo en cuenta que la inhibición por haluros e hidroxilos se presupone que tiene lugar en el cluster trinuclear T2/T3, interrumpiendo la transferencia electrónica interna, era de esperar que las mutaciones aparecidas durante el proceso evolutivo estuvieran situadas en los alrededores del cluster T2/T3, o en cualquier de los dos canales de la enzima, bien en el de entrada del oxígeno o en el de salida del agua (Xu, Berka et al. 1998, Matera, Gullotto et al. 2008). Sin embargo, las dos mutaciones introducidas en la proteína madura (F396I y F454E) se localizaron en la segunda esfera de coordinación del sitio T1 (Figura 4). En realidad, la mayoría de las mutaciones descubiertas durante el proceso evolutivo están localizadas en dicha región (a una distancia promedio del

sitio T1 de 7.5 angstrom), indicando que esta zona influye de manera significativa en la inhibición de la actividad lacasa por iones haluro e hidroxilo (Figura 6, Tabla 5).

Tabla 5. Mutaciones introducidas en la lacasa madura a lo largo del proceso evolutivo.

5

^aMutaciones presentes en el mutante final ChU-B.

Mutación	Distancia al Cu T1 (Å)	Distancia al Cu T2 (Å)	Distancia al Cu T3a-Cu T3b (Å)	Dominio	Motivo de estructura secundaria
I452V	4.8	12.4	9.6	III	Loop (H451-I452)
F454E ^a	7.6	15.8	12.2	III	Hélice α (D453-A458)
F396I ^a	7.6	9.9	9.0	III	Lámina β (P395-L398)
A389-	7.7	21.4	18.4	III	Loop (L383-H394)
N426D	9.3	14.5	13.7	III	Lámina β (V424-N426)
D205N	7.8	15.2	11.8	II	Loop (L202-N207)

La mutación F396I fue descubierta en la primera generación, siendo responsable del mayor aumento en la actividad de todo el proceso evolutivo (157 veces respecto al tipo parental). La exploración de esta posición por mutagénesis saturada no dio lugar a más mejoras (Figura 1). La Phe396, altamente conservada en las lacasas de alto potencial redox, desempeña un papel fundamental en el valor del potencial redox del sitio T1, y por consiguiente, en la catálisis de este grupo de lacasas (Matera, Gullotto et al. 2008). Este aminoácido actúa como un puente que conecta el Cu T1 y el cluster T2/T3 vía la Pro395 (contigua a la His394, ligando del Cu T1) y la His397, que coordina el Cu T2 (Figura. 4). La mutación F454E apareció al someter la posición 454 a mutagénesis saturada y al posterior screening, dado que varios mutantes descubiertos en el primer y en el tercer ciclo ya presentaron un cambio en dicha posición (Figura 1 y Figura 7). Se seleccionaron seis mutantes diferentes con sustituciones F454P/T/A/G/R/E, las cuales aumentaron la actividad en buffer de sangre hasta 2.5 veces. La mutación F454E está contigua a la His455, ligando del Cu

20

T1. El análisis del modelo estructural reveló que esta mutación parece establecer un nuevo enlace de hidrógeno con uno de los átomos de nitrógeno del anillo de imidazol de la His455 (Figura 4). En general, se acepta que la transferencia electrónica desde el sustrato al Cu T1 es el paso limitante en la catálisis de las lacasas (Gianfreda, Xu et al. 1999, Alcalde 2007). La modificación de la segunda esfera de coordinación del Cu T1 reduce la actividad a pH ácido, probablemente debido al ajuste de la transferencia electrónica interna desde el sitio T1 al cluster T2/T3, que simultáneamente compensa la inhibición del Cu T2 haciendo que ChU-B mantenga la actividad en presencia de haluros e hidroxilos. Estos resultados concuerdan con estudios preliminares de una lacasa de bajo potencial redox producida por un ascomiceto que fue sometida a estudios de mutagénesis dirigida en la zona del sitio T1 (Xu, Berka et al. 1998).

Material y métodos

Todos los reactivos químicos fueron de la pureza más alta disponible en el mercado. Los oligonucleótidos cebadores utilizados a lo largo del proceso evolutivo (Tabla 6) fueron comprados a Isogen Life Science (De Meern, Países Bajos). Los medios de cultivo fueron preparados como se describió anteriormente (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010).

Tabla 6. Oligonucleótidos cebadores utilizados. Los codones sometidos a mutagénesis aparecen en negrita, donde N es A/T/G/C y S es G/C.

Oligonucleótido cebador	Secuencia	Sitio de anillamiento (pb) en el vector pJRoC30
RMLN forward	5'-CCTCTATACTTTAACGTCAAGG-3'	5'-420-441-3'
RMLC reverse	5'-GGGAGGGCGTGAATGTAAGC-3'	5'-2288-2307-3'
D205N forward	5'- CTGGTGTCTGCTGTCATGCA ACCCGAATTACACGTT CAGC-3'	5'-1337-1375-3'
D205N reverse	5'- GCTGAACGTGTAATTCGG GTTGCATGACAGCGACA CCAG-3'	5'-1337-1375-3'
N426D forward	5'- GTCTACCGCGACGTCGTC GACACGGGCTCGCCCG GGGAC-3'	5'-2000-2038-3'
N426D reverse	5'- GTCCCCGGGCGAGCCCGT GTCGACGACGTCGCGG TAGAC-3'	5'-2000-2038-3'
SAT389 forward	5'- CTCCCCGCCACCTCCG CNNS CCCGGCTTCCCGC	5'-1889-1924-3'

	AC-3'	
SAT389 reverse	5'- GTGCGGGAAGCCGGG SN NGGCGGAGGTGGCGGG GAG-3'	5'-1889- 1924-3'
SAT396 forward	5'- CCCGGCTTCCCGCACCC NN SCACTTGCACGGGC ACACC-3'	5'-1910- 1948-3'
SAT396 reverse	5'- GGTGTGCCCGTGCAAGT GS NNGGGGTGCGGGAAG CCGGG-3'	5'-1910- 1948-3'
SAT454 forward	5'- CTCCACTGCCACGTCGAC NN SCACCTTGAGGCTGG GTTC-3'	5'-2084- 2122-3'
SAT454 reverse	5'- GAACCCAGCCTCAAGGT GS NNGTGACGTGGCAG TGGAG-3'	5'-2084- 2122-3'

Evolución dirigida

En cada generación, los fragmentos de PCR fueron limpiados, concentrados y cargados en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad, Hercules, CA), y purificados utilizando el kit Zymoclean gel DNA recovery (Zymo Research, Orange, CA). Los productos de PCR fueron clonados bajo el control del promotor GAL1 del vector de expresión lanzadera (donado por la Prof. F. H. Arnold del Instituto Tecnológico de California, Caltech, Pasadena, CA), reemplazando el gen parental en pJRoC30. Para eliminar el gen parental, el plásmido pJRoC30 fue linealizado con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I (New England Biolabs, Hertfordshire, UK), y el plásmido lineal fue concentrado y purificado como ya se ha descrito para los fragmentos de PCR.

Primera generación: IvAM

Utilizando el mutante OB-1 como parental (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010), se construyó una librería de más de 3000 clones mediante ensamblaje *in vivo* de librerías de mutantes con diferentes espectros mutacionales (IvAM) (Zumarraga, Camarero et al. 2008). Se llevaron a cabo reacciones de PCR mutagénicas con *Taq*/MnCl₂ (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y con Mutazima II (kit Genemorph II Random mutagenesis, CA, EE.UU.) en un termociclador de gradiente (Mycycler, Bio-Rad) utilizando los siguientes parámetros: 95°C durante 2 min (1 ciclo); 94°C durante 0.75 min, 53°C durante 0.75 min, 74°C durante 3 min (28 ciclos); 74°C durante 10 min (1 ciclo). La amplificación con *Taq*/MnCl₂ se realizó añadiendo 90 nM de RMLN, 90 nM de RMLC, 0.1 ng/μL de ADN molde, 0.3 mM de dNTPs (0.075 mM de cada uno), 3% de DMSO, 1.5 mM de MgCl₂, 0.01 mM de MnCl₂ y 0.05 U/μL de *Taq* polimerasa en 50 μL de

reacción. La amplificación con Mutazima II se llevó a cabo con 372 nM de RMLN, 372 nM de RMLC, 40 ng/μL de ADN molde, 0.8 mM de dNTPs (0.2 mM de cada uno), 3% de DMSO y 0.05 U/μL de Mutazima II por 50 μL de reacción. Bajo tales condiciones, las tasas mutacionales de *Taq/MnCl₂* y Mutazima II fueron 0-3 y 4.5-9 mutaciones por 5 1 kb, respectivamente. Para promover la ligación *in vivo*, se diseñaron regiones de solapamiento con 40 y 66 pb de homología con ambos extremos del vector linealizado. Las dos librerías fueron mezcladas en cantidades equimolares y transformadas junto con el vector linealizado (ratio vector:librería 1:4) en células competentes de *S. cerevisiae* de la cepa deficiente en proteasas BJ5465 (LGC 10 Promochem, Barcelona, España) utilizando el kit de transformación en levadura (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Las células transformadas se extendieron en placas de SC drop-out y se incubaron durante 3 días a 30°C. A continuación, se picaron las colonias y se sometieron al ensayo de screening y a los tres re-screenings consecutivos que se describen a continuación.

15

Segunda generación: PCR propensa a error + IvAM

Empleando el mutante 35H10 de la primera generación como parental, se construyeron tres librerías de mutantes (de ~700 clones cada una) y éstas se exploraron de manera independiente. La primera librería se preparó con *Taq/MnCl₂*, la 20 segunda con Mutazima II y la tercera con IvAM empleando las condiciones descritas para la primera generación.

Tercera generación: StEP mutagénico y barajado *in vivo* del ADN

Se crearon y exploraron dos librerías independientes utilizando los dos mejores 25 mutantes del segundo ciclo, 2E3 y 20F1, como genes parentales. Para la primera librería, los parentales se sometieron de forma independiente a una reacción de PCR mutagénica con *Taq/MnCl₂* y los productos mutagénicos se barajaron *in vivo* en *S. cerevisiae*. La segunda librería se preparó por recombinación *in vitro* mediante StEP (Staggered Extension Process) (Zhao, Giver et al. 1998). La PCR del StEP (con 50 μL 30 de volumen final) contenía 0.5 μM de RMLN, 0.5 μM de RMLC, 0.1 ng/μL de ADN molde, 0.8 mM de dNTPs (0.2 mM de cada uno), 3% de DMSO, 1 mM de MgCl₂, 0.01 mM MnCl₂ y 0.02 U/μL de la ADN polimerasa de alta fidelidad iProof (Bio-Rad). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95°C durante 2 min (1 ciclo); 94°C durante 0.5 min, 55°C durante 0.33 min (90 ciclos). La banda electroforética de ~2 kb 35 resultado de la PCR se purificó y se utilizó como molde para una PCR mutagénica con Mutazima II. El producto mutagénico se barajó *in vivo* como se describió anteriormente.

Cuarta generación: estudios de mutagénesis dirigida y mutagénesis saturada

Se construyeron tres librerías de mutagénesis saturada así como dos mutantes con una mutación específica mediante extensión por solapamiento *in vivo* (IVOE, *In Vivo* Overlap Extension) (Alcalde 2010) empleando el mutante 27C7 como parental. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la polimerasa iProof.

Mutante D205N: Los oligonucleótidos cebadores para la PCR 1 fueron RMLN y D205N-REV y para la PCR2 fueron D205N-FOR y RMLC.

Mutante N426D: Los oligonucleótidos cebadores para la PCR 1 fueron RMLN y N426D-REV y para la PCR2 fueron N426D-FOR y RMLC.

Mutagénesis saturada en la posición 389: Los oligonucleótidos cebadores para la PCR 1 fueron RMLN y SAT389-REV y para la PCR2 fueron SAT389-FOR y RMLC.

Mutagénesis saturada en la posición 454: Los oligonucleótidos cebadores para la PCR 1 fueron RMLN y SAT454-REV y para la PCR2 fueron SAT454-FOR y RMLC.

Ensayo de screening high-throughput

Las librerías de mutantes se exploraron en un medio (buffer de sangre) que contenía el sustrato colorimétrico ABTS y que simulaba la composición de la sangre humana, salvo por la ausencia de agentes coagulantes y de células sanguíneas. La composición del buffer de sangre fue: 150 mM de NaCl, 18 mM de NaHCO₃, 1 mg/mL de glucosa, 4.3 mM de urea, 0.87 mM de MgSO₄, 0.4 mM de fructosa, 0.1 mM de L-cisteína y 4.29 mM de ABTS en 100 mM de buffer fosfato sódico. El pH del buffer de sangre se estableció en 6.5 en la primera generación y se aumentó gradualmente a lo largo de la evolución hasta alcanzar el pH fisiológico (7.4) en la cuarta generación. El protocolo de screening-HTP utilizado fue el descrito anteriormente (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010) con algunas modificaciones, descritas a continuación. Se picaron colonias individuales y se cultivaron en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) conteniendo 50 µL de medio mínimo por pocillo. En cada placa, la columna 6 se inoculó con el tipo parental y un pocillo se dejó sin inocular (pocillo H1 – control negativo). Las placas se sellaron para evitar evaporación y se incubaron a 30°C y 80% de humedad relativa en un agitador a 225 rpm (Minitron-INFORS, Biogen, España). Tras 48 h, se añadieron 160 µL de medio de expresión de lacasa (CuSO₄ 2 mM y etanol 25 g/L de concentraciones finales) por pocillo y las placas se incubaron durante 24 h. A continuación, las placas (placas madre) se centrifugaron (centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania) durante 5 min a 3000 x g a 4°C y se transfirieron 60 µL de sobrenadante desde la placa madre a una placa réplica con ayuda de un robot (robot manipulador de líquidos Quadra, 96-320, Tomtec, Hamden,

CT). Se añadieron 140 μL de buffer de sangre (a pH 6.5 en el primer ciclo, pH 7.0 en el segundo y tercer ciclo, y pH 7.4 en el cuarto) a las placas réplica, y tras agitarlas brevemente y permitir la oxidación del sustrato en buffer de sangre, se midió la absorbancia a 418 nm ($\epsilon_{\text{ABTS}^{\bullet+}} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un lector de placas (SpectraMax Plus384, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente hasta que se desarrolló color verde y la absorbancia se midió de nuevo. Las actividades relativas fueron calculadas como la diferencia de absorción antes y después de la incubación y normalizadas respecto al tipo parental usado como referencia en la correspondiente generación (los parentales de referencia fueron los siguientes: 1G, OB-1; 2G, 35H10; 3G, 2E3; 4G, 27C7). Para descartar falsos positivos, se llevaron a cabo dos re-screenings consecutivos de acuerdo con nuestro protocolo ya descrito (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010) con la modificación de emplear el buffer de sangre conteniendo 4.29 mM de ABTS para la medida de la actividad total lacasa, pero utilizando el ensayo con buffer de sangre explicado anteriormente. Adicionalmente, se introdujo un tercer re-screening con el fin de desglosar las mejoras detectadas en términos de actividad frente al pH, tolerancia a iones cloruro y termoestabilidad.

Producción y purificación de lacasas

Las variantes de lacasa se produjeron y purificaron a homogeneidad como se describió anteriormente (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010). Además, para los estudios electroquímicos, se llevó a cabo la sobreproducción de los mutantes en la levadura *Pichia pastoris*, tras su clonación en el vector pPICZ α A bajo el control del promotor inducible por metanol AOX1 (*Pichia* expression kit, Life Technologies, Carlsbad, CA).

Medida de la actividad lacasa en plasma y sangre humanos

La sangre humana se recogió en tubos para extracción de sangre BD Vacutainer® (Plymoth, Reino Unido). Las muestras sanguíneas se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm para obtener el plasma, extrayéndose el sobrenadante cuidadosamente y descartándose el pellet. Tanto el plasma como la sangre se suplementaron con 10 mM de ácido ascórbico (sustrato reductor) y el pH se ajustó a 7.4. La actividad del mutante ChU-B en ambos fluidos fisiológicos se determinó mediante la medida del consumo de oxígeno en disolución utilizando un electrodo de Clark. Estos experimentos se llevaron a cabo usando el sistema Oxygraph (Hansatech Instruments, King's Lynn, Reino Unido) y teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción: una molécula de oxígeno es reducida por la oxidación de cuatro moléculas de sustrato. La actividad del

mutante ChU-B fue también medida en buffer de sangre empleando el mismo protocolo descrito arriba y los siguientes sustratos: ferrocianuro potásico, $K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mM de concentración final); ABTS (5 mM de concentración final); y ácido ascórbico (10 mM de concentración final).

5

Caracterización bioquímica

Determinación de las velocidades máximas de transformación en buffer de sangre: Las velocidades de transformación se determinaron en buffer de sangre (pH 7.4) para ABTS y DMP. La reacción se inició tras la adición de la enzima (4.7 y 22.7 nM utilizando ABTS y DMP como sustrato reductor, respectivamente) a la mezcla de ensayo (1.3 mM de ABTS ó 2.8 mM de DMP en buffer de sangre). Todas las medidas se hicieron por triplicado.

Perfiles de actividad frente al pH: Los perfiles de pH se determinaron dentro del rango de pH entre 2.0 y 9.0 como se describió anteriormente (Camarero, Pardo et al. 2012).

Inhibición por haluros (determinación de la I_{50}): El efecto inhibitor del fluoruro, cloruro y bromuro se midió utilizando los sustratos ABTS y DMP a sus correspondientes valores de pH óptimo (en buffer acetato sódico 100 mM pH 4.0 para ABTS y en buffer tartrato sódico 100 mM pH 5.0 para DMP) así como a pH fisiológico (en buffer fosfato sódico 100 mM pH 7.4). Se determinó la inhibición mediante el valor de I_{50} (definida como la concentración de haluro a la cual la enzima retiene el 50% de su actividad inicial), ya que la complejidad de los puntos dificultaron el cálculo de la constante de inhibición (K_i). La mezcla de ensayo contenía 2.4 mM de ABTS ó DMP, haluro en concentraciones comprendidas entre 0 y 1100 mM, y lacasa pura (0.2 y 1.7 nM para ABTS y DMP, respectivamente). Cada punto de los datos del gráfico representa el valor promedio de tres experimentos independientes.

Termoestabilidad (determinación de T_{50}): La termoestabilidad de las distintas lacasas mutante se estimó mediante la determinación de sus valores de T_{50} como se reportó en un trabajo anterior (García-Ruiz, Mate et al. 2010).

Estudios espectroelectroquímicos

Determinación del potencial redox: La valoración redox de los mutantes de lacasa se llevó a cabo como se describió anteriormente para el parental OB-1 (Mate, García-Ruiz et al. 2013) con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizó una celda micro-espectroelectroquímica conteniendo un electro capilar de oro y controlándose el

potencial mediante un potenciostato de tres electrodos BAS LC-3E (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, EE.UU.), con un electrodo de Ag | AgCl | KCl (+210 mV vs ENH) como electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo. Los espectros de absorbancia se registraron en un espectrómetro de alta resolución
5 HR4000 con un rango de medida entre 200 y 1100 nm utilizando una lámpara DH-2000, ambos de Ocean Optics (Dunedin, FL, EE.UU.) El potencial redox del sitio T1 de la enzima se determinó por valoración redox mediada (VRM) empleándose el equipo antes descrito. La VRM se llevó a cabo mediante un complejo sistema de mediadores formado por tres mediadores redox diferentes: $K_4[Fe(CN)_6]$ y $K_4[Mo(CN)_6]$ con
10 potenciales redox formales de +430 mV y +780 mV vs ENH, respectivamente, y $K_4[W(CN)_6]$ con un potencial redox formal de +520 mV vs ENH y que fue sintetizado como se describió anteriormente (Leipoldt, Bok et al. 1974) . Todos los experimentos se realizaron en buffer fosfato sódico 50 mM pH 7.4.

15 Medidas electroquímicas: Las medias electroquímicas se llevaron a cabo con un analizador Autolab PGSTAT30 controlado por el software GPES 4.9 (Eco Chemie, Países Bajos). Los experimentos se realizaron en una celda de vidrio para tres electrodos empleando un electrodo de Ag | AgCl | KCl como electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo. Los electrodos de grafito de baja
20 densidad se pulieron con papel de lija y se sonicaron. Se depositó una gota de 5 μ L de lacasa (13 mg/mL) en un electrodo de grafito de baja densidad limpio y tras esperar 20 min para permitir la adsorción de la enzima en la superficie del electrodo, éste se sumergió en la celda electroquímica, la cual fue burbujeada con oxígeno gaseoso a 1 atm de presión durante 15 min. Para las medidas electrocatalíticas, las densidades de
25 corriente se recalcularon en función del área geométrica de los electrodos y los potenciales se recalcularon en base al potencial del ENH. Los voltamogramas cíclicos fueron registrados entre +1100 mV y +210 mV vs ENH utilizando una velocidad de barrido de 10 mV/s.

30 **Modelos tridimensionales**

Los modelos estructurales de la lacasa parental y de las lacasas evolucionadas se generaron y analizaron como se describió anteriormente (Mate, Garcia-Burgos et al. 2010).

35

REFERENCIAS

- Alcalde, M. (2007). Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications. Industrial Enzymes. J. Polaina and A. MacCabe, Springer Netherlands: 461-476.
- Alcalde, M. (2010). "Mutagenesis protocols in *Saccharomyces cerevisiae* by in vivo overlap extension." *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 634: 3-14.
- Alcalde, M., M. Ferrer, F. J. Plou and A. Ballesteros (2006). "Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes." *Trends in Biotechnology* 24(6): 281-287.
- Bullen, R. A., T. C. Arnot, J. B. Lakeman and F. C. Walsh (2006). "Biofuel cells and their development." *Biosens Bioelectron* 21(11): 2015-2045.
- Camarero, S., I. Pardo, A. I. Canas, P. Molina, E. Record, A. T. Martinez, M. J. Martinez and M. Alcalde (2012). "Engineering Platforms for Directed Evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*." *Applied and Environmental Microbiology* 78(5): 1370-1384.
- Castillo, J., S. Gaspar, S. Leth, M. Niculescu, A. Mortari, I. Bontidean, V. Soukharev, S. A. Dorneanu, A. D. Ryabov and E. Csoregi (2004). "Biosensors for life quality - Design, development and applications." *Sensors and Actuators B-Chemical* 102(2): 179-194.
- Cusano, A. M., Y. Mekmouche, E. Meglecz and T. Tron (2009). "Plasticity of laccase generated by homeologous recombination in yeast." *FEBS J* 276(19): 5471-5480.
- Garcia-Ruiz, E., D. Mate, A. Ballesteros, A. T. Martinez and M. Alcalde (2010). "Evolving thermostability in mutant libraries of ligninolytic oxidoreductases expressed in yeast." *Microbial Cell Factories* 9.
- Garzillo, A. M., M. C. Colao, C. Caruso, C. Caporale, D. Celletti and V. Buonocore (1998). "Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*." *Appl Microbiol Biotechnol* 49(5): 545-551.
- Gianfreda, L., F. Xu and J.-M. Bollag (1999). "Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes." *Bioremediation Journal* 3(1): 1-26.
- Gonzalez-Perez, D., E. Garcia-Ruiz and M. Alcalde (2012). "*Saccharomyces cerevisiae* in directed evolution: An efficient tool to improve enzymes." *Bioengineered bugs* 3(3): 172-177.
- Jimenez-Juarez, N., R. Roman-Miranda, A. Baeza, A. Sanchez-Amat, R. Vazquez-Duhalt and B. Valderrama (2005). "Alkali and halide-resistant catalysis by the multipotent oxidase from *Marinomonas mediterranea*." *J Biotechnol* 117(1): 73-82.
- Kittl, R., C. Gonaus, C. Pillei, D. Haltrich and R. Ludwig (2012). "Constitutive expression of *Botrytis aclada* laccase in *Pichia pastoris*." *Bioengineered* 3(4): 232-235.

- Kunamneni, A., S. Camarero, C. Garcia-Burgos, F. J. Plou, A. Ballesteros and M. Alcalde (2008). "Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis." *Microbial Cell Factories* 7.
- Leipoldt, J. G., L. D. C. Bok and P. J. Cilliers (1974). "Preparation of Potassium Octacyanotungstate(IV)Dihydrate." *Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie* 407(3): 350-352.
- 5 Madzak, C., M. C. Mimmi, E. Caminade, A. Brault, S. Baumberger, P. Briozzo, C. Mouglin and C. Jolivald (2006). "Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis." *Protein Eng Des Sel* 19(2): 77-84.
- 10 Martinez, A. T., F. J. Ruiz-Duenas, M. J. Martinez, J. C. Del Rio and A. Gutierrez (2009). "Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill." *Curr Opin Biotechnol* 20(3): 348-357.
- Mate, D., C. Garcia-Burgos, E. Garcia-Ruiz, A. O. Ballesteros, S. Camarero and M. Alcalde (2010). "Laboratory Evolution of High-Redox Potential Laccases." *Chemistry & Biology* 17(9): 1030-1041.
- 15 Mate, D., E. Garcia-Ruiz, S. Camarero and M. Alcalde (2011). "Directed Evolution of Fungal Laccases." *Current Genomics* 12(2): 113-122.
- Mate, D. M., E. Garcia-Ruiz, S. Camarero, V. V. Shubin, M. Falk, S. Shleev, A. O. Ballesteros and M. Alcalde (2013). "Switching from blue to yellow: altering the spectral properties of a high redox potential laccase by directed evolution." *Biocatalysis and Biotransformation* 31(1): 8-21.
- 20 Matera, I., A. Gullotto, S. Tilli, M. Ferraroni, A. Scozzafava and F. Briganti (2008). "Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate." *Inorganica Chimica Acta* 361(14-15): 4129-4137.
- 25 Morozova, O. V., G. P. Shumakovich, M. A. Gorbacheva, S. V. Shleev and A. I. Yaropolov (2007). "'Blue' laccases." *Biochemistry (Mosc)* 72(10): 1136-1150.
- Niladevi, K. N., N. Jacob and P. Prema (2008). "Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and characterization." *Process Biochemistry* 43(6): 654-660.
- 30 Rodgers, C. J., C. F. Blanford, S. R. Giddens, P. Skamnioti, F. A. Armstrong and S. J. Gurr (2010). "Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?" *Trends Biotechnol* 28(2): 63-72.
- Rodriguez Couto, S. and J. L. Toca Herrera (2006). "Industrial and biotechnological applications of laccases: a review." *Biotechnol Adv* 24(5): 500-513.
- 35 Shleev, S. and T. Ruzgas (2008). "Transistor-Like Behavior of a Fungal Laccase." *Angewandte Chemie International Edition* 47(38): 7270-7274.

- Singh, G., A. Bhalla, P. Kaur, N. Capalash and P. Sharma (2011). "Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 10(4): 309-326.
- Witayakran, S. and A. J. Ragauskas (2009). "Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry." *Advanced Synthesis & Catalysis* 351(9): 1187-1209.
- 5 Xu, F. (1996). "Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition." *Biochemistry* 35(23): 7608-7614.
- Xu, F. (1997). "Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases." *J Biol Chem* 272(2): 924-928.
- 10 Xu, F., R. M. Berka, J. A. Wahleithner, B. A. Nelson, J. R. Shuster, S. H. Brown, A. E. Palmer and E. I. Solomon (1998). "Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile." *Biochem J* 334 (Pt 1): 63-70.
- Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter and F. H. Arnold (1998). "Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination." *Nat Biotechnol* 16(3): 258-261.
- 15 Zumarraga, M., S. Camarero, S. Shleev, A. Martinez-Arias, A. Ballesteros, F. J. Plou and M. Alcalde (2008). "Altering the laccase functionality by in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra." *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 71(1): 250-260.
- 20

REIVINDICACIONES

- 1.- Polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad lacasa activo a condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o que presenta actividad en sangre y plasma humano, caracterizado porque la secuencia aminoacídica del polipéptido que codifica presenta una identidad de al menos un 50% con la SEQ ID NO: 2 (OB-1), y porque comprende al menos una alteración aminoacídica en la posición homóloga a la posición 487 de dicha secuencia, que sustituye el aminoácido fenilalanina (F) original por el aminoácido isoleucina (I) (mutación F396I).
- 2.- Polinucleótido según la reivindicación 1, caracterizado por que su secuencia aminoacídica posee además una de las siguientes mutaciones adicionales o cualesquiera de sus combinaciones:
- a) La sustitución del aminoácido serina (S) por el aminoácido arginina (R) en la posición homóloga a la posición 226 de SEQ ID NO 2 (S135R),
 - b) La sustitución del aminoácido ácido aspártico (D) por el aminoácido asparagina (N) en la posición homóloga a la posición 296 de SEQ ID NO 2 (D205N),
 - c) La sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 309 de SEQ ID NO 2 (T218V),
 - d) La delección del aminoácido alanina (A) en la posición homóloga a la posición 480 de SEQ ID NO 2 (A389-),
 - e) La sustitución del aminoácido asparagina (N) por el aminoácido ácido aspártico (D) en la posición homóloga a la posición 517 de SEQ ID NO 2 (N426D),
 - f) La sustitución del aminoácido isoleucina (I) por el aminoácido valina (V) en la posición homóloga a la posición 543 de SEQ ID NO 2 (I452V),
 - g) La sustitución del aminoácido fenilalanina (F) por un aminoácido que se escoge de entre los siguientes: serina (S), prolina (P), treonina (T), alanina (A), glicina (G), arginina (R) o glutámico (E), en la posición homóloga a la posición 545 de SEQ ID NO 2 (F454S, F454P, F454T, F454A, F454G, F454R, F454E, respectivamente), y
 - h) La sustitución del aminoácido treonina (T) por el aminoácido serina (S) en la posición homóloga a la posición 578 de SEQ ID NO 2 (T487S).
- 3.- Polinucleótido según la reivindicación 1 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la SEQ ID NO 3.

- 4.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 5.
- 5 5.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 7.
- 6.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 9.
- 10 7.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 11.
- 8.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 13.
- 15 9.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 15.
- 20 10.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 17.
- 11.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 19.
- 25 12.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 21.
- 13.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 23.
- 30 14.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 25.
- 35 15.- Polinucleótido según las reivindicaciones 1 y 3 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 27.

- 5 16.- Polipéptido con actividad lacasa activa en condiciones electrofisiológicas, en pHs neutros/alcalinos, resistente a elevadas concentraciones de haluros y/o activa en sangre y plasma humano caracterizado por que es codificado por alguna de las secuencias nucleotídicas según las reivindicaciones 1 a 15.
- 10 17.- Polipéptido según la reivindicación 16 caracterizado por que su secuencia se corresponde con alguna de las siguientes: SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 22, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 28.
- 18.- Polipéptido según la reivindicación 16 caracterizado por que su secuencia se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 10.
- 15 19.- Método de obtención del polipéptido según las reivindicaciones 16 a la 18 caracterizado por comprender las siguientes etapas:
- a. Introducir un vector con el polinucleótido según una de las reivindicaciones 1 a la 15 en una célula hospedadora adecuada,
 - b. Cultivar la célula hospedadora en un medio adecuado, y,
 - 20 c. Purificar el polipéptido con actividad lacasa.
- 25 20.- Célula hospedadora caracterizada por que comprende el polinucleótido según las reivindicaciones 1 a la 15 y es capaz de producir el polipéptido según las reivindicaciones 16 a la 18.
- 21.- La célula hospedadora según la reivindicación 20 caracterizada por ser una levadura.
- 22.- La célula hospedadora según la reivindicación 21 caracterizada por pertenecer al género *Saccharomyces* sp. o *Pichia* sp, particularmente, las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*.
- 30 23.- El uso de la célula hospedadora según las reivindicaciones 20 a la 22 en procesos de biorremediación y degradación de residuos.
- 35 24.- Uso del polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18 en procesos de biorremediación.

25.- Uso del polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18 en procesos de bioblanqueo de pastas kraft.

5 26.- Uso del polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18 en síntesis orgánica.

27.- Kit de diagnóstico biomédico para la detección de metabolitos y medición de su concentración en diferentes muestras biológicas caracterizado por que comprende un polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18.

10

28.- Uso del polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18 en la elaboración de dispositivos bioelectrónicos que contienen enzimas inmovilizadas.

15

29.- Dispositivo bioelectrónico según la reivindicación 28 caracterizado por que comprende el polipéptido según las reivindicaciones 16 a 18.

30.- Uso del dispositivo bioelectrónico según la reivindicación 29 para la elaboración de una composición farmacéutica de diagnóstico biomédico *in vivo*.

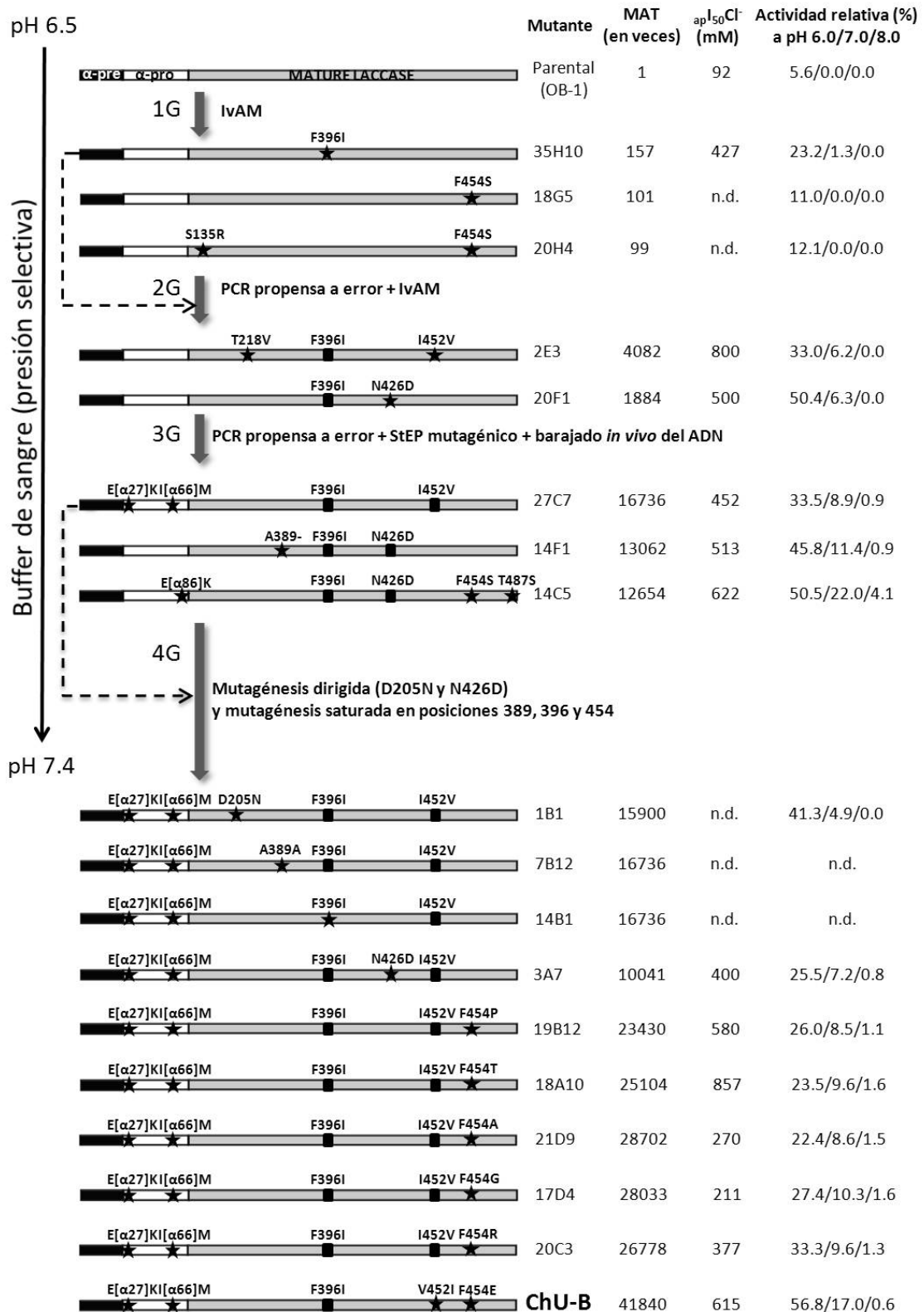


Fig. 1

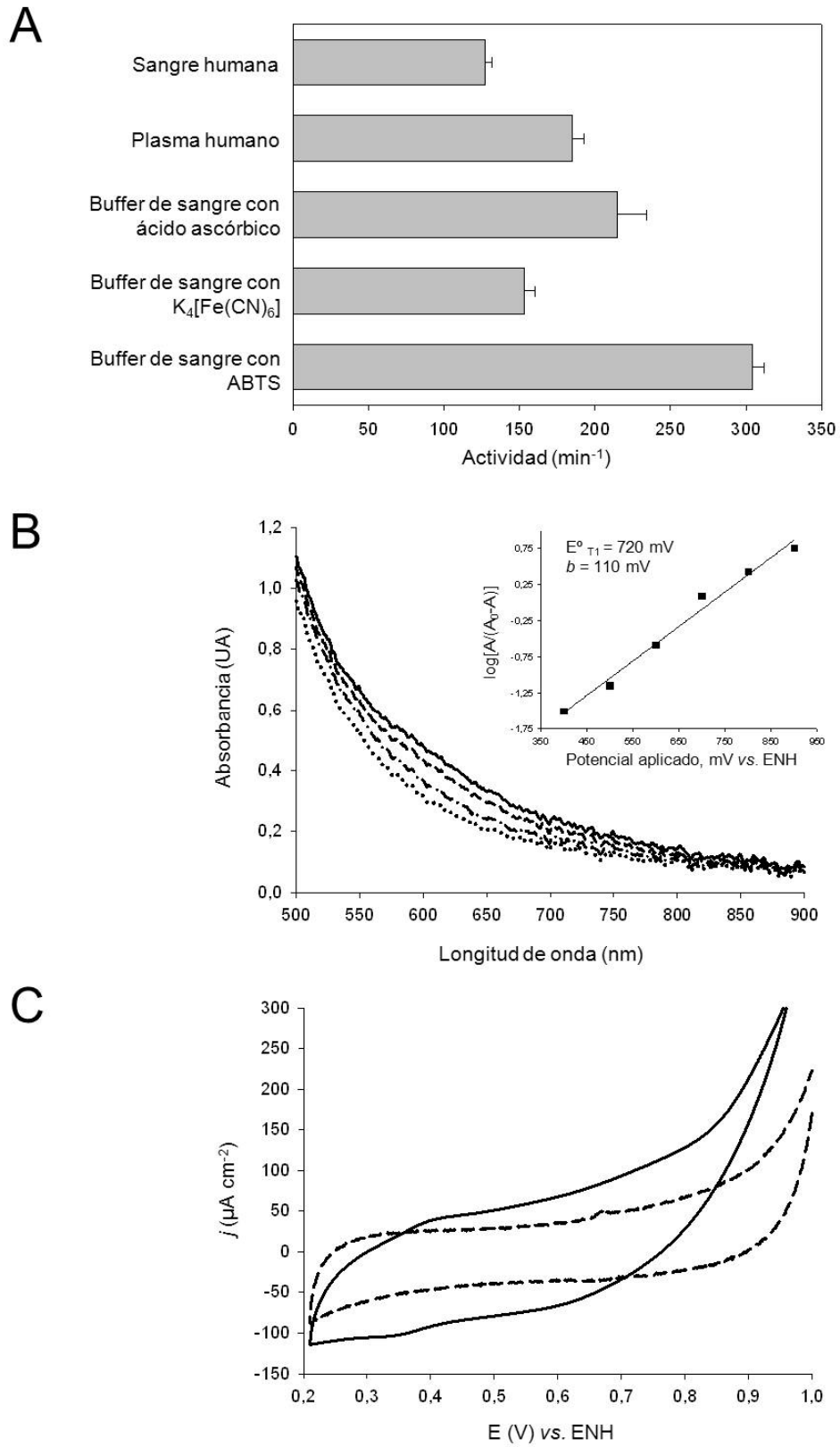


Fig. 2

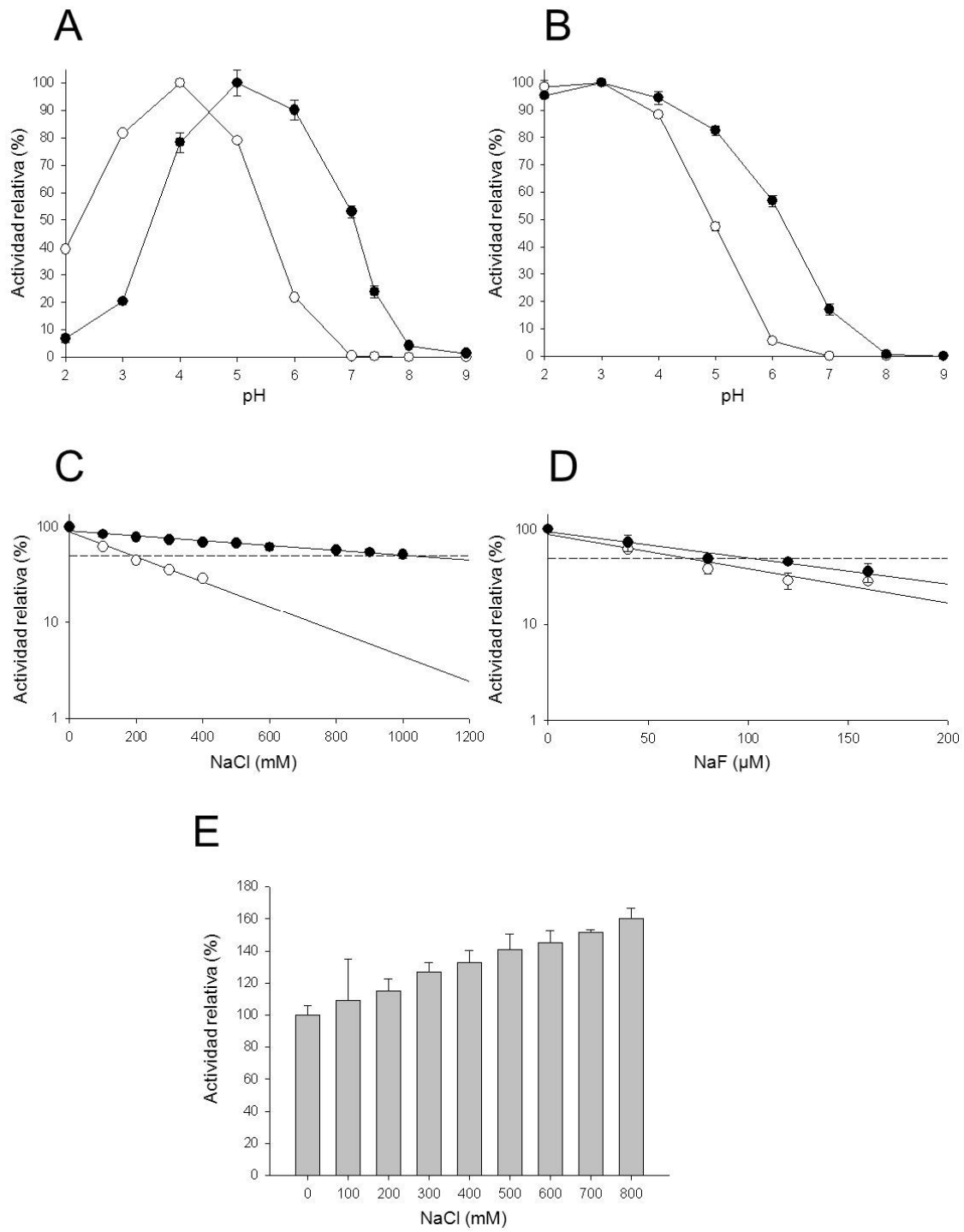


Fig. 3

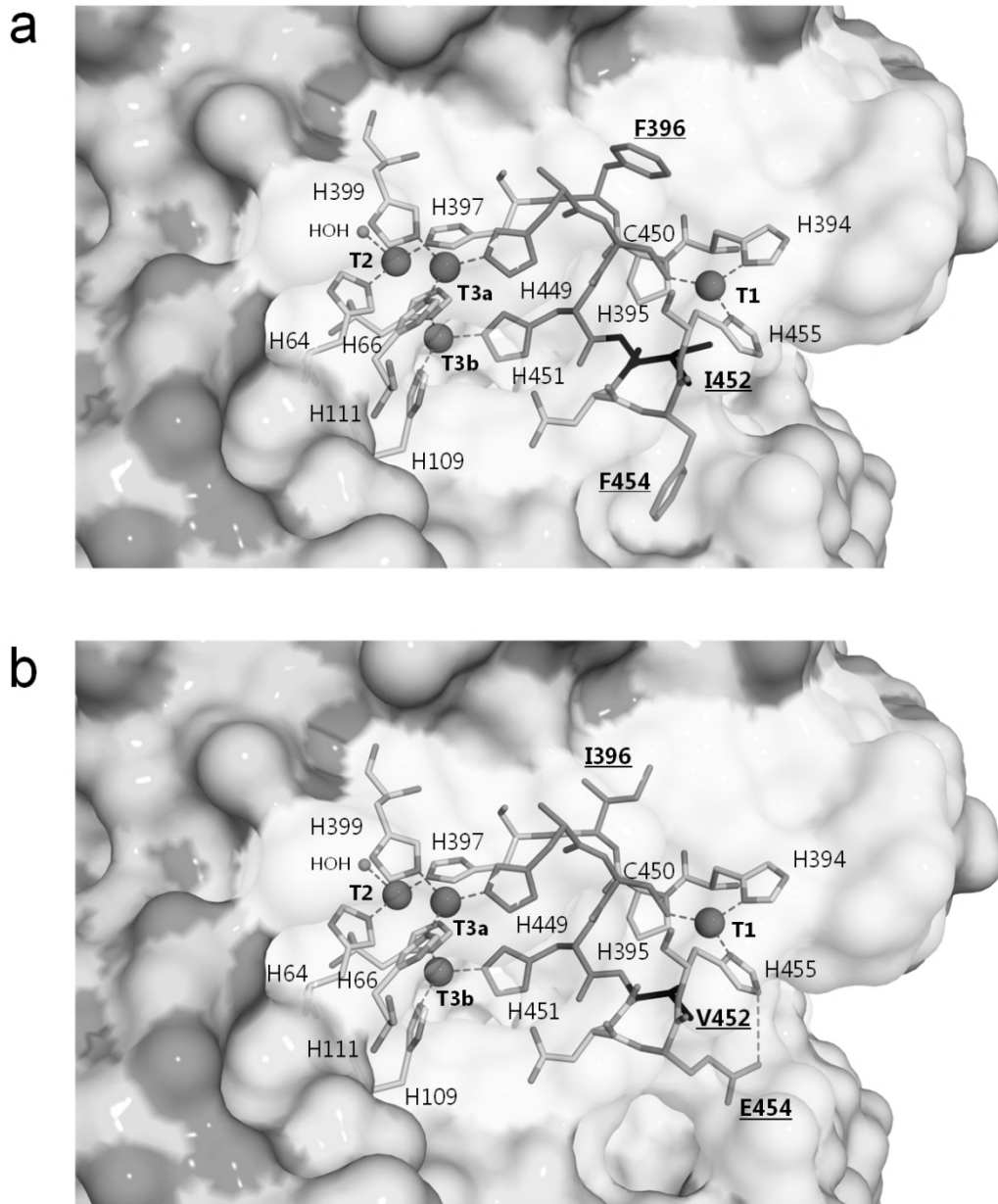


Fig. 4

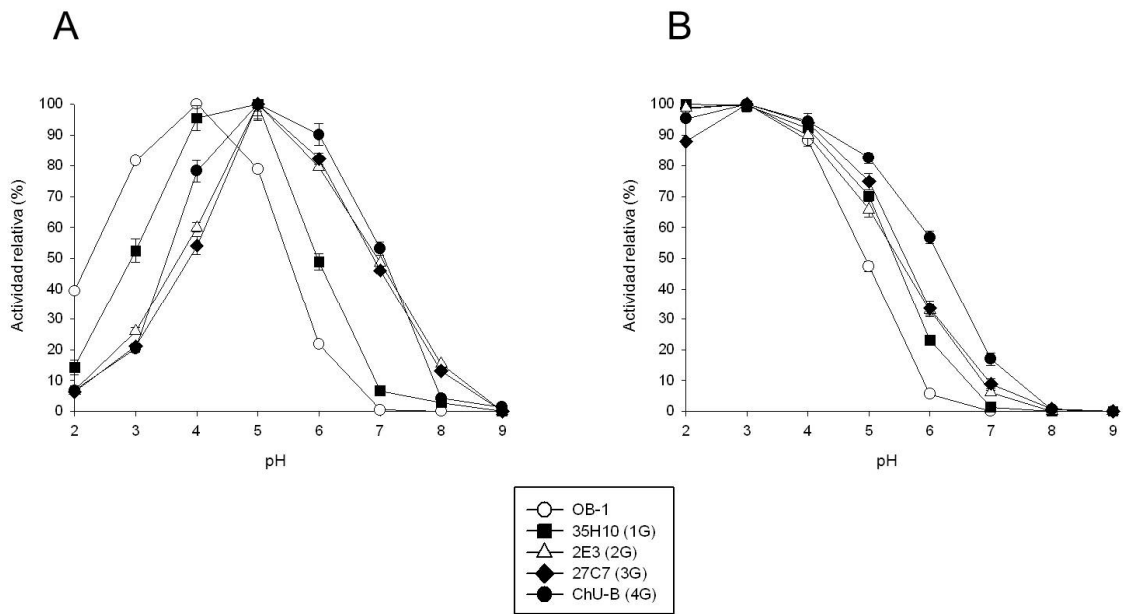


Fig. 5

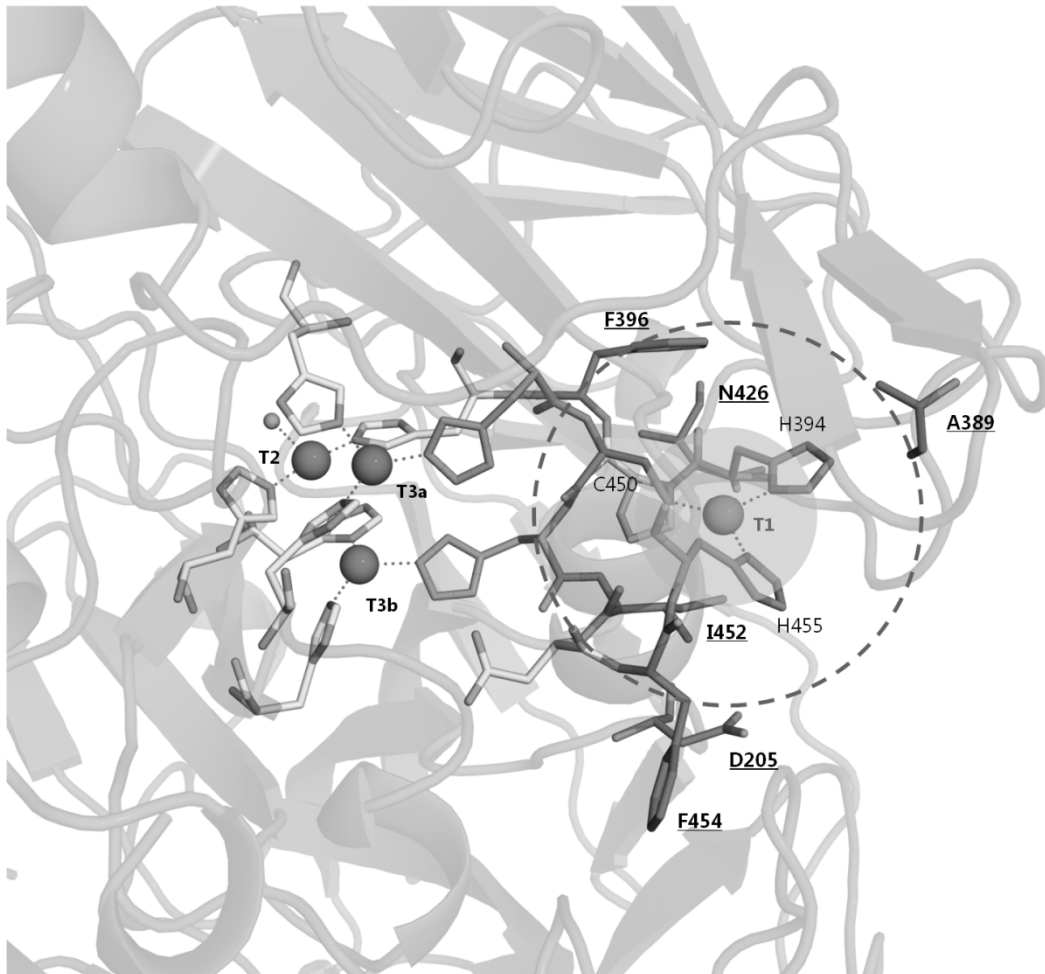


Fig. 6

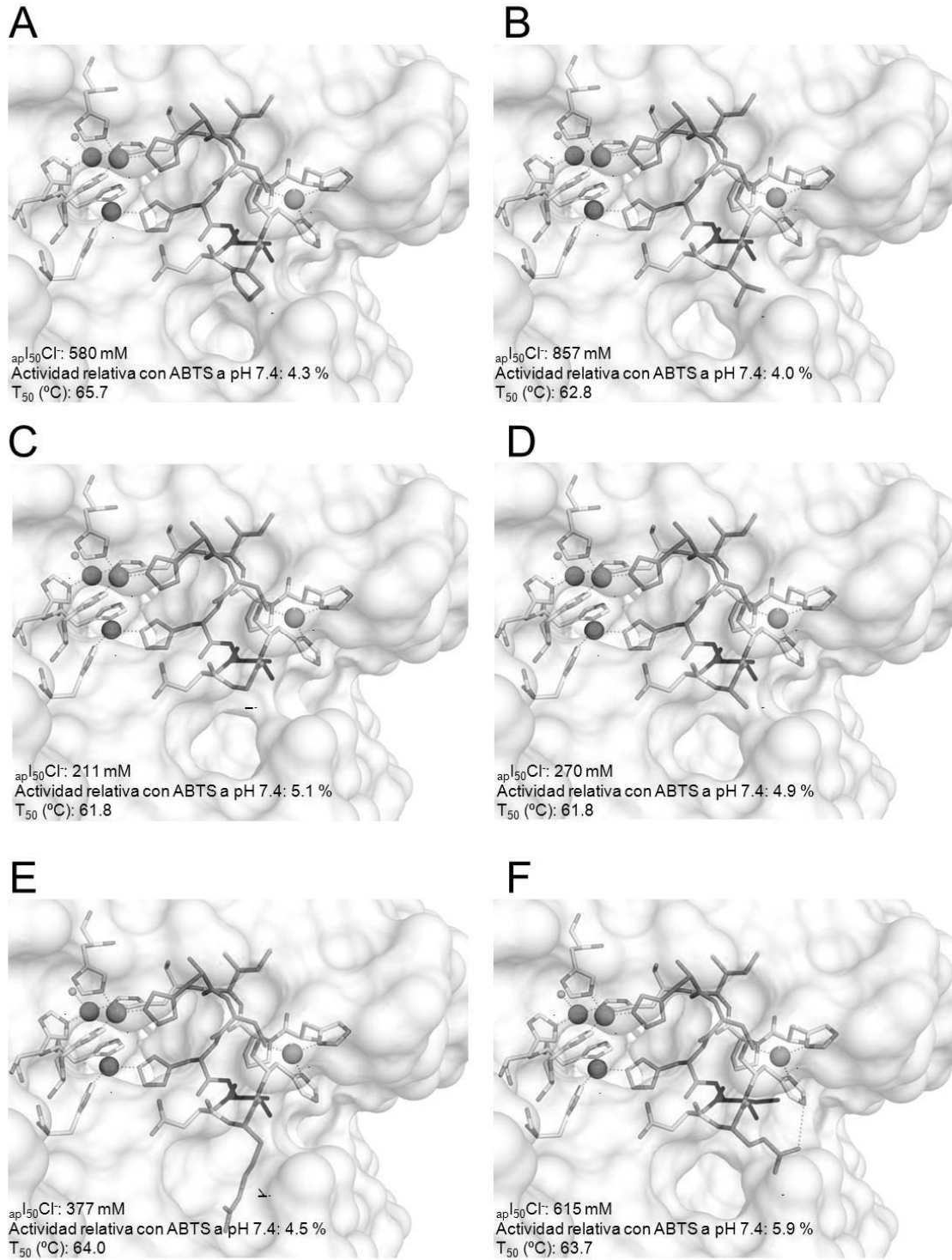


Fig. 7

ES 2 525 195 A1

SEQUENCE LISTING

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

<120> LACASA DE ALTO POTENCIAL REDOX FUNCIONAL EN SANGRE MEDIANTE EVOLUCION DIRIGIDA METODO DE OBTENCION Y SUS APLICACIONES

<140> ES P201330222

<141> 2013-02-19

<160> 30

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 1764

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..1764

<223> /organism="Artificial Sequence"

/note="Parental sequence"

/mol_type="unassigned DNA"

<400> 1

```

atgagatttc cttcaatttt tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaaa ctacaacaga agatgaaaca gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt      120
tactcagatt tagaagggga tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat      180
aacggattat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta      240
tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc      300
atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac      360
gtctttccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc      420
gacaacatga ccaaccacac catgttgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc      480
cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgcc gatttctacc      540
gggcatgcgt tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctggacttt ctggtaccac      600
agtcacttgt ccaactcaata ctgtgacggt ctcaggggtc cgattgttgt ctatgacct      660
caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccaactgtaat cactctcgcg      720
gattggtacc acttggtcgc caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt      780
atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggtgt catcacggtc      840
acgaagggca agcgtatcg cttccgctg gtgtcgtgt catgcgacct gaattacacg      900
ttcagcattg atggtcactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc      960
cagactgtcg actccatcca gatcttcctt gccacgagg actcgtttgt gctcaacgca     1020
gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc     1080
gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaagggt ctgccccgt tgagcccacc     1140
acgaccaga cgccgtcgac gcagcctttg gtggagtccg ccctgaccac tctcgaaggc     1200
accgctgcgc ccggcaacct gacccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc     1260
ggctttgccg gcggcaggtt caccatcaac ggcgcgagct tcaccccgcc caccgtcccc     1320

```

ES 2 525 195 A1

gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt 1380
 gtatactcgc tccctgcgaa cgcggacatt gagatctccc tccccgccac ctccgccgcc 1440
 cccggcttcc cgcaccctt ccacttgac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc 1500
 ggctcgtcga cgtacaacta cgcgaacctg gtctaccgag acgtcgtcaa cacgggctcg 1560
 cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac 1620
 tgccacatcg acttccacct tgaggctggg ttcacggctg tcatggccga ggacattccc 1680
 gacgtcgccg ctacgaacct ggtcccgcaa gcatggctcg atctgtgccc gacctatgat 1740
 gcgctctcgc ctgacgacca gtaa 1764

<210> 2
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Parental Sequence

<400> 2
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val
 85 90 95
 Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser
 100 105 110
 Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr
 115 120 125
 Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr
 130 135 140
 Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe
 145 150 155 160
 Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys
 165 170 175
 Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp
 180 185 190
 Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys
 195 200 205
 Asp Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Val Tyr Asp Pro Gln Asp Pro His
 210 215 220
 Lys Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala
 225 230 235 240
 Asp Trp Tyr His Leu Ala Ala Lys Val Gly Pro Ala Ala Pro Thr Ala
 245 250 255
 Asp Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Ser Ile Asn Thr Leu Asn
 260 265 270
 Ala Asp Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Lys Gly Lys Arg Tyr Arg Phe
 275 280 285
 Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp
 290 295 300
 Gly His Ser Leu Thr Val Ile Glu Ala Asp Gly Val Asn Leu Lys Pro
 305 310 315 320
 Gln Thr Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Pro Ala Gln Arg Tyr Ser Phe
 325 330 335
 Val Leu Asn Ala Asp Gln Asp Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Leu
 2

ES 2 525 195 A1

Pro Asn Ser Gly Thr Arg Asn Phe Asp Gly Gly Val Asn Ser Ala Ile
 340 355 360 375 380 395 400 415 425 430 445 450 460 475 480 495 500 510 515 520 525 530 535 540 545 555 560 565 570 575 580 585

<210> 3
 <211> 1764
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..1764
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="DNA Sequence of 35H10"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 3
 atgagatttc cttcaatttt tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
 ccagtcaaaa ctacaacaga agatgaaaca gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt 120
 tactcagatt tagaagggga tttcgacggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat 180
 aacggattat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaga agaaggggta 240
 tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc 300
 atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac 360
 gtcttcccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc 420
 gacaacatga ccaaccacac catgttgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc 480
 cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgcc gatttctacc 540
 gggcatgcgt tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctggtacttt ctggtaccac 600
 agtcacttgt ccaactcaata ctgtgacggt ctcagggggtc cgattgttgt ctatgaccct 660
 caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccaactgtaat cactctcgcg 720
 gattggtacc acttggctgc caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt 780

ES 2 525 195 A1

atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggctgt catcacggtc 840
 acgaagggca agcgctatcg cttccgcctg gtgtcgtgt catgcgaccc gaattacacg 900
 ttcagcattg atggtcactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc 960
 cagactgtcg actccatcca gatcttccct gccagcgggt actcgtttgt gctcaacgca 1020
 gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc 1080
 gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaagggt ctgcgccctg tgagcccacc 1140
 acgaccaga cgccgtcgc gcagccttg gtggagtccg ccctgaccac tctcgaaggc 1200
 accgctgcgc ccggcaacc gaccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc 1260
 ggctttgccg gcggcagggt caccatcaac ggcgcgagct tcaccccgcc caccgtcccc 1320
 gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctctccc ctctggaagt 1380
 gtatactcgc tcctgcgaa cgcggacatt gagatctccc tccccgccac ctccgccgcc 1440
 cccggcttcc cgcaccccat ccaattgcac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc 1500
 ggctcgtcga cgtacaacta cgcgaaccg gtctaccgcg acgtcgtcaa cacgggctcg 1560
 cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac 1620
 tgccacatcg acttccacct tgaggctggg ttcacggctg tcatggccga ggacattccc 1680
 gacgtcggcg ctacgaacc ggtcccgcaa gcatggtcgg atctgtgccc gacctatgat 1740
 gcgctctcgc ctgacgacca gtaa 1764

<210> 4
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Protein Sequence 35H10

<400> 4
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val
 85 90 95
 Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser
 100 105 110
 Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Ile Thr
 115 120 125
 Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr
 130 135 140
 Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe
 145 150 155 160
 Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys
 165 170 175
 Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp
 180 185 190
 Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys
 4

ES 2 525 195 A1

```

      195                200                205
Asp Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Val Tyr Asp Pro Gln Asp Pro His
   210                215                220
Lys Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala
  225                230                235
Asp Trp Tyr His Leu Ala Ala Lys Val Gly Pro Ala Ala Pro Thr Ala
   245                250                255
Asp Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Ser Ile Asn Thr Leu Asn
   260                265                270
Ala Asp Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Lys Gly Lys Arg Tyr Arg Phe
   275                280                285
Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp
   290                295                300
Gly His Ser Leu Thr Val Ile Glu Ala Asp Gly Val Asn Leu Lys Pro
  305                310                315
Gln Thr Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Pro Ala Gln Arg Tyr Ser Phe
   325                330                335
Val Leu Asn Ala Asp Gln Asp Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Leu
   340                345                350
Pro Asn Ser Gly Thr Arg Asn Phe Asp Gly Gly Val Asn Ser Ala Ile
   355                360                365
Leu Arg Tyr Glu Gly Ala Ala Pro Val Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr
   370                375                380
Pro Ser Thr Gln Pro Leu Val Glu Ser Ala Leu Thr Thr Leu Glu Gly
  385                390                395
Thr Ala Ala Pro Gly Asn Pro Thr Pro Gly Gly Val Asp Leu Ala Leu
   405                410                415
Asn Met Ala Phe Gly Phe Ala Gly Gly Arg Phe Thr Ile Asn Gly Ala
   420                425                430
Ser Phe Thr Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly
   435                440                445
Ala Gln Ser Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Ser Leu
   450                455                460
Pro Ala Asn Ala Asp Ile Glu Ile Ser Leu Pro Ala Thr Ser Ala Ala
  465                470                475
Pro Gly Phe Pro His Pro Ile His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val
   485                490                495
Val Arg Ser Ala Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Tyr Ala Asn Pro Val Tyr
   500                505                510
Arg Asp Val Val Asn Thr Gly Ser Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg
   515                520                525
Phe Arg Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp
   530                535                540
Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Thr Val Val Met Ala Glu Asp Ile Pro
  545                550                555
Asp Val Ala Ala Thr Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys
   565                570                575
Pro Thr Tyr Asp Ala Leu Ser Pro Asp Asp Gln
   580                585

```

```

<210> 5
<211> 1764
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..1764
<223> /organism="Artificial Sequence"
      /note="DNA Sequence 20F1"
      /mol_type="unassigned DNA"

```

```

<400> 5
atgagatttc cttcaat ttt tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaaa ctacaacaga agatgaaaca gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt      120
tactcagatt tagaagggga tttcgacggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat      180
aacggattat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta      240

```

ES 2 525 195 A1

tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc 300
atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggg ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac 360
gtcttcccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc 420
gacaacatga ccaaccacac catggtgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc 480
cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgccg gatttctacc 540
gggcatgcgt tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctgggtacttt ctggtaccac 600
agtcacttgt ccaactcaata ctgtgacggt ctcagggggtc cgattgttgt ctatgaccct 660
caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccaactgtaat cactctcgcg 720
gattggtacc acttggctgc caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt 780
atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggctgt catcacggtc 840
acgaagggca agcgcctatcg cttccgcctg gtgtcgtgt catgcgacct gaattacacg 900
ttcagcattg atggctactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc 960
cagactgtcg actccatcca gatcttccct gccagcggg actcgtttgt gctcaacgca 1020
gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttcca actccgggac caggaacttc 1080
gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaagggt ctgcgcccgt tgagcccacc 1140
acgaccaga cgccgtcgac gcagccttg gtggagtcg ccctgaccac tctcgaaggc 1200
accgctgcgc ccggcaaccc gacccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc 1260
ggctttgccc gcggcaggtt caccatcaac ggcgcgagct tcaccccgcc caccgtcccc 1320
gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt 1380
gtatactcgc tccctgcgaa cgcggacatt gagatctccc tccccgccac ctccgccgcc 1440
cccggcttcc cgcaccccat ccaactgcac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc 1500
ggctcgtcga cgtacaacta cgcgaacccg gtctaccgcg acgtcgtcga cacgggctcg 1560
cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac 1620
tgccacatcg acttccacct tgaggctggg ttcacggtcg tcatggccga ggacattccc 1680
gacgtcgcgc ctacgaaccc ggtccccgaa gcatggtcgg atctgtgccc gacctatgat 1740
gcgctctcgc ctgacgacca gtaa 1764

<210> 6
<211> 587
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Protein 20F1

<400> 6
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
6

ES 2 525 195 A1

50	Phe	Ile	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Gly	Val
65	Ser	Leu	Glu	Lys	Arg	Glu	Thr	Glu	Ala	Glu	Phe	Ser	Ile	Gly	Pro	Val
	Ala	Asp	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Gly	Ala	Val	Ser	Pro	Asp	Gly	Phe	Ser
	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Val	Asn	Asp	Val	Phe	Pro	Ser	Pro	Leu	Ile	Thr
	Gly	Asn	Lys	Gly	Asp	Arg	Phe	Gln	Leu	Asn	Val	Ile	Asp	Asn	Met	Thr
	Asn	His	Thr	Met	Leu	Lys	Ser	Thr	Ser	Ile	His	Trp	His	Gly	Phe	Phe
	Gln	His	Gly	Thr	Asn	Trp	Ala	Asp	Gly	Pro	Ala	Phe	Val	Asn	Gln	Cys
	Pro	Ile	Ser	Thr	Gly	His	Ala	Phe	Leu	Tyr	Asp	Phe	Gln	Val	Pro	Asp
	Gln	Ala	Gly	Thr	Phe	Trp	Tyr	His	Ser	His	Leu	Ser	Thr	Gln	Tyr	Cys
	Asp	Gly	Leu	Arg	Gly	Pro	Ile	Val	Val	Tyr	Asp	Pro	Gln	Asp	Pro	His
	Lys	Ser	Leu	Tyr	Asp	Val	Asp	Asp	Asp	Ser	Thr	Val	Ile	Thr	Leu	Ala
	Asp	Trp	Tyr	His	Leu	Ala	Ala	Lys	Val	Gly	Pro	Ala	Ala	Pro	Thr	Ala
	Asp	Ala	Thr	Leu	Ile	Asn	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser	Ile	Asn	Thr	Leu	Asn
	Ala	Asp	Leu	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Thr	Lys	Gly	Lys	Arg	Tyr	Arg	Phe
	Arg	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Asp	Pro	Asn	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ile	Asp
	Gly	His	Ser	Leu	Thr	Val	Ile	Glu	Ala	Asp	Gly	Val	Asn	Leu	Lys	Pro
	Gln	Thr	Val	Asp	Ser	Ile	Gln	Ile	Phe	Pro	Ala	Gln	Arg	Tyr	Ser	Phe
	Val	Leu	Asn	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Asp	Asn	Tyr	Trp	Ile	Arg	Ala	Leu
	Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Arg	Asn	Phe	Asp	Gly	Gly	Val	Asn	Ser	Ala	Ile
	Leu	Arg	Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Pro	Val	Glu	Pro	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr
	Pro	Ser	Thr	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Gly
	Thr	Ala	Ala	Pro	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Leu
	Asn	Met	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Gly	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Asn	Gly	Ala
	Ser	Phe	Thr	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Ser	Gly
	Ala	Gln	Ser	Ala	Gln	Asp	Leu	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Ser	Leu
	Pro	Ala	Asn	Ala	Asp	Ile	Glu	Ile	Ser	Leu	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	Ala
	Pro	Gly	Phe	Pro	His	Pro	Ile	His	Leu	His	Gly	His	Thr	Phe	Ala	Val
	Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Asn	Pro	Val	Tyr
	Arg	Asp	Val	Val	Asp	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Asp	Asn	Val	Thr	Ile	Arg
	Phe	Arg	Thr	Asp	Asn	Pro	Gly	Pro	Trp	Phe	Leu	His	Cys	His	Ile	Asp
	Phe	His	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Thr	Val	Val	Met	Ala	Glu	Asp	Ile	Pro
	Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Gln	Ala	Trp	Ser	Asp	Leu	Cys
	Pro	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Gln					

<210> 7
 <211> 1764

ES 2 525 195 A1

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..1764
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="DNA_27C7"
 /mol_type="unassigned DNA"

```

<400> 7
atgagatttc cttcaatttt tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaaa ctacaacaaa agatgaaaca gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggc      120
tactcagatt tagaagggga tttcgacggt gctgttttgc cattttccaa cagcaciaaat      180
aacggattat tgtttatgaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta      240
tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc      300
atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac      360
gtcttcccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc      420
gacaacatga ccaaccacac catgttgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc      480
cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgccg gatttctacc      540
gggcatgcgt tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctggtacttt ctggtaccac      600
agtcacttgt cactcaata ctgtgacggt ctcaggggtc cgattgttgt ctatgaccct      660
caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccaactgtaat cactctcgcg      720
gattggtacc acttggtgctc caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt      780
atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggtgt catcacggtc      840
acgaagggca agcgtatcgc cttccgctg gtgtcgtgt catgcgacc gaattacag      900
ttcagcattg atggtcactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc      960
cagactgtcg actccatcca gatcttcct gccagcggg actcgtttgt gctcaacgca     1020
gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc     1080
gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaaggtg ctgcgcccgt tgagcccacc     1140
acgaccaga cgccgtcgac gcagccttg gtggagtccg ccctgaccac tctcgaaggc     1200
accgctgcgc ccggcaacc gaccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc     1260
ggctttgccg gcggcaggtt caccatcaac ggcgcgagct tcacccgcc caccgtcccc     1320
gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctctctcc ctctggaagt     1380
gtatactcgc tccctgcgaa cgcggacatt gaaatctccc tccccgccac ctccgccgcc     1440
cccggcttcc cgcacccat ccaattgcac gggcacacct tcgccgtcgt ggcgagcgc     1500
ggctcgtcga catacaacta cgcgaacccg gtctaccgcg acgtcgtcaa cacgggctcg     1560
cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac     1620
tgccacgtcg acttccacct tgaggctggg ttcacggtcg tcatggccga ggacattccc     1680
gacgtcgcgc ctacgaacc ggtcccga gcatggtcgg atctgtgccc gacctatgat     1740
gcgctctcgc ctgacgacca gtaa                                             1764
  
```

ES 2 525 195 A1

<210> 8
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PRotein 27C7

<400> 8
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Lys Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Met Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val
 85 90 95
 Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser
 100 105 110
 Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr
 115 120 125
 Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr
 130 135 140
 Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe
 145 150 155 160
 Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys
 165 170 175
 Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp
 180 185 190
 Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys
 195 200 205
 Asp Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Val Tyr Asp Pro Gln Asp Pro His
 210 215 220
 Lys Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala
 225 230 235 240
 Asp Trp Tyr His Leu Ala Ala Lys Val Gly Pro Ala Ala Pro Thr Ala
 245 250 255
 Asp Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Ser Ile Asn Thr Leu Asn
 260 265 270
 Ala Asp Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Lys Gly Lys Arg Tyr Arg Phe
 275 280 285
 Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp
 290 295 300
 Gly His Ser Leu Thr Val Ile Glu Ala Asp Gly Val Asn Leu Lys Pro
 305 310 315 320
 Gln Thr Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Pro Ala Gln Arg Tyr Ser Phe
 325 330 335
 Val Leu Asn Ala Asp Gln Asp Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Leu
 340 345 350
 Pro Asn Ser Gly Thr Arg Asn Phe Asp Gly Gly Val Asn Ser Ala Ile
 355 360 365
 Leu Arg Tyr Glu Gly Ala Ala Pro Val Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr
 370 375 380
 Pro Ser Thr Gln Pro Leu Val Glu Ser Ala Leu Thr Thr Leu Glu Gly
 385 390 395 400
 Thr Ala Ala Pro Gly Asn Pro Thr Pro Gly Gly Val Asp Leu Ala Leu
 405 410 415
 Asn Met Ala Phe Gly Phe Ala Gly Gly Arg Phe Thr Ile Asn Gly Ala
 420 425 430
 Ser Phe Thr Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly
 435 440 445
 Ala Gln Ser Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Ser Leu
 450 455 460
 Pro Ala Asn Ala Asp Ile Glu Ile Ser Leu Pro Ala Thr Ser Ala Ala
 9

ES 2 525 195 A1

ggctttgccg gcggcagggt caccatcaac ggcgcgagct tcaccccgcc caccgtcccc 1320
 gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt 1380
 gtatactcgc tccctgcgaa cgcggaacatt gaaatctccc tccccgccac ctccgccgcc 1440
 cccggcttcc cgcaccccat ccaattgcac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc 1500
 ggctcgtcga catacaacta cgcgaaccgg gtctaccgcy acgtcgtcaa cacgggctcg 1560
 cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac 1620
 tgccacatcg acgagcacct tgaggctggg ttcacggctc tcatggccga ggacattccc 1680
 gacgtcgccg ctacgaaccc ggtcccgcaa gcatggctcg atctgtgccc gacctatgat 1740
 gcgctctcgc ctgacgacca gtaa 1764

<210> 10
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Protein Chu-B

<400> 10
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Lys Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Met Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val
 85 90 95
 Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser
 100 105 110
 Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Ile Thr
 115 120 125
 Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr
 130 135 140
 Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe
 145 150 155 160
 Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys
 165 170 175
 Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp
 180 185 190
 Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys
 195 200 205
 Asp Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Val Tyr Asp Pro Gln Asp Pro His
 210 215 220
 Lys Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala
 225 230 235 240
 Asp Trp Tyr His Leu Ala Ala Lys Val Gly Pro Ala Ala Pro Thr Ala
 245 250 255
 Asp Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Ser Ile Asn Thr Leu Asn
 260 265 270
 Ala Asp Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Lys Gly Lys Arg Tyr Arg Phe
 275 280 285
 Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp
 290 295 300
 Gly His Ser Leu Thr Val Ile Glu Ala Asp Gly Val Asn Leu Lys Pro
 305 310 315 320
 Gln Thr Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Pro Ala Gln Arg Tyr Ser Phe

ES 2 525 195 A1

				325					330					335			
Val	Leu	Asn	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Asp	Asn	Tyr	Trp	Ile	Arg	Ala	Leu		
			340					345					350				
Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Arg	Asn	Phe	Asp	Gly	Gly	Val	Asn	Ser	Ala	Ile		
		355					360					365					
Leu	Arg	Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Pro	Val	Glu	Pro	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr		
	370					375					380						
Pro	Ser	Thr	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Gly		
385					390					395					400		
Thr	Ala	Ala	Pro	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Leu		
				405					410					415			
Asn	Met	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Gly	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Asn	Gly	Ala		
			420					425					430				
Ser	Phe	Thr	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Ser	Gly		
		435					440					445					
Ala	Gln	Ser	Ala	Gln	Asp	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Ser	Leu			
	450					455					460						
Pro	Ala	Asn	Ala	Asp	Ile	Glu	Ile	Ser	Leu	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	Ala		
465					470					475					480		
Pro	Gly	Phe	Pro	His	Pro	Ile	His	Leu	His	Gly	His	Thr	Phe	Ala	Val		
				485					490					495			
Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Asn	Pro	Val	Tyr		
			500					505					510				
Arg	Asp	Val	Val	Asn	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Asp	Asn	Val	Thr	Ile	Arg		
		515					520					525					
Phe	Arg	Thr	Asp	Asn	Pro	Gly	Pro	Trp	Phe	Leu	His	Cys	His	Ile	Asp		
	530					535					540						
Glu	His	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Thr	Val	Val	Met	Ala	Glu	Asp	Ile	Pro		
545					550					555					560		
Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Gln	Ala	Trp	Ser	Asp	Leu	Cys		
				565					570					575			
Pro	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Gln							
			580					585									

<210> 11
 <211> 1761
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..1761
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="DNA 14F1"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 11
 atgagatttc cttcaatitt tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
 ccagtcaaaa ctacaacaga agatgaaaca gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggg 120
 tactcagatt tagaagggga tttcgacggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat 180
 aacggattat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
 tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc 300
 atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac 360
 gtcttcccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc 420
 gacaacatga ccaaccacac catgttgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc 480
 cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgcc gatttctacc 540
 gggcatgctg tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctggtacttt ctggtaccac 600
 agtcacttgt ccaactcaata ctgtgacggt ctgagggtc cgattgttgt ctatgaccct 660
 caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccactgtaat cactctcgcg 720

ES 2 525 195 A1

gattggtacc acttggtcgc caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt 780
atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggtgtg catcacggtc 840
acgaagggca agcgctatcg cttccgctg gtgtcgtgt catgcgacc gaattacacg 900
ttcagcattg atggtcactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc 960
cagactgtcg actccatcca gatcttccct gccagcggg actcgtttgt gctcaacgca 1020
gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc 1080
gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaaggtg ctgcccgtg tgagcccacc 1140
acgaccaga cgccgtcgc gcagccttg gtggagtccg ccctgaccac tctcgaaggc 1200
accgctgcgc ccggcaacc gaccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc 1260
ggctttgccg gcggcagggt caccatcaac ggcgcgagct tcaccccgcc caccgtcccc 1320
gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt 1380
gtatactgc tcctgcgaa cgcggacatt gagatctccc tccccgccac ctccgcccc 1440
ggcttccgc accccatcca cttgcacggg cacaccttcg ccgtcgtgcg cagcgcggc 1500
tcgtcgacgt acaactacgc gaaccggtc taccgcgacg tcgtcgacac gggctcggc 1560
ggggacaacg tcacgatccg gttcaggacg gacaacccg gcccggtggt cctccactgc 1620
cacatcgact tccacctga ggctgggttc acggtcgtca tggccgagga cattcccgac 1680
gtcggcgcta cgaacccggc cccgcaagca tggtcggatc tgtgcccgc ctatgatgcg 1740
ctctcgctg acgaccagta a 1761

<210> 12
<211> 586
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Protein 14F1

<400> 12
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val
85 90 95
Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser
100 105 110
Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr
115 120 125
Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr
130 135 140
Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe
145 150 155 160
Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys
165 170 175
Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp
13

ES 2 525 195 A1

			180					185					190			
Gln	Ala	Gly	Thr	Phe	Trp	Tyr	His	Ser	His	Leu	Ser	Thr	Gln	Tyr	Cys	
		195					200					205				
Asp	Gly	Leu	Arg	Gly	Pro	Ile	Val	Val	Tyr	Asp	Pro	Gln	Asp	Pro	His	
	210					215					220					
Lys	Ser	Leu	Tyr	Asp	Val	Asp	Asp	Asp	Ser	Thr	Val	Ile	Thr	Leu	Ala	
	225				230					235					240	
Asp	Trp	Tyr	His	Leu	Ala	Ala	Lys	Val	Gly	Pro	Ala	Ala	Pro	Thr	Ala	
			245						250					255		
Asp	Ala	Thr	Leu	Ile	Asn	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser	Ile	Asn	Thr	Leu	Asn	
			260					265					270			
Ala	Asp	Leu	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Thr	Lys	Gly	Lys	Arg	Tyr	Arg	Phe	
		275					280					285				
Arg	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Asp	Pro	Asn	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ile	Asp	
	290					295					300					
Gly	His	Ser	Leu	Thr	Val	Ile	Glu	Ala	Asp	Gly	Val	Asn	Leu	Lys	Pro	
	305				310					315					320	
Gln	Thr	Val	Asp	Ser	Ile	Gln	Ile	Phe	Pro	Ala	Gln	Arg	Tyr	Ser	Phe	
			325						330					335		
Val	Leu	Asn	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Asp	Asn	Tyr	Trp	Ile	Arg	Ala	Leu	
			340					345					350			
Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Arg	Asn	Phe	Asp	Gly	Gly	Val	Asn	Ser	Ala	Ile	
		355					360					365				
Leu	Arg	Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Pro	Val	Glu	Pro	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr	
	370					375					380					
Pro	Ser	Thr	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Gly	
	385				390					395				400		
Thr	Ala	Ala	Pro	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Leu	
				405					410					415		
Asn	Met	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Gly	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Asn	Gly	Ala	
			420					425					430			
Ser	Phe	Thr	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Ser	Gly	
		435					440					445				
Ala	Gln	Ser	Ala	Gln	Asp	Leu	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Ser	Leu	
	450					455					460					
Pro	Ala	Asn	Ala	Asp	Ile	Glu	Ile	Ser	Leu	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	Pro	
	465				470					475					480	
Gly	Phe	Pro	His	Pro	Ile	His	Leu	His	Gly	His	Thr	Phe	Ala	Val	Val	
				485					490					495		
Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Asn	Pro	Val	Tyr	Arg	
			500					505					510			
Asp	Val	Val	Asp	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Asp	Asn	Val	Thr	Ile	Arg	Phe	
		515					520					525				
Arg	Thr	Asp	Asn	Pro	Gly	Pro	Trp	Phe	Leu	His	Cys	His	Ile	Asp	Phe	
	530					535					540					
His	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Thr	Val	Val	Met	Ala	Glu	Asp	Ile	Pro	Asp	
	545				550					555					560	
Val	Ala	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Gln	Ala	Trp	Ser	Asp	Leu	Cys	Pro	
				565					570					575		
Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Gln							
			580					585								

<210> 13
 <211> 1764
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..1764
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="DNA 1B1"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 13																	
atgagatttc	cttcaatttt	tactgctgat	ttattcgcag	catcctccgc	attagctgct												60
ccagtcaaaa	ctacaacaaa	agatgaaaca	gcacaaattc	cggtgaagc	tgatcatcgg												120
tactcagatt	tagaagggga	tttcgacggt	gctgttttgc	cattttccaa	cagcacaat												180

ES 2 525 195 A1

aacggattat tgtttatgaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc 300
atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac 360
gtcttcccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc 420
gacaacatga ccaaccacac catgttgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc 480
cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgccc gatttctacc 540
gggcatgctg tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctggtacttt ctggtaccac 600
agtcacttgt ccaactcaata ctgtgacggt ctcaggggtc cgattgttgt ctatgacct 660
caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccaactgtaat cactctcgcg 720
gattggtacc acttggctgc caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt 780
atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggctgt catcacggtc 840
acgaagggca agcgctatcg cttccgcctg gtgtcgtctg catgcaacct gaattacacg 900
ttcagcattg atggtcactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc 960
cagactgtcg actccatcca gatcttccct gccagcgggt actcgtttgt gctcaacgca 1020
gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc 1080
gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaagggt ctgccccgt tgagcccacc 1140
acgaccaga cgccgtcgac gcagccttg gtggagtccg ccctgaccac tctcgaaggc 1200
accgctgcgc ccggcaacct gaccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc 1260
ggctttgccg gcggcaggtt caccatcaac ggcgcgagct tcacccgcc caccgtcccc 1320
gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt 1380
gtatactcgc tccctgcgaa cgcggacatt gaaatctccc tccccgccac ctccgccgcc 1440
cccggcttcc cgcaccccat ccaactgcac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc 1500
ggctcgtcga catacaacta cgcgaacctg gtctaccgag acgtcgtcaa cacgggctcg 1560
cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac 1620
tgccacgtcg acttccacct tgaggctggg ttcacggctg tcatggccga ggacattccc 1680
gacgtcggcg ctacgaacct ggtcccgcaa gcatggctcg atctgtgccc gacctatgat 1740
gcgctctcgc ctgacgacca gtaa 1764

<210> 14
<211> 587
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Protein 1B1

<400> 14
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Lys Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
15

ES 2 525 195 A1

		35					40				45					
Asp	Val	Ala	Val	Leu	Pro	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Asn	Gly	Leu	Leu	
	50					55					60					
Phe	Met	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Gly	Val	
	65				70					75					80	
Ser	Leu	Glu	Lys	Arg	Glu	Thr	Glu	Ala	Glu	Phe	Ser	Ile	Gly	Pro	Val	
				85					90					95		
Ala	Asp	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Gly	Ala	Val	Ser	Pro	Asp	Gly	Phe	Ser	
			100					105					110			
Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Val	Asn	Asp	Val	Phe	Pro	Ser	Pro	Leu	Ile	Thr	
		115						120					125			
Gly	Asn	Lys	Gly	Asp	Arg	Phe	Gln	Leu	Asn	Val	Ile	Asp	Asn	Met	Thr	
	130					135					140					
Asn	His	Thr	Met	Leu	Lys	Ser	Thr	Ser	Ile	His	Trp	His	Gly	Phe	Phe	
	145				150					155					160	
Gln	His	Gly	Thr	Asn	Trp	Ala	Asp	Gly	Pro	Ala	Phe	Val	Asn	Gln	Cys	
				165					170					175		
Pro	Ile	Ser	Thr	Gly	His	Ala	Phe	Leu	Tyr	Asp	Phe	Gln	Val	Pro	Asp	
			180					185					190			
Gln	Ala	Gly	Thr	Phe	Trp	Tyr	His	Ser	His	Leu	Ser	Thr	Gln	Tyr	Cys	
		195						200					205			
Asp	Gly	Leu	Arg	Gly	Pro	Ile	Val	Val	Tyr	Asp	Pro	Gln	Asp	Pro	His	
	210					215					220					
Lys	Ser	Leu	Tyr	Asp	Val	Asp	Asp	Asp	Ser	Thr	Val	Ile	Thr	Leu	Ala	
	225				230					235					240	
Asp	Trp	Tyr	His	Leu	Ala	Ala	Lys	Val	Gly	Pro	Ala	Ala	Pro	Thr	Ala	
				245					250					255		
Asp	Ala	Thr	Leu	Ile	Asn	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser	Ile	Asn	Thr	Leu	Asn	
			260					265						270		
Ala	Asp	Leu	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Thr	Lys	Gly	Lys	Arg	Tyr	Arg	Phe	
		275					280					285				
Arg	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Asn	Pro	Asn	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ile	Asp	
	290					295					300					
Gly	His	Ser	Leu	Thr	Val	Ile	Glu	Ala	Asp	Gly	Val	Asn	Leu	Lys	Pro	
	305				310					315					320	
Gln	Thr	Val	Asp	Ser	Ile	Gln	Ile	Phe	Pro	Ala	Gln	Arg	Tyr	Ser	Phe	
				325					330					335		
Val	Leu	Asn	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Asp	Asn	Tyr	Trp	Ile	Arg	Ala	Leu	
			340					345					350			
Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Arg	Asn	Phe	Asp	Gly	Gly	Val	Asn	Ser	Ala	Ile	
		355					360						365			
Leu	Arg	Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Pro	Val	Glu	Pro	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr	
	370					375						380				
Pro	Ser	Thr	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Gly	
				390						395					400	
Thr	Ala	Ala	Pro	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Leu	
				405					410					415		
Asn	Met	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Gly	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Asn	Gly	Ala	
			420					425					430			
Ser	Phe	Thr	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Ser	Gly	
		435					440					445				
Ala	Gln	Ser	Ala	Gln	Asp	Leu	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Ser	Leu	
	450					455					460					
Pro	Ala	Asn	Ala	Asp	Ile	Glu	Ile	Ser	Leu	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	Ala	
	465				470					475					480	
Pro	Gly	Phe	Pro	His	Pro	Ile	His	Leu	His	Gly	His	Thr	Phe	Ala	Val	
				485					490					495		
Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Asn	Pro	Val	Tyr	
			500					505					510			
Arg	Asp	Val	Val	Asn	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Asp	Asn	Val	Thr	Ile	Arg	
		515					520					525				
Phe	Arg	Thr	Asp	Asn	Pro	Gly	Pro	Trp	Phe	Leu	His	Cys	His	Val	Asp	
	530					535					540					
Phe	His	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Thr	Val	Val	Met	Ala	Glu	Asp	Ile	Pro	
	545				550					555					560	
Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Gln	Ala	Trp	Ser	Asp	Leu	Cys	
				565					570					575		
Pro	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Gln						
			580					585								

ES 2 525 195 A1

<210> 15
 <211> 1764
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..1764
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="DNA 3A7"
 /mol_type="unassigned DNA"

```

<400> 15
atgagatttc cttcaat ttt tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaaa ctacaacaaa agatgaaaca gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggc      120
tactcagatt tagaagggga tttcgacggt gctgttttgc ctttttccaa cagcacaat      180
aacggattat tgtttatgaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta      240
tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc      300
atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac      360
gtcttccccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc      420
gacaacatga ccaaccacac catgttgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc      480
cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgcc gatttctacc      540
gggcatgcgt tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctggtacttt ctggtaccac      600
agtcacttgt ccaactcaata ctgtgacggt ctcagggggtc cgattgttgt ctatgacct      660
caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccactgtaat cactctcgcg      720
gattggtacc acttggctgc caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt      780
atcaacggcc tcggctgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggctgt catcacggtc      840
acgaagggca agcgcctatcg cttccgcctg gtgtcgtctgt catgcgacct gaattacacg      900
ttcagcattg atggtcactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc      960
cagactgtcg actccatcca gatcttccct gccagcgggt actcgtttgt gctcaacgca     1020
gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttcccc actccgggac caggaacttc     1080
gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaagggtg ctgcgcccgt tgagcccacc     1140
acgaccaga cgccgtcgac gcagcctttg gtggagtccg cctgaccac tctcgaaggc     1200
accgctgcgc ccggcaacct gaccttggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc     1260
ggctttgccc gcggcagggt caccatcaac ggcgcgagct tcaccccgcc caccgtcccc     1320
gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt     1380
gtatactcgc tccctgcgaa cgcggacatt gaaatctccc tccccgccac ctccgccgcc     1440
cccggcttcc cgcaccccat ccacttgac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc     1500
ggctcgtcga catacaacta cgcgaacctg gtctaccgcg acgtcgtcga cacgggctcg     1560
cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac     1620
tgccacgtcg acttccacct tgaggctggg ttcacggtcg tcatggccga ggacattccc     1680
gacgtcgccg ctacgaacct ggtcccgcaa gcatggctcg atctgtgccc gacctatgat     1740
  
```

gcgctctcgc ctgacgacca gtaa

1764

<210> 16
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Protein 3A7

<400> 16

```

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1      5      10      15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Lys Asp Glu Thr Ala Gln
      20      25      30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
      35      40      45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
      50      55      60
Phe Met Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65      70      75      80
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val
      85      90      95
Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser
      100      105      110
Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr
      115      120      125
Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr
      130      135      140
Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe
145      150      155      160
Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys
      165      170      175
Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp
      180      185      190
Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys
      195      200      205
Asp Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Val Tyr Asp Pro Gln Asp Pro His
210      215      220
Lys Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala
225      230      235      240
Asp Trp Tyr His Leu Ala Ala Lys Val Gly Pro Ala Ala Pro Thr Ala
      245      250      255
Asp Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Ser Ile Asn Thr Leu Asn
      260      265      270
Ala Asp Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Lys Gly Lys Arg Tyr Arg Phe
      275      280      285
Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp
      290      295      300
Gly His Ser Leu Thr Val Ile Glu Ala Asp Gly Val Asn Leu Lys Pro
305      310      315      320
Gln Thr Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Pro Ala Gln Arg Tyr Ser Phe
      325      330      335
Val Leu Asn Ala Asp Gln Asp Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Leu
      340      345      350
Pro Asn Ser Gly Thr Arg Asn Phe Asp Gly Gly Val Asn Ser Ala Ile
      355      360      365
Leu Arg Tyr Glu Gly Ala Ala Pro Val Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr
      370      375      380
Pro Ser Thr Gln Pro Leu Val Glu Ser Ala Leu Thr Thr Leu Glu Gly
385      390      395      400
Thr Ala Ala Pro Gly Asn Pro Thr Pro Gly Val Asp Leu Ala Leu
      405      410      415
Asn Met Ala Phe Gly Phe Ala Gly Gly Arg Phe Thr Ile Asn Gly Ala
      420      425      430
Ser Phe Thr Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly
      435      440      445
Ala Gln Ser Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Ser Leu
      445
    
```

ES 2 525 195 A1

	450		455		460														
Pro	Ala	Asn	Ala	Asp	Ile	Glu	Ile	Ser	Leu	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	Ala				
465					470					475					480				
Pro	Gly	Phe	Pro	His	Pro	Ile	His	Leu	His	Gly	His	Thr	Phe	Ala	Val				
				485					490					495					
Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Asn	Pro	Val	Tyr				
			500					505					510						
Arg	Asp	Val	Val	Asp	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Asp	Asn	Val	Thr	Ile	Arg				
		515					520					525							
Phe	Arg	Thr	Asp	Asn	Pro	Gly	Pro	Trp	Phe	Leu	His	Cys	His	Val	Asp				
		530				535					540								
Phe	His	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Thr	Val	Val	Met	Ala	Glu	Asp	Ile	Pro				
545					550					555					560				
Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Gln	Ala	Trp	Ser	Asp	Leu	Cys				
				565					570					575					
Pro	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ser	Pro	Asp	Gln										
			580					585											

<210> 17
 <211> 1764
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..1764
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="DNA 19B12"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 17
 atgagatttc cttcaat ttt tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
 ccagtcaaaa ctacaacaaa agatgaaaca gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt 120
 tactcagatt tagaagggga tttcgacgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat 180
 aacggattat tgtttatgaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
 tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc 300
 atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac 360
 gtcttcccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc 420
 gacaacatga ccaaccacac catgttgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc 480
 cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgcc gatttctacc 540
 gggcatgctg tcttttacga cttccaggtc cctgaccaag ctggtacttt ctggtaccac 600
 agtcacttgt ccaactcaata ctgtgacggt ctcaggggtc cgattgttgt ctatgaccct 660
 caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccaactgtaat cactctcgcg 720
 gattggtacc acttggtctg caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt 780
 atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggtgt catcacggtc 840
 acgaagggca agcgtatcg ctccgcctg gtgtcgctgt catgcgacc gaattacacg 900
 ttcagcattg atggctactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc 960
 cagactgtcg actccatcca gatcttcct gccagcgggt actcgtttgt gctcaacgca 1020
 gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc 1080
 gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaagggt ctgccccgt tgagcccacc 1140
 acgaccaga cgccgtcgac gcagcctttg gtggagtccg ccctgaccac tctcgaaggc 1200

ES 2 525 195 A1

accgctgcgc cgggcaaccc gaccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc 1260
 ggctttgccg gcggcagggt caccatcaac ggcgagct tcaccccgcc caccgtcccc 1320
 gtctctctgc agatcctgag cggcgcgag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt 1380
 gtatactgc tcctgcgaa cgcggacatt gaaatctccc tccccgccac ctccgccgcc 1440
 cccggcttcc cgcaccccat ccacttgac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc 1500
 ggctcgtcga catacaacta cgcgaacccg gtctaccgag acgtcgtcaa cacgggctcg 1560
 cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac 1620
 tgccacgtcg acccccacct tgaggctggg ttcacggctg tcatggccga ggacattccc 1680
 gagtcgccg ctacgaaccc ggtcccgcaa gcatggctcg atctgtgccc gacctatgat 1740
 gcgctctcgc ctgacgacca gtaa 1764

<210> 18
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Protein 19B12

<400> 18
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Lys Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Met Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val
 85 90 95
 Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser
 100 105 110
 Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr
 115 120 125
 Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr
 130 135 140
 Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe
 145 150 155 160
 Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys
 165 170 175
 Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp
 180 185 190
 Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys
 195 200 205
 Asp Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Val Tyr Asp Pro Gln Asp Pro His
 210 215 220
 Lys Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala
 225 230 235 240
 Asp Trp Tyr His Leu Ala Ala Lys Val Gly Pro Ala Ala Pro Thr Ala
 245 250 255
 Asp Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Ser Ile Asn Thr Leu Asn
 260 265 270
 Ala Asp Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Lys Gly Lys Arg Tyr Arg Phe
 275 280 285
 Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp
 290 295 300
 Gly His Ser Leu Thr Val Ile Glu Ala Asp Gly Val Asn Leu Lys Pro
 20

ES 2 525 195 A1

caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccaactgtaat cactctcgcg 720
gattggtacc acttggctgc caaagtcggc cggcgggccc cgactgccga tgctactctt 780
atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggctgt catcacggtc 840
acgaagggca agcgctatcg ctccgcctg gtgtcgctgt catgacgacc gaattacacg 900
ttcagcattg atggtcactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc 960
cagactgtcg actccatcca gatcttccct gccacgcggg actcgtttgt gctcaacgca 1020
gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc 1080
gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaagggt ctgccccgt tgagcccacc 1140
acgaccaga cgccgtcgac gcagccttg gtggagtccg cctgaccac tctcgaaggc 1200
accgctgcgc ccggcaacc gaccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc 1260
ggctttgccg gcggcagggt caccatcaac ggcgcgagct tcacccgcc caccgtcccc 1320
gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt 1380
gtatactcgc tccctgcgaa cgcggacatt gaaatctccc tccccgccac ctccgccgcc 1440
cccggcttcc cgcaccccat ccaattgcac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc 1500
ggctcgtcga catacaacta cgcgaaccgg gtctaccgag acgtcgtcaa cacgggctcg 1560
cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac 1620
tgccacgtcg acacgcacct tgaggctggg ttcacggctg tcatggccga ggacattccc 1680
gacgtcggcg ctacgaacc ggtcccgcaa gcatggctcg atctgtgccc gacctatgat 1740
gcgctctcgc ctgacgacca gtaa 1764

<210> 20
<211> 587
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Protein 18A10

<400> 20
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Lys Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60
Phe Met Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val
85 90 95
Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser
100 105 110
Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr
115 120 125
Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr
130 135 140
Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe
145 150 155 160
Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys
22

ES 2 525 195 A1

Pro	Ile	Ser	Thr	Gly	His	Ala	Phe	Leu	Tyr	Asp	Phe	Gln	Val	Pro	Asp
			180						185				190		
Gln	Ala	Gly	Thr	Phe	Trp	Tyr	His	Ser	His	Leu	Ser	Thr	Gln	Tyr	Cys
		195					200					205			
Asp	Gly	Leu	Arg	Gly	Pro	Ile	Val	Val	Tyr	Asp	Pro	Gln	Asp	Pro	His
	210					215					220				
Lys	Ser	Leu	Tyr	Asp	Val	Asp	Asp	Asp	Ser	Thr	Val	Ile	Thr	Leu	Ala
225					230					235					240
Asp	Trp	Tyr	His	Leu	Ala	Ala	Lys	Val	Gly	Pro	Ala	Ala	Pro	Thr	Ala
				245					250					255	
Asp	Ala	Thr	Leu	Ile	Asn	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser	Ile	Asn	Thr	Leu	Asn
			260					265					270		
Ala	Asp	Leu	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Thr	Lys	Gly	Lys	Arg	Tyr	Arg	Phe
		275					280					285			
Arg	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Asp	Pro	Asn	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ile	Asp
	290					295					300				
Gly	His	Ser	Leu	Thr	Val	Ile	Glu	Ala	Asp	Gly	Val	Asn	Leu	Lys	Pro
305					310					315					320
Gln	Thr	Val	Asp	Ser	Ile	Gln	Ile	Phe	Pro	Ala	Gln	Arg	Tyr	Ser	Phe
				325					330					335	
Val	Leu	Asn	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Asp	Asn	Tyr	Trp	Ile	Arg	Ala	Leu
			340					345					350		
Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Arg	Asn	Phe	Asp	Gly	Gly	Val	Asn	Ser	Ala	Ile
		355					360					365			
Leu	Arg	Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Pro	Val	Glu	Pro	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr
	370					375					380				
Pro	Ser	Thr	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Gly
385					390					395					400
Thr	Ala	Ala	Pro	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Leu
				405					410					415	
Asn	Met	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Gly	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Asn	Gly	Ala
			420				425						430		
Ser	Phe	Thr	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Ser	Gly
		435					440					445			
Ala	Gln	Ser	Ala	Gln	Asp	Leu	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Ser	Leu
	450					455					460				
Pro	Ala	Asn	Ala	Asp	Ile	Glu	Ile	Ser	Leu	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	Ala
465					470					475					480
Pro	Gly	Phe	Pro	His	Pro	Ile	His	Leu	His	Gly	His	Thr	Phe	Ala	Val
				485					490					495	
Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Asn	Pro	Val	Tyr
			500					505					510		
Arg	Asp	Val	Val	Asn	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Asp	Asn	Val	Thr	Ile	Arg
		515					520					525			
Phe	Arg	Thr	Asp	Asn	Pro	Gly	Pro	Trp	Phe	Leu	His	Cys	His	Val	Asp
	530					535					540				
Thr	His	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Thr	Val	Val	Met	Ala	Glu	Asp	Ile	Pro
545					550					555					560
Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Gln	Ala	Trp	Ser	Asp	Leu	Cys
				565					570					575	
Pro	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Gln					
			580					585							

<210> 21
 <211> 1764
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..1764
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="DNA 21D9"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 21
 atgagatttc cttcaatttt tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
 ccagtcaaaa ctacaacaaa agatgaaaca gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt 120

ES 2 525 195 A1

tactcagatt tagaagggga tttcgacgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat 180
aacggattat tgtttatgaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc 300
atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac 360
gtcttcccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc 420
gacaacatga ccaaccacac catgttgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc 480
cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgcc gatttctacc 540
gggcatgcgt tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctggtacttt ctggtaccac 600
agtcacttgt ccaactcaata ctgtgacggt ctcaggggtc cgattgttgt ctatgaccct 660
caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccaactgtaat cactctcgcg 720
gattggtacc acttggctgc caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt 780
atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgcc atttggctgt catcacggtc 840
acgaagggca agcgctatcg cttccgctg gtgtcgtctgt catgcgacct gaattacacg 900
ttcagcattg atggtcactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc 960
cagactgtcg actccatcca gatcttcct gccagcgggt actcgtttgt gctcaacgca 1020
gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc 1080
gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaaggtg ctgccccgt tgagcccacc 1140
acgaccaga cgccgtcgac gcagccttg gtggagtccg ccctgaccac tctcgaaggc 1200
accgctgcgc ccggcaacc gaccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc 1260
ggctttgccc gcggcaggtt caccatcaac ggcgcgagct tcacccgcc caccgtcccc 1320
gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctctccc ctctggaagt 1380
gtatactcgc tccctgcgaa cgcgacatt gaaatctccc tccccgccac ctccgccgcc 1440
cccggcttcc cgcaccccat ccaactgcac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc 1500
ggctcgtcga catacaacta cgcgaaccgg gtctaccggc acgtcgtcaa cacgggctcg 1560
cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac 1620
tgccacgtcg acgcgcacct tgaggctggg ttcacggtcg tcatggccga ggacattccc 1680
gacgtcggcg ctacgaacct ggtcccgcaa gcatggtcgg atctgtgccc gacctatgat 1740
gcgctctcgc ctgacgacca gtaa 1764

<210> 22
<211> 587
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Protein 21D9

<400> 22
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Lys Asp Glu Thr Ala Gln
24

ES 2 525 195 A1

580

585

<210> 23
 <211> 1764
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..1764
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="DNA 17D4"
 /mol_type="unassigned DNA"

```

<400> 23
atgagatttc cttcaatttt tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaaa ctacaacaaa agatgaaaca gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt      120
tactcagatt tagaagggga tttcgacggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat      180
aacggattat tgtttatgaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta      240
tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc      300
atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac      360
gtcttcccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc      420
gacaacatga ccaaccacac catgttgaag tccaccagta tccattggca cggttcttc      480
cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgcc gatttctacc      540
gggcatgcgt tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctgggtacttt ctggtaccac      600
agtcacttgt cactcaata ctgtgacggt ctcagggggtc cgattgttgt ctatgaccct      660
caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact cactgtaat cactctcgcg      720
gattggtacc acttggtcgc caaagtcggc cggcggccc cgactgccga tgctactctt      780
atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggctgt catcacggtc      840
acgaagggca agcgctatcg cttccgcctg gtgtcgtgt catgcgacc gaattacag      900
ttcagcattg atggtcactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc      960
cagactgtcg actccatcca gatcttccct gccagcgggt actcgtttgt gctcaacgca     1020
gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc     1080
gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaaggtg ctgcgcccgt tgagcccacc     1140
acgaccaga cgccgtcgac gcagccttg gtggagtccg cctgaccac tctcgaaggc     1200
accgctgcgc ccggcaacct gaccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc     1260
ggctttgccg gcggcaggtt caccatcaac ggcgcgagct tcaccccgc caccgtcccc     1320
gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt     1380
gtatactcgc tccctgcgaa cgcgacatt gaaatctccc tccccgccac ctccgccgcc     1440
cccggcttcc cgcaccccat ccacttgac gggcacacct tcgccgtcgt ggcgagcgcc     1500
ggctcgtcga catacaacta cgcgaacctg gtctaccgcg acgtcgtcaa cacgggctcg     1560
cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac     1620
tgccacgtcg acggccacct tgaggctggg ttcacggctc tcatggccga ggacattccc     1680
    
```

ES 2 525 195 A1

gacgtcgcgc ctacgaaccc ggtcccgcga gcatggtcgg atctgtgccc gacctatgat 1740
 gcgctctcgc ctgacgacca gtaa 1764

<210> 24
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Protein 17D4

<400> 24
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Lys Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Met Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val
 85 90 95
 Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser
 100 105 110
 Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr
 115 120 125
 Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr
 130 135 140
 Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe
 145 150 155 160
 Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys
 165 170 175
 Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp
 180 185 190
 Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys
 195 200 205
 Asp Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Val Tyr Asp Pro Gln Asp Pro His
 210 215 220
 Lys Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala
 225 230 235 240
 Asp Trp Tyr His Leu Ala Ala Lys Val Gly Pro Ala Ala Pro Thr Ala
 245 250 255
 Asp Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Ser Ile Asn Thr Leu Asn
 260 265 270
 Ala Asp Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Lys Gly Lys Arg Tyr Arg Phe
 275 280 285
 Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp
 290 295 300
 Gly His Ser Leu Thr Val Ile Glu Ala Asp Gly Val Asn Leu Lys Pro
 305 310 315 320
 Gln Thr Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Pro Ala Gln Arg Tyr Ser Phe
 325 330 335
 Val Leu Asn Ala Asp Gln Asp Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Leu
 340 345 350
 Pro Asn Ser Gly Thr Arg Asn Phe Asp Gly Gly Val Asn Ser Ala Ile
 355 360 365
 Leu Arg Tyr Glu Gly Ala Ala Pro Val Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr
 370 375 380
 Pro Ser Thr Gln Pro Leu Val Glu Ser Ala Leu Thr Thr Leu Glu Gly
 385 390 395 400
 Thr Ala Ala Pro Gly Asn Pro Thr Pro Gly Gly Val Asp Leu Ala Leu
 405 410 415
 Asn Met Ala Phe Gly Phe Ala Gly Gly Arg Phe Thr Ile Asn Gly Ala
 420 425 430
 Ser Phe Thr Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly
 27

ES 2 525 195 A1

```

      435                      440                      445
Ala Gln Ser Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Ser Leu
      450                      455                      460
Pro Ala Asn Ala Asp Ile Glu Ile Ser Leu Pro Ala Thr Ser Ala Ala
      465                      470                      475                      480
Pro Gly Phe Pro His Pro Ile His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val
      485                      490                      495
Val Arg Ser Ala Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Tyr Ala Asn Pro Val Tyr
      500                      505
Arg Asp Val Val Asn Thr Gly Ser Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg
      515                      520                      525
Phe Arg Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Val Asp
      530                      535                      540
Gly His Leu Glu Ala Gly Phe Thr Val Val Met Ala Glu Asp Ile Pro
      545                      550                      555                      560
Asp Val Ala Ala Thr Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys
      565                      570                      575
Pro Thr Tyr Asp Ala Leu Ser Pro Asp Asp Gln
      580                      585

```

```

<210> 25
<211> 1764
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..1764
<223> /organism="Artificial Sequence"
      /note="DNA 20C3"
      /mol_type="unassigned DNA"

```

```

<400> 25
atgagatttc cttcaatttt tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct      60
ccagtcaaaa ctacaacaaa agatgaaaca gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggg      120
tactcagatt tagaagggga tttcgacggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat      180
aacggattat tgtttatgaa tactactatt gcccagcattg ctgctaaaga agaaggggta      240
tctctcgaga aaagagagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc      300
atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac      360
gtcttcccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc      420
gacaacatga ccaaccacac catggtgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc      480
cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgcc gatttctacc      540
gggcatgcgt tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctggtacttt ctggtaccac      600
agtcacttgt cactcaata ctgtgacggt ctcaggggtc cgattgttgt ctatgacct      660
caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact cactgtaat cactctcgcg      720
gattggtacc acttggctgc caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt      780
atcaacggcc tcggtcgag catcaacacg ctcaacgccg atttggctgt catcacggtc      840
acgaagggca agcgctatcg cttccgcctg gtgtcgctgt catgcgacct gaattacacg      900
ttcagcattg atggtcactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc      960
cagactgtcg actccatcca gatcttccct gcccagcggg actcgtttgt gctcaacgca      1020
gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc      1080
gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaagggtg ctgcgcccgt tgagcccacc      1140

```

ES 2 525 195 A1

acgacccaga cgccgtcgac gcagcctttg gtggagtccg ccctgaccac tctcgaaggg 1200
accgctgcgc cgggcaaccc gaccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc 1260
ggctttgccg gcggcaggtt caccatcaac ggcgcgagct tcaccccgcc caccgtcccc 1320
gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt 1380
gtatactcgc tccttgcgaa cgcggacatt gaaatctccc tccccgccac ctccgccgcc 1440
cccggcttcc cgcaccccat ccacttgcac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc 1500
ggctcgtcga catacaacta cgcgaacccg gtctaccgag acgtcgtcaa cacgggctcg 1560
cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac 1620
tgccacgtcg accggcacct tgaggctggg ttcacggctg tcatggccga ggacattccc 1680
gacgtcgccg ctacgaaccc ggtcccgcaa gcatggctcg atctgtgccc gacctatgat 1740
gcgctctcgc ctgacgacca gtaa 1764

<210> 26
<211> 587
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Protein 20C3

<400> 26
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Lys Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60
Phe Met Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Thr Glu Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val
85 90 95
Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser
100 105 110
Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr
115 120 125
Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr
130 135 140
Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe
145 150 155 160
Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys
165 170 175
Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp
180 185 190
Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys
195 200 205
Asp Gly Leu Arg Gly Pro Ile Val Val Tyr Asp Pro Gln Asp Pro His
210 215 220
Lys Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp Asp Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala
225 230 235 240
Asp Trp Tyr His Leu Ala Ala Lys Val Gly Pro Ala Ala Pro Thr Ala
245 250 255
Asp Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Ser Ile Asn Thr Leu Asn
260 265 270
Ala Asp Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Lys Gly Lys Arg Tyr Arg Phe
275 280 285
Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp
29

ES 2 525 195 A1

	290					295					300					
Gly	His	Ser	Leu	Thr	Val	Ile	Glu	Ala	Asp	Gly	Val	Asn	Leu	Lys	Pro	
305					310					315					320	
Gln	Thr	Val	Asp	Ser	Ile	Gln	Ile	Phe	Pro	Ala	Gln	Arg	Tyr	Ser	Phe	
				325					330					335		
Val	Leu	Asn	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Asp	Asn	Tyr	Trp	Ile	Arg	Ala	Leu	
			340					345					350			
Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Arg	Asn	Phe	Asp	Gly	Gly	Val	Asn	Ser	Ala	Ile	
		355					360					365				
Leu	Arg	Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Pro	Val	Glu	Pro	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr	
	370					375					380					
Pro	Ser	Thr	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Gly	
385					390					395					400	
Thr	Ala	Ala	Pro	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Leu	
				405					410					415		
Asn	Met	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Gly	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Asn	Gly	Ala	
			420				425						430			
Ser	Phe	Thr	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Ser	Gly	
		435					440					445				
Ala	Gln	Ser	Ala	Gln	Asp	Leu	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Ser	Leu	
	450					455					460					
Pro	Ala	Asn	Ala	Asp	Ile	Glu	Ile	Ser	Leu	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	Ala	
465					470					475					480	
Pro	Gly	Phe	Pro	His	Pro	Ile	His	Leu	His	Gly	His	Thr	Phe	Ala	Val	
				485					490					495		
Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Asn	Pro	Val	Tyr	
			500						505				510			
Arg	Asp	Val	Val	Asn	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Asp	Asn	Val	Thr	Ile	Arg	
	515						520					525				
Phe	Arg	Thr	Asp	Asn	Pro	Gly	Pro	Trp	Phe	Leu	His	Cys	His	Val	Asp	
	530					535					540					
Arg	His	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Thr	Val	Val	Met	Ala	Glu	Asp	Ile	Pro	
545					550					555					560	
Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Gln	Ala	Trp	Ser	Asp	Leu	Cys	
				565					570					575		
Pro	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Gln						
			580					585								

<210> 27
 <211> 1764
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..1764
 <223> /organism="Artificial Sequence"
 /note="DNA 14C5"
 /mol_type="unassigned DNA"

<400> 27
 atgagatttc cttcaatfff tactgctgat ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
 ccagtcaaaa ctacaacaga agatgaaaca gcacaaattc cggtgaagc tgtcatcggc 120
 tactcagatt tagaagggga tttcgcaggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat 180
 aacggattat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
 tctctcgaga aaagaaagac tgaagctgag ttcagcattg ggccagtcgc agacctcacc 300
 atctccaacg gtgctgtcag tcccgatggt ttctctcggc aggccatcct ggtcaacgac 360
 gtcttcccca gtcccctcat tacggggaac aagggtgatc gtttccaact caatgtcatc 420
 gacaacatga ccaaccacac catgttgaag tccaccagta tccattggca cggcttcttc 480
 cagcacggca ccaactgggc cgacggcccc gccttcgtga accagtgcc gatttctacc 540
 gggcatgcgt tcctttacga cttccaggtc cctgaccaag ctggtacttt ctggtaccac 600

ES 2 525 195 A1

agtcacttgt ccaactcaata ctgtgacggt ctcagggggtc cgattgttgt ctatgaccct 660
 caagatcccc acaagagcct ttacgatggt gatgacgact ccaactgtaat cactctcgcg 720
 gattggtacc acttggctgc caaagtcggc ccggcggccc cgactgccga tgctactctt 780
 atcaacggcc tcggtcgcag catcaacacg ctcaacgccg atttggctgt catcacggtc 840
 acgaagggca agcgctatcg cttccgcctg gtgtcgtgt catgcgaccc gaattacacg 900
 ttcagcattg atggtcactc tctgaccgtc atcgaggcgg acggcgtgaa tctcaagccc 960
 cagactgtcg actccatcca gatcttccct gccacagcgg actcgtttgt gctcaacgca 1020
 gatcaggatg tggacaacta ctggatccgt gcccttccca actccgggac caggaacttc 1080
 gacggcggcg ttaactccgc catccttcgc tacgaaggty ctgccccgt tgagcccacc 1140
 acgaccaga cgccgtcgac gcagccttg gtggagtccg ccctgaccac tctcgaaggc 1200
 accgctgcgc ccggcaacc gaccctggc ggtgtcgacc tggctctcaa catggctttc 1260
 ggctttgccg gcggcaggtt caccatcaac ggcgcgagct tcaccccgcc caccgtcccc 1320
 gtcctcctgc agatcctgag cggcgcgcag tcggcgcagg acctcctccc ctctggaagt 1380
 gtatactcgc tcctgcgaa cgcggacatt gagatctccc tccccgccac ctccgccgcc 1440
 cccggcttcc cgcaccccat ccaattgcac gggcacacct tcgccgtcgt gcgcagcgcc 1500
 ggctcgtcga cgtacaacta cgcgaaccg gtctaccgcg acgtcgtcga cacgggctcg 1560
 cccggggaca acgtcacgat ccggttcagg acggacaacc ccggcccgtg gttcctccac 1620
 tgccacatcg actcccact tgaggccggg tttacggctg tcatggccga ggacattccc 1680
 gacgtcggc ctacgaacc ggtcccgcaa gcatggtcgg atctgtgccc gagctatgat 1740
 gcgctctcgc ctgacgacca gtaa 1764

<210> 28
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 14C5

<400> 28
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Lys Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Lys Thr Glu Ala Glu Phe Ser Ile Gly Pro Val
 85 90 95
 Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser
 100 105 110
 Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro Ser Pro Leu Ile Thr
 115 120 125
 Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Met Thr
 130 135 140
 Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe
 31

ES 2 525 195 A1

tctcggcagg ccatacctggt caacgacgtc ttccccagtc ccctcattac ggggaacaag 120
 ggtgatcggt tccaactcaa tgtcatcgac aacatgacca accacaccat gttgaagtcc 180
 accagtatcc attggcacgg cttcttccag cacggcacca actgggccga cggccccgcc 240
 ttcgtgaacc agtgcccgat ttctaccggg catgcttcc tttacgactt ccaggtccct 300
 gaccaagctg gtactttctg gtaccacagt cacttgcca ctcaatactg tgacgggtctc 360
 aggggtccga ttgttgctta tgaccctcaa gatccccaca agagccttta cgatgttgat 420
 gacgactcca ctgtaatcac tctcgcggat tgggtaccact tggctgccaa agtcggccccg 480
 gcggccccga ctgccgatgc tactcttata aacggcctcg gtcgcagcat caacacgctc 540
 aacgccgatt tggctgtcat cacggtcacg aagggaagc gctatcgctt ccgcctggtg 600
 tcgctgtcat gcgacccgaa ttacacgttc agcattgatg gtcactctct gaccgtcatc 660
 gaggcggacg gcgtgaatct caagccccag actgtcgact ccatccagat cttccctgcc 720
 cagcggactt cgtttgct caacgcagat caggatgtgg acaactactg gatccgtgcc 780
 ctcccaact cggggaccag gaacttcgac ggcggcggtta actccgccat ccttcgctac 840
 gaaggtgctg cgcccgttga gccaccacg acccagacgc cgtcgacgca gcctttggtg 900
 gagtccgcc tgaccactct cgaaggcacc gctgcgcccc gcaaccgcac ccctggcggg 960
 gtcgacctgg ctctcaacat ggctttcggc tttgccggcg gcaggttcac catcaacggc 1020
 gcgagcttca ccccgccac cgtccccgtc ctctgcaga tctgagcgg cgcgcagtcg 1080
 gcgcaggacc tctccctc tggaagtgta tactcgctcc ctgcgaacgc ggacattgag 1140
 atctccctcc ccgccacctc cgcgcccc ggcttcccgc accccttcca cttgcacggg 1200
 cacaccttcg ccgtcgtgcg cagcgcggc tcgtcgacgt acaactacgc gaaccgggtc 1260
 taccgcgacg tcgtcaacac gggctcgccc ggggacaacg tcacgatccg gttcaggacg 1320
 gacaaccccc gcccggtggt cctccactgc cacatcgact tccacctga ggctgggttc 1380
 acggtcgtca tggccgagga cattccccgac gtcgccgcta cgaaccgggt cccgcaagca 1440
 tggtcggatc tgtgccccgac ctatgatgcg ctctcgctg acgaccagta a 1491

<210> 30
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Parental Sequence

<400> 30
 Ser Ile Gly Pro Val Ala Asp Leu Thr Ile Ser Asn Gly Ala Val Ser
 1 5 10 15
 Pro Asp Gly Phe Ser Arg Gln Ala Ile Leu Val Asn Asp Val Phe Pro
 20 25 30
 Ser Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val
 35 40 45
 Ile Asp Asn Met Thr Asn His Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His
 50 55 60
 Trp His Gly Phe Phe Gln His Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala
 65 70 75 80
 Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ser Thr Gly His Ala Phe Leu Tyr Asp
 33

ES 2 525 195 A1

				85					90				95		
Phe	Gln	Val	Pro	Asp	Gln	Ala	Gly	Thr	Phe	Trp	Tyr	His	Ser	His	Leu
			100					105					110		
Ser	Thr	Gln	Tyr	Cys	Asp	Gly	Leu	Arg	Gly	Pro	Ile	Val	Val	Tyr	Asp
		115					120					125			
Pro	Gln	Asp	Pro	His	Lys	Ser	Leu	Tyr	Asp	Val	Asp	Asp	Asp	Ser	Thr
	130					135				140					
Val	Ile	Thr	Leu	Ala	Asp	Trp	Tyr	His	Leu	Ala	Ala	Lys	Val	Gly	Pro
145				150						155					160
Ala	Ala	Pro	Thr	Ala	Asp	Ala	Thr	Leu	Ile	Asn	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser
				165					170					175	
Ile	Asn	Thr	Leu	Asn	Ala	Asp	Leu	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Thr	Lys	Gly
			180					185					190		
Lys	Arg	Tyr	Arg	Phe	Arg	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Asp	Pro	Asn	Tyr
		195					200					205			
Thr	Phe	Ser	Ile	Asp	Gly	His	Ser	Leu	Thr	Val	Ile	Glu	Ala	Asp	Gly
	210					215					220				
Val	Asn	Leu	Lys	Pro	Gln	Thr	Val	Asp	Ser	Ile	Gln	Ile	Phe	Pro	Ala
225				230						235					240
Gln	Arg	Tyr	Ser	Phe	Val	Leu	Asn	Ala	Asp	Gln	Asp	Val	Asp	Asn	Tyr
				245					250					255	
Trp	Ile	Arg	Ala	Leu	Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Arg	Asn	Phe	Asp	Gly	Gly
			260					265					270		
Val	Asn	Ser	Ala	Ile	Leu	Arg	Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Pro	Val	Glu	Pro
		275					280					285			
Thr	Thr	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Thr	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Ser	Ala	Leu
		290				295					300				
Thr	Thr	Leu	Glu	Gly	Thr	Ala	Ala	Pro	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	Gly
305				310						315					320
Val	Asp	Leu	Ala	Leu	Asn	Met	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Gly	Gly	Arg	Phe
				325					330					335	
Thr	Ile	Asn	Gly	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Thr	Val	Pro	Val	Pro	Leu	Leu
			340					345				350			
Gln	Ile	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Ser	Ala	Gln	Asp	Leu	Leu	Pro	Ser	Gly
		355					360					365			
Ser	Val	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ala	Asn	Ala	Asp	Ile	Glu	Ile	Ser	Leu	Pro
	370					375					380				
Ala	Thr	Ser	Ala	Ala	Pro	Gly	Phe	Pro	His	Pro	Phe	His	Leu	His	Gly
385					390					395					400
His	Thr	Phe	Ala	Val	Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asn	Tyr
				405					410					415	
Ala	Asn	Pro	Val	Tyr	Arg	Asp	Val	Val	Asn	Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Asp
			420					425					430		
Asn	Val	Thr	Ile	Arg	Phe	Arg	Thr	Asp	Asn	Pro	Gly	Pro	Trp	Phe	Leu
		435					440					445			
His	Cys	His	Ile	Asp	Phe	His	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Thr	Val	Val	Met
	450					455					460				
Ala	Glu	Asp	Ile	Pro	Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Pro	Gln	Ala
465					470					475					480
Trp	Ser	Asp	Leu	Cys	Pro	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Gln
				485					490					495	