

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 410**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2011 E 11782732 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2635582**

54 Título: **Nuevos sustratos de coelenterazina y métodos de uso**

30 Prioridad:

02.11.2010 US 409422 P

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

22.04.2016

73 Titular/es:

**PROMEGA CORPORATION (100.0%)
2800 Woods Hollow Road
Madison, WI 53711-5399, US**

72 Inventor/es:

**KLAUBERT, DIETER H.;
MEISENHEIMER, PONCHO y
UNCH, JAMES**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 567 410 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos sustratos de coelenterazina y métodos de uso

5 Antecedentes

Se ha demostrado que la luciferasa secretada por el camarón de aguas profundas *Oplophorus gracilirostris* posee muchas características interesantes, tales como una alta actividad, un alto rendimiento cuántico y una amplia especificidad de sustrato (incluyendo, por ejemplo, la coelenterazina, así como diversos análogos de la coelenterazina). La reacción bioluminiscente de *Oplophorus* tiene lugar cuando la luciferasa de *Oplophorus* cataliza la oxidación de la coelenterazina (sustrato) con oxígeno molecular, dando lugar a una intensidad de luz máxima a 462 nm y a los productos CO₂ y coelenteramida (Shimomura *et al.*, *Biochemistry*, 17:994 (1978)). La luminiscencia óptima se produce a un pH 9 en presencia de NaCl 0,05-0,1 M a 40 °C y, debido a la resistencia inusual de esta enzima al calor, la luminiscencia visible se produce a temperaturas superiores a 50 °C, cuando se usa la enzima altamente purificada, o a más de 70 °C, cuando se usa la enzima parcialmente purificada. A pH 8,7, según lo publicado por Shimomura *et al.* (1978), la luciferasa natural tiene un peso molecular de aproximadamente 130 kDa, comprendiendo aparentemente cuatro monómeros de 31 kDa cada uno; a pH inferior, la luciferasa natural tiende a polimerizarse.

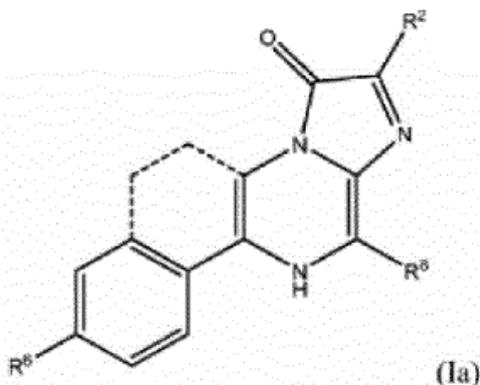
Trabajos posteriores han mostrado que la luciferasa de *Oplophorus gracilirostris* es un complejo de proteínas naturales de 35 kDa y 19 kDa, es decir, un heterotetrámero que consiste en dos componentes de 19 kDa y dos componentes de 35 kDa. Inouye *et al.* (2000) informaron de la clonación molecular de los ADNc que codifican las proteínas de 35 kDa y 19 kDa de luciferasa de *Oplophorus*, y la identificación del componente proteico que cataliza la reacción de luminiscencia. Los ADNc que codifican las proteínas se expresaron en células bacterianas y de mamíferos, y la proteína de 19 kDa se identificó como el componente capaz de catalizar la oxidación luminiscente de la coelenterazina (Inouye *et al.*, 2000).

La proteína de 19 kDa de la luciferasa de *Oplophorus* (acceso del GenBank BAB13776, 196 aminoácidos) parece ser el componente catalítico más pequeño que tiene función de luciferasa, y su estructura primaria no tiene similitud significativa con ninguna luciferasa publicada, incluyendo las luciferasas de imidazopirazinona (Lorenz *et al.*, PNAS EE.UU., 88: 4438 (1991); Thompson *et al.*, PNAS EE.UU., 86:6567 (1989)). La expresión de la proteína de 19 kDa en *E. coli* dio como resultado la formación de cuerpos de inclusión (Inouye y Sasaki, "Protein Expression and Purification", 56:261-268 (2007)). La formación de cuerpos de inclusión se debe probablemente a la inestabilidad de la proteína.

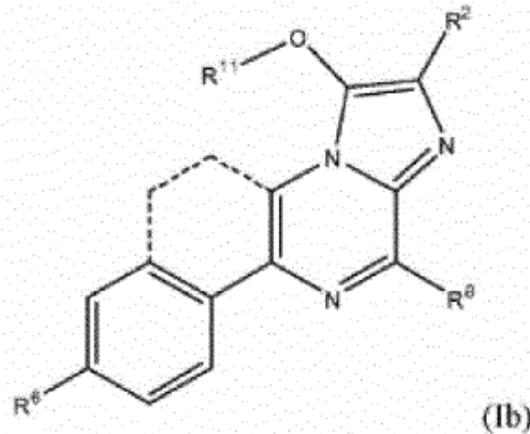
La especificidad de sustrato de la luciferasa de *Oplophorus* es inesperadamente amplia (Inouye y Shimomura. BBRC, 223:349 (1997)). Por ejemplo, la bisdesoxicoelenterazina (es decir, la coelenterazina-hh), un análogo de la coelenterazina, es un excelente sustrato para la luciferasa de *Oplophorus* comparable con la coelenterazina (Nakamura *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 38:6405 (1997)). Por otra parte, la luciferasa de *Oplophorus* es una enzima secretada, como la luciferasa del ostrácodo marino *Cypridina (Vargula) hilgendorffii* (Johnson y Shimomura, *Meth. Enzyme*, 57: 331 (1978)), que también usa una luciferina de tipo imidazopirazinona para emitir luz.

Sumario

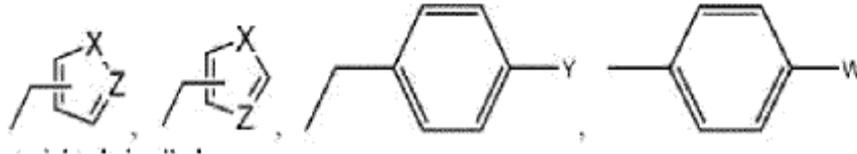
La divulgación del presente documento se refiere a un compuesto que puede ser de fórmula (Ia) o (Ib):



o

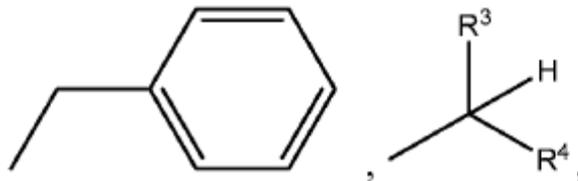


en las que R₂ se selecciona del grupo que consiste en alquilo de cadena lineal;



o C₂₋₅

- 5 R⁶ se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -NH₂, -OC(O)R o -OCH₂OC(O)R;
R⁸ se selecciona del grupo que consiste en



H o cicloalquilo inferior;

en la que R³ y R⁴ son ambos H o ambos alquilo C₁₋₂;

- 10 W es -NH₂, halo, -OH, -NHC(O)R, -CO₂R;

X es -S-, -O- o -NR²²;

Y es -H, -OH, o -OR¹¹;

Z es -CH- o -N-;

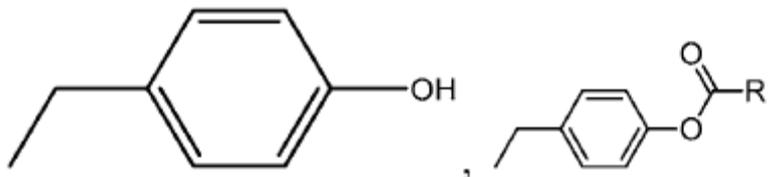
cada R¹¹ es, de manera independiente, -C(O)R" o -CH₂OC(O)R";

- 15 R²² es H, CH₃ o CH₂CH₃;

cada R es, de manera independiente, alquilo C₁₋₇ de cadena lineal o alquilo C₁₋₇ ramificado;

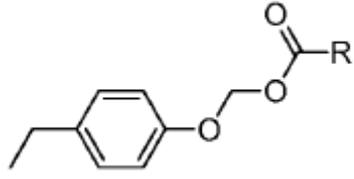
R" es alquilo C₁₋₇ de cadena lineal o alquilo C₁₋₇ ramificado;

los enlaces de trazos indican la presencia de un anillo opcional, que puede estar saturado o insaturado;
con la condición de que cuando R² sea

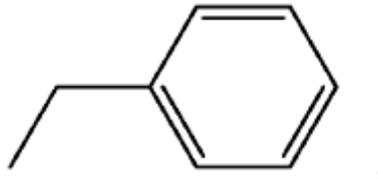


20

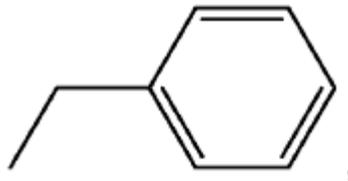
o



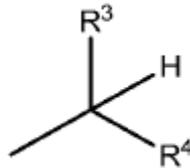
R⁸ no sea



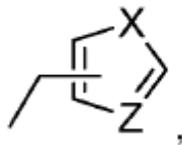
con la condición de que cuando R² sea



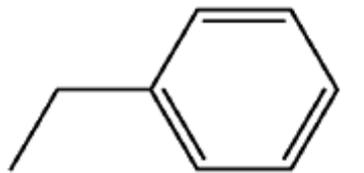
5 R⁸ sea



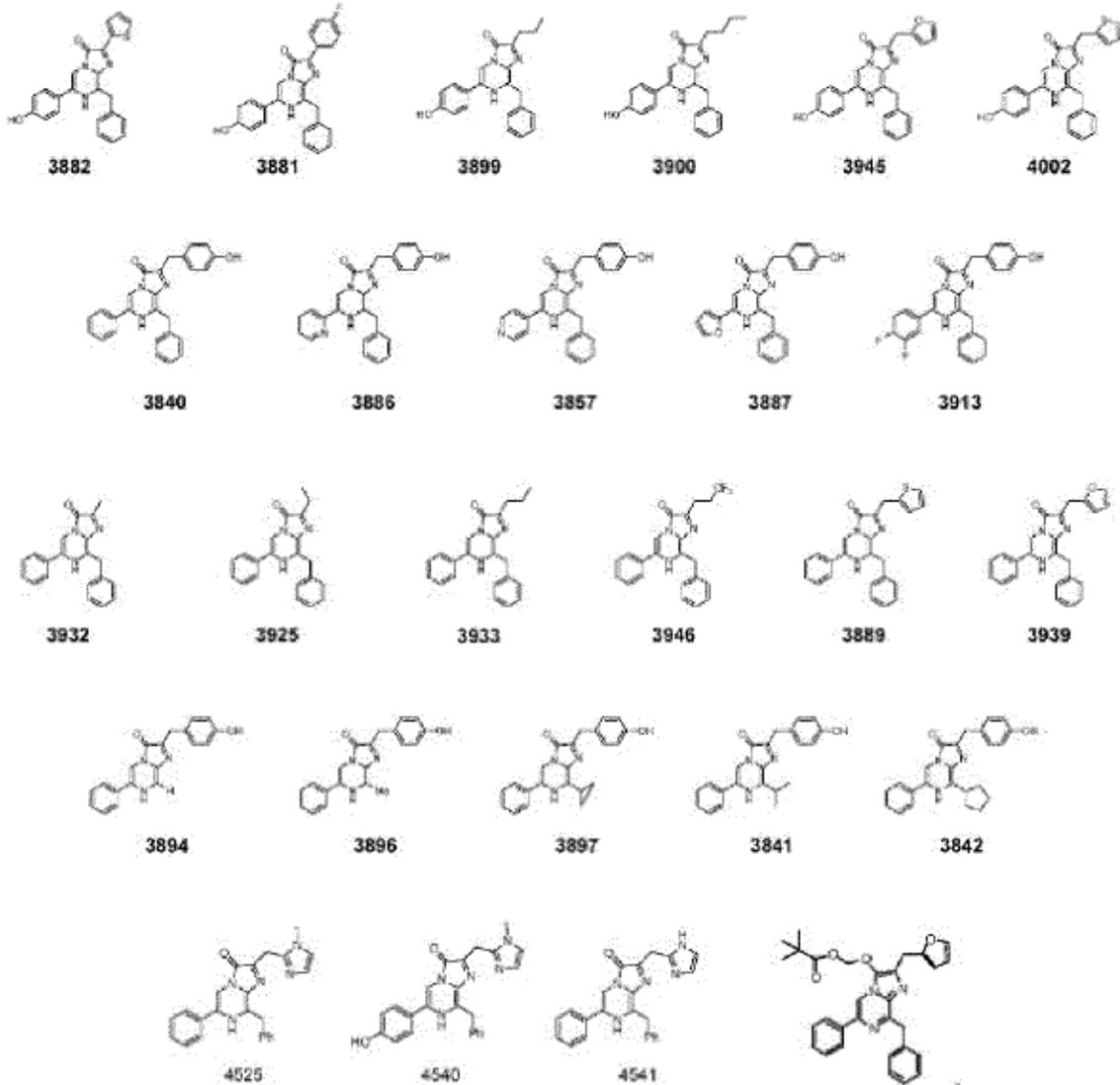
o cicloalquilo inferior; y
con la condición de que cuando R⁶ sea NH₂, R² sea



10 o alquilo C₂₋₅;
o R⁸ no sea



15 La divulgación del presente documento también se refiere a un compuesto que se puede seleccionar entre:



La divulgación del presente documento se refiere a un compuesto que puede ser de fórmula:



5 La divulgación del presente documento también se puede referir a un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 que comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a un aminoácido de SEQ ID NO: 1 en el que la variante polipeptídica de OgLuc tiene la luminiscencia potenciada.

10 La divulgación del presente documento también se puede referir a un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 que comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a un aminoácido de SEQ ID NO: 1, en el que la variante polipeptídica de OgLuc tiene la luminiscencia potenciada con respecto a un polipéptido de OgLuc de SEQ ID NO: 3, con la condición de que el polipéptido codificado por el polinucleótido no sea uno de los que se enumeran en la Tabla 47.

- 5 La divulgación del presente documento también se puede referir a un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 que comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a un aminoácido de SEQ ID NO: 1, en el que la variante polipeptídica de OgLuc tiene la luminiscencia potenciada con respecto a un polipéptido de SEQ ID NO: 31, con la condición de que el polipéptido codificado por el polinucleótido no sea SEQ ID NO: 3 ni 15.
- 10 La divulgación del presente documento también se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1, que comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a un aminoácido de SEQ ID NO: 1, en el que la variante polipeptídica de OgLuc tiene la luminiscencia potenciada con respecto a un polipéptido de SEQ ID NO: 29, con la condición de que el polipéptido codificado por el polinucleótido no sea SEQ ID NO: 3 ni 15.
- 15 La divulgación del presente documento se puede referir a un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a un polipéptido de OgLuc de SEQ ID NO: 1 que comprende las sustituciones de aminoácidos A4E, Q1 1R, A33K, V44I, P1 15E, Q124K, Y138I, N166R, I90V, F54I, Q18L, F68Y, L72Q y M75K correspondiente a SEQ ID NO: 1 y la variante polipeptídica de OgLuc que tiene actividad de luciferasa.
- 20 La divulgación del presente documento se puede referir a un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de OgLuc de SEQ ID NO: 1, en el que el aminoácido de la posición 4 es glutamato, de la posición 11 es arginina, de la posición 18 es leucina, de la posición 33 es lisina, de la posición 44 es isoleucina, de la posición 54 es isoleucina, de la posición 68 es tirosina, de la posición 72 es glutamina, de la posición 75 es lisina, de posición 90 es valina, de la posición 115 es glutamato, de la posición 124 es lisina, de la posición 138 es isoleucina y de la posición 166 es arginina correspondiente a SEQ ID NO: 1 y la variante polipeptídica de OgLuc que tiene actividad de luciferasa.
- 25 La divulgación del presente documento también se puede referir a un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de OgLuc de SEQ ID NO: 1 que comprende las sustituciones de aminoácidos A4E, Q11R, A33K, V44I, P115E, Q124K, Y138I, N166R, Q18L, F54I, L92H e Y109F correspondientes a SEQ ID NO: 1 y la variante polipeptídica de OgLuc que tiene actividad de luciferasa.
- 30 La divulgación del presente documento también se puede referir a un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de OgLuc de SEQ ID NO: 1 que comprende las sustituciones de aminoácidos A4E, Q11R, A33K, V44I, A54I, F77Y, I90V, P115E, Q124K, Y138I y N166R correspondientes a SEQ ID NO: 1 y la variante polipeptídica de OgLuc que tiene actividad de luciferasa.
- 35 La divulgación del presente documento también se puede referir a un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de OgLuc de SEQ ID NO: 1 que comprende las sustituciones de aminoácidos A4E, Q11R, A33K, V44I, A54I, F77Y, I90V, P115E, Q124K, Y138I y N166R correspondientes a SEQ ID NO: 1 y la variante polipeptídica de OgLuc que tiene actividad de luciferasa.
- 40 La divulgación del presente documento también se puede referir a un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de OgLuc de SEQ ID NO: 1, en el que el aminoácido de la posición 4 es glutamato, de la posición 11 es arginina, de la posición 18 es leucina, de la posición 33 es lisina, de la posición 44 es isoleucina, de la posición 54 es isoleucina, de la posición 92 es histidina, de la posición 109 es fenilalanina, de la posición 115 es glutamato, de la posición 124 es lisina, de la posición 138 es isoleucina y de la posición 166 es arginina correspondiente a SEQ ID NO: 1 y la variante polipeptídica de OgLuc que tiene actividad de luciferasa.
- 45 La divulgación del presente documento también se puede referir a un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de OgLuc de SEQ ID NO: 1, en el que el aminoácido de la posición 4 es glutamato, de la posición 11 es arginina, de la posición 33 es lisina, de la posición 44 es isoleucina, de la posición 54 es isoleucina, de la posición 77 es tirosina, de la posición 90 es valina, de la posición 115 es glutamato, de la posición 124 es lisina, de la posición 138 es isoleucina y de la posición 166 es arginina correspondiente a SEQ ID NO: 1 y la variante polipeptídica de OgLuc que tiene actividad de luciferasa.
- 50 La divulgación del presente documento también se puede referir a un polinucleótido aislado que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 19.
- 55 La divulgación del presente documento también se puede referir a un polinucleótido aislado que comprende el polinucleótido de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 88 o SEC ID NO: 92.
- 60 La divulgación del presente documento también se puede referir a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de luciferasa de decápodo que tiene al menos un 30 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, comprendiendo el polipéptido un patrón de secuencia correspondiente al patrón de secuencia de
- 65

Fórmula (VII) y que incluye no más de 5 diferencias, en el que las diferencias incluyen diferencias de las posiciones del patrón 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 15, 17 o 18 con respecto a la Fórmula (VII) de acuerdo con el patrón de OgLuc enumerado en la Tabla 4, así como huecos o inserciones entre cualquiera de las posiciones del patrón de Fórmula (VII) de acuerdo con el patrón de OgLuc enumerado en la Tabla 4, en el que la luciferasa de decápodo produce luminiscencia en presencia de una coelenterazina.

La divulgación del presente documento también se puede referir a una secuencia de nucleótidos sintética que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que comprende un fragmento de al menos 100 nucleótidos que tiene un 80 % o menos de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico parental que tiene la SEQ ID NO: 2 y que tiene un 90 % o más de identidad de secuencia de ácido nucleico con SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25 o el complemento de las mismas, en el que la reducción de la identidad de la secuencia se debe a diferentes codones de la secuencia de nucleótidos sintética con respecto a los codones de la secuencia de ácido nucleico parental, en la que la secuencia de nucleótidos sintética codifica una variante de OgLuc que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la luciferasa correspondiente codificada por la secuencia de ácido nucleico parental, y en la que la secuencia de nucleótidos sintética tiene un número reducido de secuencias reguladoras con respecto a la secuencia de ácido nucleico parental.

La divulgación del presente documento también se puede referir a una secuencia de nucleótidos sintética que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que comprende un fragmento de al menos 300 nucleótidos que tiene un 80 % o menos de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico parental que tiene la SEQ ID NO: 14 y que tiene un 90 % o más de identidad de secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23 o el complemento de las mismas, en la que la reducción de la identidad de la secuencia se debe a diferentes codones de la secuencia de nucleótidos sintética con respecto a los codones de la secuencia de ácido nucleico parental, en la que la secuencia de nucleótidos sintética codifica una luciferasa de luciérnaga que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la luciferasa correspondiente codificada por la secuencia de ácido nucleico parental, y en la que la secuencia de nucleótidos sintética tiene un número reducido de secuencias reguladoras con respecto a la secuencia de ácido nucleico parental.

La divulgación del presente documento también se puede referir a una secuencia de nucleótidos sintética que codifica una variante polipeptídica de OgLuc que comprende un fragmento de al menos 100 nucleótidos que tiene un 80 % o menos de una identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico parental que tiene la SEQ ID NO: 18 y que tiene un 90 % o más de identidad de secuencia de ácido nucleico con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25 o el complemento de las mismas, en la que la disminución de la identidad de secuencia se debe a diferentes codones de la secuencia de nucleótidos sintética con respecto a los codones de la secuencia de ácido nucleico parental, en la que la secuencia de nucleótidos sintética codifica una variante de OgLuc que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la luciferasa correspondiente codificada por la secuencia de ácido nucleico parental, y en la que la secuencia de nucleótidos sintética tiene un número reducido de secuencias reguladoras en relación con la secuencia de ácido nucleico parental.

La divulgación del presente documento también se puede referir a un péptido de fusión que comprende un péptido señal de *Oplophorus gracilirostris* fusionado a una proteína heteróloga, en el que dicho péptido señal es SEQ ID NO: 54, en el que el péptido de fusión es expresado en una célula y secretado de la célula.

La divulgación del presente documento también se puede referir a un método de generación de un polinucleótido que codifique una variante polipeptídica de OgLuc que comprenda: (a) el uso de una construcción de proteína de fusión parental que comprenda un polipéptido de OgLuc parental y al menos un polipéptido heterólogo para generar una biblioteca de variantes de proteínas de fusión; y (b) la exploración de la biblioteca en busca de al menos una de entre luminiscencia potenciada, estabilidad enzimática potenciada o biocompatibilidad potenciada con respecto a la construcción de proteína de fusión parental.

La divulgación del presente documento también se puede referir a un método de generación de polinucleótidos de codones optimizados que codifique una luciferasa para su uso en un organismo, que comprenda: para cada aminoácido de la luciferasa, seleccionar de manera aleatoria un codón de los dos codones más comúnmente usados que se usan en el organismo para codificar el aminoácido con el fin de producir un primer polinucleótido con codones optimizados.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra la estructura química de la coelenterazina natural, la bis-coelenterazina (coelenterazina-hh) conocida y la coelenterazina-h conocida, en las que R2, R6 y R8 representan las regiones de la molécula en las que se realizaron modificaciones.

La FIG. 2 muestra la estructura química de las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3889, PBI-394S, PBI-4002, PBI-3841, PBI-3897, PBI-3896, PBI-392S, PBI-3894, PBI-3932 y PBI-3840.

La FIG. 3 muestra la determinación de Km de PBI-3939.

La FIG. 4 muestra la estructura química de diversas coelenterazinas nuevas descritas en el presente documento.

Las FIG. 5A-G muestran la luminiscencia (URL) generada por células bacterianas lisadas que expresan C1+A4E usando coelenterazina natural, conocida y nueva como sustratos. Las FIG. 5A, 5C muestran las veces de reducción de la luminiscencia generada por C1+4AE usando los sustratos mostrados en la FIG. 5A en comparación con coelenterazina natural.

Las FIG. 6A-D muestran la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan diversas variantes de OgLuc usando coelenterazina natural ("Coelente"), coelenterazina-h conocida ("h"), coelenterazina-hh conocida ("h,h"), 2-metil-coelenterazina conocida ("2-me"), coelenterazina-v conocida ("v") y las coelenterazinas nuevas PBI-3840, PBI-3897, PBI-3889, PBI-3899, PBI-3900, PBI-3912, PBI-3913, PBI-3925, PBI-3897, PBI-3899, PBI-3889, PBI-3939, PBI-3933, PBI-3932, PBI-3946, PBI-3897, PBI-3841, PBI-3896, PBI-3925 y PBI-3945 como sustratos.

La FIG. 7 muestra las sustituciones de aminoácidos en diversas variantes de OgLuc.

La FIG. 8A-B muestran la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan variantes de OgLuc enumeradas en la FIG. 7 usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-h conocida ("H"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las coelenterazinas nuevas PBI-3840, PBI-3925, PBI-3912, PBI-3889, PBI-3939, PBI-3933, PBI-3932, PBI-3946, PBI-3941 y PBI-3896 como sustratos.

La FIG. 9 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan diversas variantes de OgLuc usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3840, PBI-3932, PBI-3925, PBI-3894 y PBI-3896 como sustratos.

La FIG. 10 muestra las sustituciones de aminoácidos en diversas variantes de OgLuc.

La FIG. 11 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan variantes de OgLuc enumeradas en la FIG. 10 usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las coelenterazinas nuevas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3840, PBI-3932, PBI-3925, PBI-3894 y PBI-3896, como sustratos.

La FIG. 12 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan variantes de OgLuc usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las coelenterazinas nuevas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889, PBI-3840, PBI-3932, PBI-3925, PBI-3894, PBI-3896 y PBI-3897 como sustratos.

La FIG. 13 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan variantes de OgLuc usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-hh conocida ("H,H") y las nuevas coelenterazinas PBI-3897, PBI-3896 y PBI-3894 como sustratos.

La FIG. 14 muestra las sustituciones de aminoácidos en diversas variantes de OgLuc.

La FIG. 15 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan variantes de OgLuc enumeradas en la FIG. 14 usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las coelenterazinas nuevas PBI-3897, PBI-3841, PBI-3896 y PBI-3894 como sustratos.

La FIG. 16 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan variantes de OgLuc usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-h conocida ("H"), coelenterazina-hh conocida ("HH") y las nuevas coelenterazinas PBI-3841 y PBI-3897 como sustratos.

La FIG. 17 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan diversas variantes de OgLuc y luciferasa de *Renilla* humanizada (hRL) usando coelenterazina natural ("Coel"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las coelenterazinas nuevas PBI-3897 y PBI-3841 como sustratos.

La FIG. 18 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan diversas variantes de OgLuc usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889 y PBI-4002 como sustratos.

La FIG. 19 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan diversas variantes de OgLuc usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-h conocida ("H"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889 y PBI-4002 como sustratos.

La FIG. 20 muestra las sustituciones de aminoácidos en diversas variantes de OgLuc.

La FIG. 21 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan variantes de OgLuc

que aparecen en la FIG. 20 usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-h conocida ("H"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las coelenterazinas nuevas PBI-3939, PBI-3945, PBI-4002, PBI-3932 y PBI-3840 como sustratos.

5 La FIG. 22 muestra las sustituciones de aminoácidos en diversas variantes de OgLuc.

La FIG. 23 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan variantes de OgLuc que aparecen en la FIG. 22 usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-h conocida ("H"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las coelenterazinas nuevas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889, PBI-4002, PBI-3932 y PBI-3840 como sustratos.

La FIG. 24 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan las diversas variantes OgLuc y hRL ("*Renilla*") usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-h conocida ("H"), coelenterazina-hh conocida ("H,H") y nuevas coelenterazinas PBI-3939 y PBI-3945 como sustratos.

La FIG. 25 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan diversas variantes de OgLuc y hRL ("*Renilla*") usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889 y PBI-4002 como sustratos.

20 La FIG. 26 muestra las sustituciones de aminoácidos en diversas variantes de OgLuc.

La FIG. 27 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan variantes de OgLuc que aparecen en la FIG. 26 usando coelenterazina natural ("Coelenterazina"), coelenterazina-h conocida ("H"), coelenterazina-hh conocida ("h,h") y las coelenterazinas nuevas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889 y PBI-4002 como sustratos.

La FIG. 28 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan diversas variantes de OgLuc y hRL ("*Renilla*") usando coelenterazina natural ("Coel."), Coelenterazina-h conocida ("H"), coelenterazina-hh conocida ("H,H") y las coelenterazinas nuevas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889 y PBI-4002 como sustratos.

La FIG. 29 muestra la luminiscencia de 9B8 opt y 9B8 opt+K33N en lisados bacterianos usando coelenterazina natural y PBI-3939 como sustratos y la especificidad relativa de estas variantes hacia PBI-3939 en comparación con coelenterazina natural.

35 Las FIG. 30A-D muestran el análisis de las mutaciones en la posición 166 usando coelenterazina natural (FIG. 30A), coelenterazina-h (FIG.30B) y PBI-399 (FIG. 30C).

La FIG. 31 muestra la luminiscencia de diferentes eliminaciones en la variante de OgLuc L27V, en la que (-) es el fondo de la máquina.

La FIG. 32 muestra la luminiscencia normalizada generada por células HEK293 lisadas que expresan hRL ("*Renilla*") usando coelenterazina natural como sustrato, luciferasa de luciérnaga (Luc2) usando luciferina (reactivo de ensayo BRIGHT-GLO™) como sustrato y diversas variantes de OgLuc usando la nueva PBI-3939 como sustrato.

La FIG. 33 muestra la estabilidad de la señal de IV y 15C1 en lisados bacterianos usando la nueva coelenterazina PBI-3945 como sustrato, e IV y 9B8 en lisados bacterianos usando la nueva coelenterazina PBI-3889 como sustrato.

Las FIG. 34A-B muestran la mayor actividad (FIG. 34A) y estabilidad de la señal (FIG. 34B) de la variante de OgLuc L27V en comparación con las luciferasas de luciérnaga (Fluc) y de *Renilla* (Rluc).

La FIG. 35 muestra la $V_{m\acute{a}x}$ (URL/s) y los valores de K_m (μM) para diversas variantes de OgLuc en lisados bacterianos usando la nueva coelenterazina PBI-3939 como sustrato.

La FIG. 36 muestra la $V_{m\acute{a}x}$ (URL/s) y los valores de K_m (μM) para diversas variantes de OgLuc en lisados bacterianos usando la nueva coelenterazina PBI-3939 como sustrato.

60 La FIG. 37 muestra la $V_{m\acute{a}x}$ (URL/s) y los valores de K_m (μM) para 9B8 opt y 9B8 opt+K33N tanto en lisados bacterianos usando la nueva coelenterazina PBI-3939 como sustrato.

La FIG. 38 muestra la estabilidad de la proteína a 50 °C de diversas variantes de OgLuc en lisados bacterianos usando coelenterazina natural como sustrato como la luminiscencia en $t = 0$ y la semivida en min.

65 Las FIG. 39A-B muestran la integridad estructural (determinada por la expresión, la estabilidad y la solubilidad,

como se muestra mediante el análisis de SDS-PAGE) en lisados bacterianos de diversas variantes de OgLuc a 25 °C (FIG. 39A) y 37 °C (FIG. 39B) en comparación con *Renilla* (hRL) y luciferasa de luciérnaga (Luc2).

5 Las FIG. 40A-B muestran la estabilidad de la proteína a 60 °C en lisados bacterianos de 9B8 opt y 9B8 opt+K33N usando la nueva coelenterazina PBI-3939 como sustrato como el logaritmo natural (ln) de la luminiscencia (en URL) frente al tiempo (FIG. 40A) y como la semivida en horas (FIG. 40B).

La FIG. 41 muestra el porcentaje de actividad de las variantes de OgLuc 9B8 y L27V a 60 °C.

10 Las FIG. 42A-B muestran la estabilidad proteica de la variante de OgLuc L27V a diversos pH (FIG. 42A) y las concentraciones de sal (FIG. 42B).

15 Las FIG. 43A-B muestra el análisis cromatográfico de filtración en gel de C1+A4E purificada (FIG. 43A) y 9B8 (FIG. 43B).

La FIG. 44 muestra el análisis cromatográfico de filtración en gel que demuestra que la variante de OgLuc L27V existe en una forma monomérica.

20 Las FIG. 45A-B muestran los niveles de expresión de proteínas de diversas proteínas de fusión de variante de OgLuc-HALOTAG[®] (HT7) en muestras de lisado bacteriano sin diluir y diluidas 1:1 analizadas por SDS-PAGE (FIG.45A) y los niveles de expresión de proteína normalizados (FIG. 45B).

25 Las FIG. 46A-B muestran la expresión de proteínas (FIG. 46A) y la solubilidad de las variantes de OgLuc 9B8 opt, V2 y L27V (FIG. 46B).

La FIG. 47 muestra la luminiscencia normalizada en URL generada por células HEK293 lisadas que expresan IV, 9B8 y hRL ("*Renilla*") usando coelenterazina natural y la nueva coelenterazina PBI-3939 como sustratos.

30 La FIG. 48 muestra la luminiscencia normalizada en URL generada por células HEK293 lisadas que expresan pF4Ag-Ogluc-9B8-HT7, pF4Ag-Luc2-HT7 y pF4Ag-*Renilla*-HT7 usando PBI-3939, luciferina (reactivo de ensayo BRIGHT-GLO[™]) y coelenterazina natural, respectivamente, como sustrato.

35 La FIG. 49 muestra la luminiscencia generada por células HEK293 lisadas que expresan 30 o 100 ng de ADN de plásmido que codifica bien 9B8 opt o 9B8 opt+K33N ("K33N") usando la nueva coelenterazina PBI-3939 como sustrato.

40 Las FIG. 50A-E muestran la luminiscencia de la variante de OgLuc L27V en comparación con la luciferasa de luciérnaga (Luc2) en células HEK293 (FIG. 50A) y células HeLa (no de fusión) (FIG. 50B), la luminiscencia de la fusión HALOTAG[®] en comparación con la variante de OgLuc L27V (FIG. 50C) y luciferasa de luciérnaga (Luc2) (FIG. 50D) y la expresión de proteínas de HALOTAG[®]-OgLuc L27V en comparación con HALOTAG[®]-luciferasa de luciérnaga (Luc2) en células HEK293 ("HEK") y células HeLa ("HeLa").

45 La FIG. 51 muestra el análisis de la inhibición de las variantes de OgLuc 9B8 y L27V contra una biblioteca de LOPAC para determinar su susceptibilidad a las interacciones fuera de diana.

Las FIG. 52A-E muestran el análisis de la inhibición de las variantes de OgLuc 9B8 y L27V por la suramina y Tyr ag 835 (FIG. 52A-C) y las estructuras químicas de la suramina (FIG. 52D) y Tyr ag 835 (FIG. 52E).

50 La FIG. 53 muestra la actividad de las variantes de OgLuc 9B8 y L27V que se analizó en presencia de BSA para determinar la resistencia a las interacciones de proteínas no específicas.

La FIG. 54 muestra el porcentaje de actividad de las variantes de OgLuc 9B8 y L27V para determinar la reactividad al plástico.

55 La FIG. 55 muestra la luminiscencia generada por células HEK293 que expresan el indicador de la transcripción de cAMP de IV en comparación con hRL ("*Renilla*") usando la coelenterazina-h conocida como sustrato con tratamiento de forskolina ("inducido") o sin tratamiento de forskolina ("basal"), y las veces de inducción (respuesta) debidas al tratamiento con forskolina ("veces").

60 La FIG. 56 muestra la luminiscencia normalizada generada por células HEK293 lisadas que expresan el indicador de la transcripción de cAMP de 9B8, 9B8 opt, hRL ("*Renilla*") o luciferasa de luciérnaga ("Luc2"), usando PBI-3939 (para 9B8 y 9B8 opt), coelenterazina natural (por hRL) o luciferina (reactivo de ensayo BRIGHT-GLO[™]; para Luc2) como un sustrato con ("+FSK") o sin ("-FSK") tratamiento de forskolina, y las veces de inducción (respuesta) debidas al tratamiento con forskolina ("VECES").

65 La FIG. 57 muestra la luminiscencia generada por células HEK293 lisadas que expresan los indicadores de la

transcripción de cAMP de 9B8 opt y 9B8 opt+K33N ("K33N") usando la nueva coelenterazina PBL-3939 como sustrato con ("inducido") o sin ("basal") tratamiento de forskolina, y las veces de inducción debidas al tratamiento con forskolina ("veces de inducción").

5 Las FIG. 58A-C muestran la luminiscencia de las construcciones de indicadores líticos de las variantes de OgLuc 9B8 y L27V para múltiples vías en múltiples tipos de células.

Las FIG. 59A-C muestran la luminiscencia de las construcciones de indicadores líticos de la variante de OgLuc L27V en diversas líneas celulares y con varios elementos de respuesta.

10 Las FIG. 60A-B muestran la luminiscencia del indicador secretable de la variante de OgLuc L27V en comparación con la luciferasa de *Metridia longa* con un promotor CMV (FIG. 60A) o un elemento de respuesta de NFκB (FIG. 60B).

15 Las FIG. 61A-F muestran la luminiscencia absoluta (FIG. 61A y 61B), la luminiscencia normalizada (FIG. 61C y 61D) y las veces de respuesta (FIG. 61E y 61F) de las versiones optimizadas de L27V (L27V01, L27V02 y L27V03) en comparación con L27V (L27V00) expresadas en células HeLa.

20 Las FIG. 62A-B muestran la luminiscencia del indicador de la variante de OgLuc secretada L27V02 (que contiene la señal de secreción de IL-6) (FIG. 62A) y los indicadores de L27V02 ("L27V(02)"), L27V02P ("L27V(02)P(01)") y luc2 ("Fluc") (FIG. 62A) expresados en células HepG2 tratadas con diversas dosis de rhTNFα ("TNFα").

25 La FIG. 63 muestra la luminiscencia generada a partir de medios y muestras de lisado de células HEK293 que expresan la variante de codones optimizados IV opt con o sin la secuencia señal de secreción usando la nueva PBI-3939 como sustrato en comparación con hRL ("*Renilla*") con o sin la secuencia de la señal de secreción usando coelenterazina natural como sustrato.

30 Las FIG. 64A-D muestran la luminiscencia de los indicadores de las variantes de OgLuc secretadas de 9B8, V2 y L27V expresados en células CHO (FIG. 64A y 64B) y HeLa (FIG. 64C y 64D).

Las FIG. 65A-B muestran una comparación de la luminiscencia de las variantes de OgLuc secretadas 9B8 y V2 usando PBI-3939 como sustrato con la de la luciferasa secretada de *Metridia longa* usando Ready-to-Glow™ como sustrato numéricamente (FIG. 65A) y gráficamente (FIG. 65B).

35 Las FIG. 66A-B muestran las veces de aumento de la luminiscencia frente al fondo generado por células HEK293 que expresan hRL ("*Ren*") y 9B8 opt usando los derivados de coelenterazina ENDUREN™ (FIG. 66A) y VIVIREN™ (FIG. 66B) y la nueva coelenterazina PBI-3939 (FIG. 66B) como sustratos.

40 Las FIG. 67A-D muestran imágenes confocales de células U2OS que expresan transitoriamente la fusión L27V-HALOTAG® (FIG. 67A) o la fusión IL-6-L27V (FIG. 67B-D). Barras de escala = 20 μm.

La FIG. 68 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan diversas variantes de OgLuc y hRL ("*Renilla*") en presencia ("Sand") o ausencia de fondo sándwich ("pF4Ag") usando coelenterazina natural como sustrato.

45 La FIG. 69 muestra las veces de reducción de la actividad de diversas variantes de OgLuc y hRL ("*Renilla*") debido a la presencia del fondo de sándwich usando coelenterazina natural como sustrato.

50 La FIG. 70 muestra las veces de reducción de la actividad de 9B8 opt y 9B8 opt+K33N en lisados bacterianos debido a la presencia del fondo de sándwich usando la nueva coelenterazina PBI-3939 como sustrato.

La FIG. 71 muestra el perfil espectral de la variante de OgLuc L27V.

55 La FIG. 72 muestra la luminiscencia de dos versiones permutadas circulares (CP) de la variante de OgLuc L27V, CP84 y CP95, bien sin enlazador o con un enlazador de 5, 10 o 20 aminoácidos.

60 Las FIG. 73A-G muestran la luminiscencia de las diversas construcciones de L27V CP con proteasa TEV expresadas en extracto de germen de trigo (FIG. 73A-D), *E. coli* (FIG. 73F-G) y células HEK293 (FIG. 73H). Las FIG. 73A-D muestran la luminiscencia basal de las diversas construcciones de L27V CP con proteasa TEV antes de la adición de TEV. La FIG. 73E muestra la respuesta de las diversas construcciones de L27V CP con proteasa TEV de las FIG. 73A-D.

La FIG. 74 muestra las veces de respuesta de diversos pares de L27V de complementación de proteínas.

65 Las FIG. 75A-C muestran la luminiscencia de diversos pares de L27V de complementación de proteínas (PCA): se fusionó un fragmento de L27V de cada par bien con FKBP o FRB usando una configuración de un 1/4 (FIG.

75A) o una configuración de 2/3 (FIG. 75B) y la interacción de FKBP y FRB controlada en células HEK293. También se controló la luminiscencia de diversos controles negativos de complementación de proteínas (PCA) (FIG. 75C).

5 Las FIG. 76A-H muestran la luminiscencia de diversos pares de L27V de complementación de proteínas (PCA): se fusionó un fragmento de L27V de cada par bien con FKBP o FRB usando una configuración de 2/3 (FIG. 76A y 76C) o una configuración de 1/4 (FIG. 76B y 76D), y la interacción de FKBP y FRB controlada en el extracto de germen de trigo (FIG. 76A y 76B) y lisado de reticulocitos de conejo (RRL) (FIG. 76C y 76D). También se controló la luminiscencia de diversos controles negativos de complementación de proteínas (PCA) (FIG. 76E) en el sistema libre de células. La configuración de 1/4 se usó en un sistema libre de células (FIG. 76F), células HEK293 (FIG. 76G) y en un sistema lítico (FIG. 76H).

15 Las FIG. 77A-C muestran la luminiscencia de diversos pares L27V de complementación de proteínas tratados con FK506 y rapamicina (FIG. 77A) y la estructura química de FK506 (FIG. 77A) y la rapamicina (FIG. 77B).

La FIG. 78 muestra la actividad del biosensor de cAMP de la variante de OgLuc 9B8 con el tratamiento de forskolina.

20 Las FIG. 79A-D muestran la luminiscencia de variantes L27V permutadas circularmente (FIG. 79A y 79C) y de división lineal (FIG. 79B y 79D) en lisado de reticulocitos de conejo (FIG. 79A-B) y células HEK293 (FIG. 79C-D).

Las FIG. 80A-B muestran la distribución subcelular de la variante de OgLuc L27V (FIG. 80A) y el vector de control pGEM3ZF (FIG. 80B) en células U2OS para diversos tiempos de exposición.

25 Las FIG. 81A-C muestran la ubicación subcelular de la variante de OgLuc L27V fusionada bien al factor de transcripción Nrf2 (FIG. 81B) o GPCR (FIG. 81C) en comparación con un control de L27V no fusionado (FIG. 81A).

30 Las FIG. 82A-C muestran el uso de la variante de OgLuc 9B8 opt para controlar las rutas de señalización intracelular usando PBI-4377 (FIG. 82A). La luciferasa 9B8 opt se fusionó bien a IκB (FIG. 82B) u ODD (dominio de degradación dependiente del oxígeno Hif-1α) (FIG. 82C), y se controlaron mediante luminiscencia las veces de respuesta a un estímulo (TNFα de IκB y fenantrolina para ODD).

35 Las FIG. 83A-C muestran el control de las vías de señales del estrés oxidativo usando la variante de OgLuc (FIG. 83A), L27V02 (FIG. 83B) o luciferasa de *Renilla* (Rluc) (FIG. 83C).

Las FIG. 84A-B muestran la comparación del sensor Nrf2-L27V02 (FIG. 84A) e indicador de Nrf2(ARE)-Luc2P (FIG. 84B).

40 Las FIG. 85A-B muestran los espectros de emisión de IV-HT7 con y sin ligando, usando TMR 1 μM (FIG. 85A) o Rodamina 110 10 μM (FIG. 85B) como un ligando para HT7 y coelenterazina-h como sustrato para IV.

45 La FIG. 86 muestra la luminiscencia generada por células bacterianas lisadas que expresan 9B8 opt mezclada con caspasa-3 (“+caspasa”) o sin caspasa 3 (“sin caspasa”) usando un sustrato de pro-coelenterazina.

50 Las FIG. 87A-C muestran la luminiscencia generada por variantes de L27V permutadas circularmente, de división lineal, CP84 y CP103, USANDO PBI-3939 como sustrato con (FIG. 87B) o sin (no mostrado) tratamiento de rapamicina, y la respuesta (FIG. 87C) debida al tratamiento de rapamicina. El concepto de las variantes permutadas circularmente, de división lineal se muestra en la FIG. 87A.

La FIG. 88 muestra el porcentaje de actividad restante de la variante L27V tras la exposición a diversas cantidades de urea.

La FIG. 89 muestra el efecto de la urea 3 M sobre la actividad de la variante L27V.

55 Las FIG. 90A-B muestran las imágenes de bioluminiscencia de la translocación del receptor nuclear (NR) inducida por hormonas de las fusiones de OgLuc usando el sustrato PBI-3939.

60 Las FIG. 91A-B muestran las imágenes de bioluminiscencia de la translocación de la proteína quinasa C alfa (PKC alfa) inducida por el éster de forbol de fusiones de OgLuc usando el sustrato PBI-3939.

Las FIG. 92A-B muestran las imágenes de bioluminiscencia de la translocación de proteínas autofagosómicas de las fusiones de OgLuc usando el sustrato PBI-3939.

Descripción detallada

En los métodos descritos en el presente documento, las etapas de proceso se llevan a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) y a presión atmosférica, a menos que se especifique lo contrario. Además, se entiende específicamente que cualquier intervalo numérico citado en el presente documento incluye todos los valores desde el valor más bajo hasta el valor más alto. Por ejemplo, si se cita un intervalo de concentraciones o un intervalo de efectos beneficiosos como del 1 % al 50 %, se pretende que valores tales como del 2 % al 40 %, del 10 % al 30 % o del 1 % al 3 % etc. se enumeren expresamente en la presente memoria descriptiva. De igual manera, si se da un intervalo de identidades de secuencia como de entre, por ejemplo, 60 % a < 100 %, se pretende que los valores intermedios tales como 65 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, etc. estén enumerados expresamente en la presente memoria descriptiva. Estos solo son ejemplos de lo que se pretende en concreto, estando todos los posibles valores numéricos desde el valor más bajo hasta el valor más alto considerados como expresamente expuestos en la solicitud.

A menos que se especifique expresamente lo contrario, la expresión “que comprende” se usa en el contexto de la presente divulgación para indicar que, opcionalmente, puede haber miembros adicionales presentes además de los miembros de la lista introducida por “que comprende”. Sin embargo, se contempla que, en la presente divulgación, la expresión “que comprende” puede englobar la posibilidad de que no haya más miembros adicionales presentes, es decir, “que comprende” se puede entender como que tiene el significado de “que consiste en”.

Salvo que se indique expresamente lo contrario, todas las indicaciones de cantidades relativas de la presente divulgación se realizan en peso/peso. Las indicaciones de cantidades relativas de un componente que se caracteriza por un término genérico pretenden referirse a la cantidad total de todas las variantes o los miembros específicos cubiertos por dicho término genérico. Si un determinado componente definido por un término genérico se especifica como presente en una cierta cantidad relativa y si este componente se caracteriza además por ser una variante o un miembro específico cubierto por el término genérico, se entiende que ninguna otra variante ni miembro cubiertos con el término genérico está, además, presente, de modo que la cantidad relativa total de los componentes cubiertos por el término genérico es superior a la cantidad relativa especificada. Más preferentemente, no hay otras variantes ni miembros cubiertos por el término genérico presentes en absoluto.

Visión de conjunto

La presente divulgación se refiere a nuevos compuestos, nuevas luciferasas y combinaciones de los mismos. En el presente documento, se desvelan métodos, composiciones y kits que incluyen los nuevos compuestos, nuevas luciferasas y/o combinaciones de los mismos.

Los nuevos compuestos son coelenterazinas nuevas, que pueden ser usadas como sustratos por las proteínas que utilizan las coelenterazinas para producir luminiscencia, incluyendo, pero sin limitación, las luciferasas y las fotoproteínas que se encuentran en diversos organismos marinos tales como cnidarios (por ejemplo, luciferasa de *Renilla*), medusa (por ejemplo, aequorina de la medusa *Aequorea*) y luciferasas de decápodos (por ejemplo, complejo de luciferasa de *Oplophorus gracilirostris*). Las nuevas coelenterazinas descritas en el presente documento pueden tener al menos una de entre una estabilidad física potenciada (por ejemplo, una estabilidad potenciada de la coelenterazina), una menor autoluminiscencia y una mayor biocompatibilidad con células (por ejemplo, ser menos tóxicas para las células, incluyendo tipos de células heterólogas) con respecto a la coelenterazina natural.

Las nuevas luciferasas desveladas en el presente documento incluyen variantes de la subunidad activa de una luciferasa de decápodos. Las nuevas luciferasas pueden utilizar diversas coelenterazinas como sustratos, incluyendo, pero sin limitación, coelenterazinas naturales y conocidas, así como las nuevas coelenterazinas desveladas en el presente documento. Las nuevas luciferasas muestran al menos una de entre: luminiscencia potenciada (incluyendo mayor brillo, mayor estabilidad de la señal y/o duración de la señal); mayor estabilidad enzimática (es decir, actividad enzimática potenciada incluyendo una resistencia potenciada a la temperatura elevada, cambios en el pH, inhibidores, desnaturalizantes y/o detergentes); alteración de la especificidad de sustrato (es decir, cambio en la especificidad de sustrato relativa); y una biocompatibilidad potenciada (incluyendo al menos uno de entre una mejor expresión en las células, menor toxicidad y/o estrés celular). En el presente documento, se describen nuevas luciferasas que pueden estar presentes en solución como, monómeros activos solubles, químicamente ligados a otras moléculas (por ejemplo, proteínas de fusión), o unidos a una superficie sólida (por ejemplo, partículas, capilares, o tubos de ensayo o placas).

Ciertas combinaciones de las nuevas coelenterazinas y las nuevas luciferasas proporcionan ventajas técnicas significativas para los ensayos bioluminiscentes incluyendo una luminiscencia potenciada, pudiendo deberse la luminiscencia potenciada a uno o más factores incluyendo estabilidad potenciada de la señal y estabilidad potenciada de la coelenterazina. Además, muchas de las nuevas coelenterazinas se diseñaron para que fueran más pequeñas que las coelenterazinas disponibles en el mercado y/o conocidas. En algunos casos, las nuevas luciferasas de la presente divulgación utilizan preferentemente las nuevas coelenterazinas de menor tamaño frente a las coelenterazinas de mayor tamaño disponibles en el mercado y/o conocidas.

En el presente documento, se desvelan combinaciones de: las nuevas variantes de luciferasa con las nuevas coelenterazinas; las nuevas variantes de luciferasa con coelenterazinas conocidas o naturales; y las nuevas coelenterazinas con cualquier proteína conocida o natural (por ejemplo, luciferasas o fotoproteínas) que usa la coelenterazina como sustrato.

5 El término "coelenterazina" se refiere a coelenterazina de origen natural ("natural"), así como análogos de las mismas, incluyendo coelenterazina-n, coelenterazina-f, coelenterazina-h, coelenterazina-hcp, coelenterazina-cp, coelenterazina-c, coelenterazina-e, coelenterazina-fcp, bis-desoxicoelenterazina ("coelenterazina-hh"), coelenterazina-i, coelenterazina-icp, coelenterazina-v y 2-metil-coelenterazina, además de las desveladas en el documento WO 2003/040100 y la solicitud de EE.UU. n.º de serie 12/056.073 (párrafo [0086]). El término "coelenterazina" también se refiere a las nuevas coelenterazinas desveladas en el presente documento (véase más adelante). La expresión "coelenterazina conocida" se refiere a un análogo de coelenterazina conocido antes de la presente divulgación.

15 El término "OgLuc" se refiere a una proteína luciferasa de decápodo, o una variante de dicha proteína, que genera luz en presencia de una coelenterazina. La proteína OgLuc puede, en su forma de origen natural, ser un monómero o puede ser una subunidad de un complejo de proteínas. La OgLuc usada en los ejemplos desvelados en el presente documento es la subunidad de 19 kDa del complejo de luciferasa de *Oplophorus gracilirostris*, aunque también se podrían emplear polipéptidos comparables de otras especies de decápodos (incluyendo otras especies de *Oplophorus*), y están incluidos dentro de la divulgación (véase R. D. Dennell, "Observations on the luminescence of bathypelagic Crustacea decapoda of the Bermuda area", *Zool. J Linn. Soc., Lond.* 42 (1955), pág. 393-406; véase también Poupin *et al.* Sept 1999. "Inventaire documente des especes et bilan des formes les plus communes de la mer d'Iroise". Rapport Scientifzque du Laboratoire d'Océanographie de l'Ecole Navale (LOEN), Brest (83pgs), incluyendo los ejemplos, sin limitación, luciferasas de la familia *Aristeidae*, incluyendo *Plesiopenaeus coruscans*; la familia *Pandalidea*, incluyendo *Heterocarpus* y *Parapandalus richardi*, la familia *Solenoceridae*, incluyendo *Hymenopenaeus debilis* y *Mesopenaeus tropicalis*; la familia *Luciferidae*, incluyendo *Lucifer typus*; la familia *Sergestidae*, incluyendo *Sergestes atlanticus*, *Sergestes arcticus*, *Sergestes armatus*, *Sergestes pediformis*, *Sergestes cornutus*, *Sergestes edwardsi*, *Sergestes henseni*, *Sergestes pectinatus*, *Sergestes sargassi*, *Sergestes similis*, *Sergestes vigilax*, *Sergia challengerii*, *Sergia grandis*, *Sergia lucens*, *Sergia prehensilis*, *Sergia potens*, *Sergia robusta*, *Sergia scintillans*, y *Sergia splendens*; la familia *Pasiphaeidae*, incluyendo *Glyphus marsupialis*, *Leptochela bermudensis*, *Parapasiphae sulcatifrons* y *Pasiphea tarda*; la familia *Oplophoridae*, incluyendo *Acanthephyra acanthitelsonis*, *Acanthephyra acutifrons*, *Acanthephyra brevirostris*, *Acanthephyra cucullata*, *Acanthephyra curtirostris*, *Acanthephyra eximia*, *Acanthephyra gracilipes*, *Acanthephyra kingsleyi*, *Acanthephyra media*, *Acanthephyra microphthalma*, *Acanthephyra pelagica*, *Acanthephyra prionota*, *Acanthephyra purpurea*, *Acanthephyra sanguinea*, *Acanthephyra sibogae*, *Acanthephyra stylostratis*, *Ephyrina bifida*, *Ephyrina figueirai*, *Ephyrina koskynii*, *Ephyrina ombango*, *Hymenodora glacialis*, *Hymenodora gracilis*, *Meningodora miccyla*, *Meningodora mollis*, *Meningodora vesca*, *Notostomus gibbosus*, *Notostomus auriculatus*, *Oplophorus gracilirostris*, *Oplophorus grintaldii*, *Oplophorus novaezealandiae*, *Oplophorus spinicauda*, *Oplophorus foliaceus*, *Oplophorus spinosus*, *Oplophorus typus*, *Systellaspis braueri*, *Systellaspis cristata*, *Sostellaspis debilis* y *Sostellaspis pellucida*; y la familia *Thalassocaridae*, incluyendo *Chlorotocoides spinicauda*, *Thalassocaris crinita* y *Thalassocaris lucida*.

La secuencia polipeptídica de la subunidad de 19 kDa madura (es decir, sin secuencia señal) de la forma natural de la luciferasa de *Oplophorus gracilirostris* (es decir, 169 aminoácidos, restos 28 a 196 de BAB 13776) se da en SEQ ID NO: 1. Se pueden insertar un resto de metionina y un resto de valina al principio de la secuencia de OgLuc sintética (por ejemplo, como se indica en la secuencia del polipéptido C1+A4E, SEQ ID NO: 3) para facilitar la clonación y la expresión en sistemas heterólogos. No obstante, por uniformidad, los números de posición de las diversas sustituciones de aminoácidos a las que se hace referencia en el presente documento, se especifican "en relación con" SEQ ID NO: 1, es decir, la secuencia polipeptídica de la subunidad de 19 kDa natural, madura (sin secuencia señal) del complejo de proteína luciferasa de *Oplophorus gracilirostris*.

50 En concreto, una proteína es una luciferasa de decápodos si, tras la alineación de su secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1, la identidad de secuencia es > 30 %, preferentemente > 40 % y lo más preferentemente > 50 %, y la proteína puede utilizar la coelenterazina como sustrato para catalizar la emisión de luminiscencia, comenzando la secuencia de aminoácidos en la posición correspondiente a la posición 8 de SEC ID NO: 1 es:

[GSAIVK]-{FE}-[FYW]-x-[LIVMFSYQ]-x-x-{K}-x-[NHGK]-x-[DE]-x-

[LIVMFY]-[LIVMWF]-x-{G}-[LIVMAKRG] (SEQ ID NO. 330) (VII),

55 con no más de 5 diferencias, o más preferentemente no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia, o lo más preferentemente, sin diferencias, produciéndose las diferencias en las posiciones correspondientes a la posición del patrón 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 15, 17 o 18 de la Fórmula (VII) de acuerdo con la Tabla 4. Las diferencias también pueden incluir huecos o inserciones entre las posiciones del patrón de la Tabla 4.

60 El término "variante" se refiere a una versión modificada de una secuencia polipeptídica o polinucleotídica de partida. El término "parental" es un término relativo que se refiere a una secuencia de partida, que se modifica después. La

secuencia parental, en general, se usa como una referencia para la proteína codificada por la secuencia modificada resultante, por ejemplo, para comparar los niveles de actividad u otras propiedades de las proteínas codificadas por las secuencias parental y modificada. La secuencia de partida puede ser una secuencia de origen natural (es decir, natural o de tipo silvestre). La secuencia de partida también puede ser una secuencia de variante que luego se modifica adicionalmente. Una secuencia polipeptídica está "modificada" cuando uno o más aminoácidos (que pueden ser de origen natural o sintético) están sustituidos, eliminados y/o añadidos al principio, en la mitad y/o al final de la secuencia. Una secuencia polinucleotídica está "modificada" cuando uno o más nucleótidos están sustituidos, eliminados y/o añadidos al principio, en la mitad y/o al final de la secuencia, pero que pueden o no alterar el aminoácido codificado por la secuencia. Las modificaciones pueden producir una variante que sea un fragmento funcional de una determinada OgLuc o variante de OgLuc. Un fragmento funcional es un fragmento que es menor que una secuencia parental de longitud completa que tiene la misma actividad funcional que la secuencia parental de longitud completa. La actividad funcional es la capacidad de mostrar luminiscencia. Las modificaciones pueden producir una variante que sea una secuencia permutada de la secuencia parental, tal como una secuencia permutada circularmente y secuencias permutadas que comprenden eliminaciones e/o inserciones.

Varias de las variantes de OgLuc desveladas en el presente documento han recibido nombres abreviados para facilitar la descripción. El término "C1+A4E" (también conocida como "CIA4E") se refiere a una variante particular de OgLuc con las sustituciones de aminoácidos A4E, Q11R, A33K, V44I, A54F, P115E, Q124K, Y138I y N166R relativos a la SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 2 y 3) (donde el formato "xn.y" indica un aminoácido parental "x" en una posición "n." que se cambia al aminoácido de la variante "y"). Las variantes de la variante de OgLuc C1+A4E que se presentan en el presente documento contienen al menos las sustituciones de aminoácidos que se encuentran en C1+A4E, a menos que se indique lo contrario. El término "IVY" se refiere a una variante de la variante de OgLuc C1+A4E que tiene sustituciones de aminoácidos adicionales F54I, I90V y F77Y con respecto a SEC ID NO: 1 (SEQ ID NO: 8 y 9). El término "IV" se refiere a otra variante de la variante de OgLuc C1+A4E, que tiene sustituciones de aminoácidos adicionales F54I e I90V con respecto a SEC ID NO: 1 (SEQ ID NOS: 14 y 15). El término "QC27" se refiere a otra variante más de la variante de OgLuc C1+A4E, que tiene las sustituciones de aminoácidos adicionales Q18L, F54I, L92H y Y109F con respecto a SEC ID NO: 1 (SEQ ID NO: 4 y 5). El término "QC27-9a" se refiere a una variante de la variante de OgLuc QC27 con las sustituciones de aminoácidos adicionales V21L, F68Y, L72Q, M75K, H92R y V158F en comparación con SEC ID NO: 1 (SEQ ID NO: 6 y 7). El término "9B8" se refiere a una variante de la variante de OgLuc IV con las sustituciones de aminoácidos adicionales Q18L, F68Y, L72Q y M75K en comparación con SEC ID NO: 1 (SEQ ID NO: 18 y 19). El término "9B8 opt" se refiere a la versión de codón optimizado de la variante 9B8 (SEQ ID NO: 24). El término "9B8 opt+K33N" se refiere a una variante de la variante 9B8 opt con la sustitución de aminoácido adicional K33N en comparación con SEC ID NO: 1 (SEQ ID NO: 42 y 43). El término "9B8 opt+K33N+170G" se refiere a una variante de la variante "9B8 opt+K33N" con una glicina adicional añadida al extremo C-terminal de la variante, es decir, 170G en comparación con SEC ID NO: 1 (SEQ ID NO: 68 y 69). Los términos "L27V+T39T+K43R+Y68D" y "L27V" se refieren a una variante de la variante "9B8 opt+K33N" con las sustituciones de aminoácidos adicionales L27V, T39T, K43R y Y68D con respecto a SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 88 y 89). Los términos "T39T+K43R+Y68D" y "V2" se refieren a una variante de la variante "9B8 opt+K33N" con las sustituciones de aminoácidos adicionales T39T, K43R y Y68D en comparación con SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 92 y 93).

En general, "potenciado/a" significa que la propiedad en particular (por ejemplo, luminiscencia, estabilidad de la señal, biocompatibilidad, estabilidad de la proteína (por ejemplo, la estabilidad de la enzima), o la expresión de proteínas) es mayor en relación con la de la luciferasa de referencia más la combinación de coelenterazina o luciferasa en consideración, siendo el aumento del al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 90 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 500 % o al menos 1000 % mayor que la luciferasa de referencia más la combinación de coelenterazina o luciferasa en consideración.

El término "luminiscencia" se refiere a la producción de luz de la variante de OgLuc en condiciones apropiadas, por ejemplo, en presencia de un sustrato adecuado tal como una coelenterazina. La producción de luz se puede medir como una medida instantánea o casi instantánea de la producción de luz (que a veces se denomina luminiscencia "T = 0" o "ultrarrápida") al inicio de la reacción de luminiscencia, que se puede iniciar tras la adición del sustrato de coelenterazina. La reacción de luminiscencia se puede llevar a cabo en una solución. La reacción de luminiscencia también se puede llevar a cabo sobre un soporte sólido. La solución puede contener un lisado, por ejemplo, de las células en un sistema de expresión procarionota o eucariota. La expresión se puede producir en un sistema libre de células, o la proteína luciferasa se puede secretar en un medio extracelular, de modo que, en este último caso, no sea necesario producir un lisado. La reacción se puede iniciar mediante la inyección de materiales apropiados, por ejemplo, coelenterazina, tampón, etc., en una cámara de reacción (por ejemplo, un pocillo de una placa de múltiples pocillos tal como una placa de 96 pocillos) que contenga la proteína luminiscente. La variante de OgLuc y/o la nueva coelenterazina se pueden introducir en un hospedador, realizándose las mediciones de luminiscencia en el hospedador o en una parte del mismo, que puede incluir un organismo completo o células, tejidos, explantes o extractos de los mismos. La cámara de reacción puede estar situada en un dispositivo de lectura que pueda medir la producción de luz, por ejemplo, usando un luminómetro o fotomultiplicador. La producción de luz o luminiscencia también se pueden medir a lo largo del tiempo, por ejemplo, en la misma cámara de reacción durante un período de segundos, minutos, horas, etc. La producción de luz o luminiscencia se pueden presentar como la media a lo largo

del tiempo, la semivida de descomposición de la señal, la suma de la señal durante un período de tiempo o la producción máxima. La luminiscencia puede medirse en unidades relativas de luz (URL).

La "luminiscencia potenciada" de una variante de OgLuc se puede deber a una o más de las siguientes características: una mayor producción de luz (es decir, brillo), mayor especificidad de sustrato, estabilidad de la señal potenciada y/o duración de la señal potenciada. La estabilidad de la señal potenciada incluye un aumento en el tiempo durante el que la señal de una luciferasa sigue en luminiscencia, por ejemplo, medido por la semivida de descomposición de la señal en un curso de tiempo. La luminiscencia potenciada se puede determinar con respecto a la propiedad comparable de una luciferasa tal como OgLuc de tipo silvestre, una proteína variante de OgLuc, luciferasa de *Renilla* (por ejemplo, hRluc) o luciferasa de luciérnaga (por ejemplo, la luciferasa Luc2 de *Photinus pyralis*) combinada con un sustrato natural conocido o nuevo, como se muestra en los siguientes Ejemplos. Por ejemplo, la luminiscencia de una variante de OgLuc dada en combinación con un determinada coelenterazina (incluyendo coelenterazinas naturales, conocidas o nuevas) se puede comparar con las propiedades de una de las variantes de OgLuc C1+A4E, IV o IVY en combinación con cualquiera de entre una coelenterazina natural, conocida o nueva desvelada en el presente documento, usando uno o más de los ensayos desvelados en los Ejemplos siguientes. En particular, la luminiscencia potenciada se puede determinar mediante la medición de la señal de luminiscencia (URL) procedente de la incubación de lisados bacterianos que contienen variantes de OgLuc en cuestión con el sustrato, PBI-3939. Las mediciones se realizan en un reactivo que puede contener TERGITOL™ para proporcionar una cinética de tipo Glo, por ejemplo, en el que se ralentiza la inactivación de la enzima y se estabiliza la señal de luminiscencia, lo que se describe en otra parte de la solicitud. Algunas variantes de la luciferasa, por ejemplo, L27V, con ciertos compuestos, por ejemplo, PBI-3939, proporcionan una duración prolongada de la emisión luminiscente o cinética de tipo resplandor, en ausencia de TERGITOL™. La señal de luminiscencia se puede comparar con la de un punto de referencia, tal como la variante C1+A4E con coelenterazina o coelenterazina-h o luciferasa de *Renilla* con coelenterazina natural.

"Estabilidad enzimática" se refiere a la estabilidad de la actividad enzimática (es decir, la tolerancia de la actividad enzimática a las condiciones de reacción). La estabilidad enzimática potenciada se refiere a la estabilidad potenciada de la actividad enzimática (es decir, la tolerancia potenciada a las condiciones de reacción). La estabilidad enzimática potenciada incluye una estabilidad térmica potenciada (por ejemplo, la estabilidad a temperaturas elevadas) y la estabilidad química (por ejemplo, la estabilidad en presencia de inhibidores o agentes desnaturizantes tales como detergentes, incluyendo, por ejemplo, TRITON™ X-100). La estabilidad enzimática se puede usar como una medida de la estabilidad de la proteína, sobre todo en condiciones conocidas por ser perjudiciales para la estructura proteica, tales como las altas temperaturas o la presencia de desnaturizantes químicos. En particular, estabilidad de la proteína potenciada se puede determinar usando el análisis térmico como se describe en otra parte de la solicitud (por ejemplo, en el Ejemplo 28). La señal de luminiscencia se puede comparar con el punto de referencia de la variante C1+A4E con coelenterazina o coelenterazina-h o luciferasa de *Renilla* con coelenterazina natural.

"Biocompatibilidad" se refiere a la tolerancia de una célula (por ejemplo, procariota o eucariota) a una luciferasa y/o compuesto de coelenterazina. La biocompatibilidad de una luciferasa y/o compuesto de coelenterazina está relacionada con el estrés que provoca en la célula hospedadora. Por ejemplo, una luciferasa que no es tolerada por la célula (es decir, una que estrese a una célula) no se puede expresar eficazmente dentro de la célula, por ejemplo, la luciferasa se puede expresar dentro de la célula, pero muestra actividad reducida debido a la formación de cuerpos de inclusión por la proteína expresada. La biocompatibilidad de una luciferasa se relaciona con la capacidad de las células para tolerar la inserción del gen foráneo, es decir, un transgén que contiene el gen que codifica la luciferasa o el fragmento de la misma, con lo que las células con el transgén no presentan manifestaciones de estrés, incluyendo la inducción de las vías de respuesta al estrés, la reducción de la tasa de crecimiento y/o la reducción de la viabilidad (por ejemplo, menor número de células vivas, menor integridad de la membrana o mayores velocidades de apoptosis). Otras indicaciones de estrés celular pueden incluir cambios en la expresión génica, las vías de señalización y/o las vías de regulación. La biocompatibilidad potenciada de una variante de OgLuc se puede deber a factores tales como la expresión de proteínas potenciada y/o el menor estrés celular. La expresión potenciada de luminiscencia para un determinado polinucleótido, que codifica una variante de OgLuc se puede determinar en relación con los niveles de expresión de luminiscencia para un polinucleótido que codifica OgLuc de tipo silvestre o una proteína variante de OgLuc, incluyendo polinucleótidos de codones optimizados, en los que la actividad de luminiscencia se puede usar como un medio para controlar los niveles de expresión de proteínas.

En particular, la biocompatibilidad potenciada de la variante de OgLuc, el nuevo compuesto de coelenterazina y/o una combinación de los mismos se puede determinar mediante la medición de la viabilidad celular y/o la tasa de crecimiento de las células. Por ejemplo, la biocompatibilidad potenciada de las variantes de OgLuc se puede determinar mediante la medición de la viabilidad celular y/o la tasa de crecimiento de las células que contienen las variantes de OgLuc en comparación con las células que contienen luciferasa de luciérnaga o de *Renilla* o sin luciferasa, en ausencia de cualquier compuesto de coelenterazina para determinar el grado de compatibilidad y/o toxicidad de la luciferasa en las células. La biocompatibilidad potenciada de los nuevos compuestos de coelenterazina se puede determinar mediante la medición de la viabilidad celular en ausencia de la expresión de luciferasa de las células expuestas al nuevo compuesto de coelenterazina en comparación con coelenterazinas naturales o conocidas para determinar el grado de compatibilidad y/o toxicidad del compuesto de coelenterazina en

las células. La biocompatibilidad potenciada de una combinación de una variante de OgLuc con un nuevo compuesto de coelenterazina se puede determinar mediante la medición de la viabilidad celular y/o de la tasa de crecimiento de las células que contienen la variante de OgLuc y expuestas a la nueva coelenterazina y en comparación con las células que contienen la luciferasa de luciérnaga o de *Renilla* o sin luciferasa y expuestas a coelenterazinas naturales o conocidas.

En particular, la biocompatibilidad potenciada se puede determinar usando el análisis de la viabilidad celular como se describe en otra parte de la solicitud (por ejemplo, usando un ensayo CellTiter-GLO® como se describe en el Ejemplo 18 o un ensayo de apoptosis, tal como aquel en el que se usa la tecnología CASPASE-GLO® de acuerdo con las instrucciones del fabricante) o uno conocido en la técnica. El efecto de una variante de OgLuc sobre la viabilidad celular o la apoptosis se puede comparar con el efecto de una luciferasa de referencia, tal como la variante C1+A4E, una luciferasa de luciérnaga o luciferasa de *Renilla*. El efecto del nuevo compuesto de coelenterazina sobre la viabilidad celular o la apoptosis se puede comparar con el efecto de los compuestos de coelenterazina naturales o conocidos sobre la viabilidad o la apoptosis celular.

La biocompatibilidad potenciada también se puede determinar midiendo el efecto de la variante de OgLuc y/o el nuevo compuesto de coelenterazina sobre el crecimiento celular o la expresión génica. Por ejemplo, la biocompatibilidad potenciada de la variante de OgLuc se puede determinar midiendo el número de células después de un período de tiempo o mediante la determinación de la expresión de genes de respuesta al estrés en una muestra de células que contenga la variante de OgLuc en comparación con las células que contienen otra luciferasa o sin luciferasa. La biocompatibilidad potenciada del nuevo compuesto de coelenterazina se puede determinar midiendo el número de células después de un período de tiempo o mediante la determinación de la expresión de genes de respuesta al estrés en una muestra de células que estén expuestas al nuevo compuesto coelenterazina en comparación con las células expuestas a coelenterazinas naturales o conocidas, o sin coelenterazinas. El efecto de la variante de OgLuc sobre el crecimiento celular o la expresión génica se puede comparar con una luciferasa de referencia, tal como la variante C1+A4E, una luciferasa de luciérnaga o luciferasa de *Renilla*. El efecto de la nueva coelenterazina sobre el crecimiento celular o la expresión génica se puede comparar con coelenterazinas naturales o conocidas.

La identificación de líneas celulares estables, sólidas, que expresen una variante de OgLuc de la presente divulgación, ya sea en el citoplasma o como una forma secretada, puede verse facilitada por la señal brillante de la luciferasa y el pequeño tamaño del gen OgLuc. Se espera que la secuencia de genes relativamente pequeña reduzca la probabilidad de inestabilidad genética resultante de la integración del ADN foráneo en el genoma de una célula. Como resultado del aumento de brillo de las variantes de OgLuc y/o de las nuevas coelenterazinas según lo desvelado en el presente documento, menos expresión de proteínas y, por tanto, menos ADN necesario para la transfección, puede producir un nivel dado de brillo en comparación con otras luciferasas conocidas tales como luciferasa OgLuc natural, de luciérnaga o de *Renilla*, lo que contribuye a una biocompatibilidad potenciada para las variantes de OgLuc y/o las nuevas coelenterazinas. La biocompatibilidad potenciada de las variantes de OgLuc se puede medir mediante la cantidad de ADN o de los reactivos, por ejemplo, productos químicos de transfección, necesaria en las transfecciones transitorias para generar células con el mismo nivel de luminiscencia que las células transfectadas con otras luciferasas, por ejemplo, luciferasa OgLuc natural, de luciérnaga o de *Renilla*. La cantidad de ADN de la variante de OgLuc o reactivos necesaria para la transfección es inferior a la cantidad necesaria para otra luciferasa, por ejemplo, OgLuc natural, luciferasa de luciérnaga o de *Renilla*, para generar células transfectadas con el mismo nivel de luminiscencia obtenido con la otra luciferasa. La biocompatibilidad potenciada de las variantes de OgLuc se puede medir por el tiempo de recuperación de las células tras la transfección. La cantidad de tiempo necesaria para la recuperación después de la transfección con la variante de OgLuc puede ser inferior al tiempo necesario para otra luciferasa, por ejemplo, luciferasa OgLuc natural, de luciérnaga o de *Renilla*.

La "especificidad de sustrato relativa" se determina dividiendo la luminiscencia de una luciferasa en presencia de un sustrato de coelenterazina de ensayo entre la luminiscencia de la luciferasa en presencia de un sustrato de coelenterazina de referencia. Por ejemplo, la especificidad relativa se puede determinar dividiendo la luminiscencia de una luciferasa con una coelenterazina nueva descrita en el presente documento entre la luminiscencia de la luciferasa con una coelenterazina diferente (por ejemplo, coelenterazina natural o conocida, véase la FIG. 1 para consultar ejemplos, o una nueva coelenterazina diferente de la presente divulgación). El sustrato de coelenterazina de ensayo y el sustrato de coelenterazina de referencia que se comparan se consideran un par de sustratos de comparación para determinar la especificidad de sustrato relativa.

Un "cambio en la especificidad de sustrato relativa" se determina dividiendo la especificidad de sustrato relativa de una luciferasa de ensayo usando un par de sustratos de comparación entre la especificidad de sustrato relativa de una luciferasa de referencia usando el mismo par de sustratos de comparación. Por ejemplo, un cambio en la especificidad relativa se puede determinar dividiendo la especificidad de sustrato relativa de una luciferasa de ensayo con una nueva coelenterazina desvelada en el presente documento en comparación con una coelenterazina diferente (por ejemplo, coelenterazina natural o conocida, o una nueva coelenterazina diferente de la presente divulgación), entre la especificidad de sustrato relativa de una luciferasa de referencia con la misma nueva coelenterazina de la presente divulgación en comparación con la misma coelenterazina diferente usada para la luciferasa de ensayo.

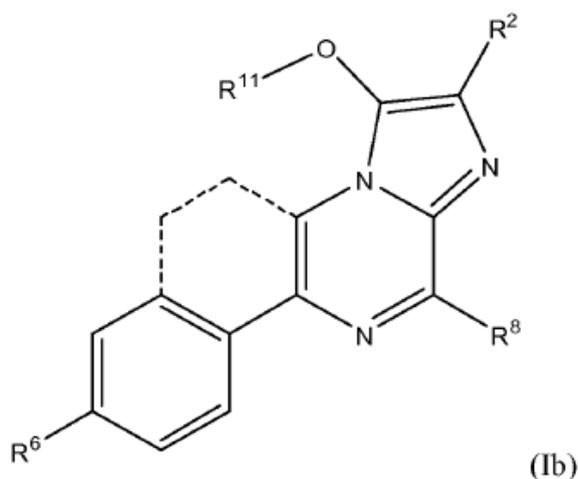
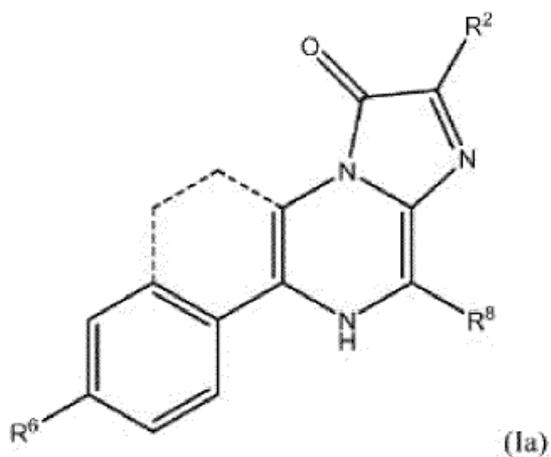
La luminiscencia con una nueva coelenterazina se puede comparar con la luminiscencia con una nueva coelenterazina diferente. La luminiscencia con una coelenterazina natural o conocida se puede comparar con la luminiscencia con otra coelenterazina natural o conocida. La luminiscencia con una coelenterazina natural o conocida se puede comparar con la luminiscencia con una nueva coelenterazina.

5 Las nuevas coelenterazinas descritas en el presente documento incluyen propiedades tales como estabilidad física potenciada (por ejemplo, estabilidad de la coelenterazina potenciada) o menor autoluminiscencia. La estabilidad física de la coelenterazina se refiere al grado de estabilidad de la coelenterazina en ciertas condiciones de manera que mantenga la capacidad de luminiscencia cuando sea usado como un sustrato por una luciferasa. La luminiscencia que no depende de la actividad de una luciferasa o una fotoproteína se denomina autoluminiscencia. La autoluminiscencia es la luminiscencia de una sustancia producida por la energía que se libera en forma de luz durante la desintegración o descomposición. Por ejemplo, la autoluminiscencia puede ser causada por la oxidación espontánea del sustrato luminógeno de la coelenterazina.

15 Como se usa en el presente documento, "pura" o "purificada" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar y/o másica, es más abundante que cualquier otra especie individual, además del agua, disolventes, tampones u otros componentes comunes de un sistema acuoso de la composición) y una fracción purificada puede ser una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 % (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición "sustancialmente pura" comprenderá más del aproximadamente 80 % de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, en algunas realizaciones, más del aproximadamente 85 %, más del aproximadamente 90 %, más del aproximadamente 95 % o más del aproximadamente 99 %. La especie objeto se puede purificar hasta la homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales) en la que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

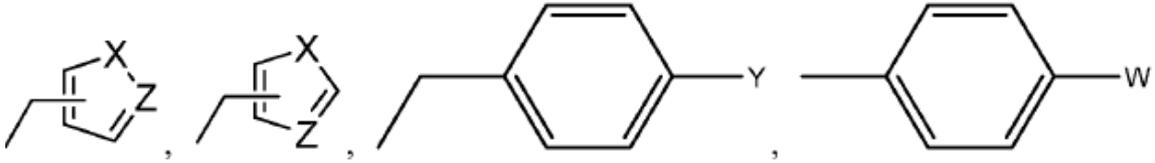
Derivados de coelenterazina

La presente divulgación proporciona nuevos derivados de coelenterazina que pueden ser de fórmula (Ia) o (Ib):



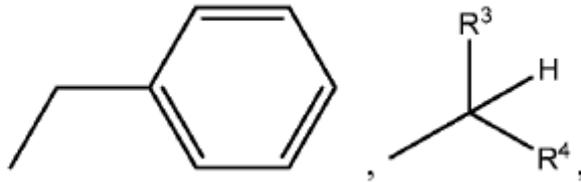
30
o

en las que R^2 se selecciona del grupo que consiste en alquilo de cadena lineal;



o alquilo C_{2-5} de cadena lineal;

- 5 R^6 se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -NH₂, -OC(O)R o -OCH₂OC(O)R;
 R^8 se selecciona del grupo que consiste en



H o cicloalquilo inferior;

- 10 en la que R^3 y R^4 son ambos H o ambos alquilo C_{1-2} ;

W es -NH₂, halo, -OH, -NHC(O)R, -CO₂R;

X es -S-, -O- o -NR²²;

Y es -H, -OH, o -OR¹¹;

Z es -CH- o -N-;

- 15 cada R^{11} es, de manera independiente, -C(O)R" o -CH₂OC(O)R";

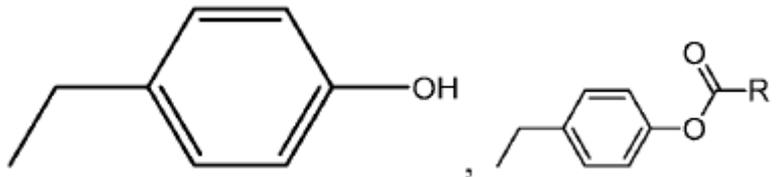
R^{22} es H, CH₃ o CH₂CH₃;

cada R es, de manera independiente, alquilo C_{1-7} de cadena lineal o alquilo C_{1-7} ramificado;

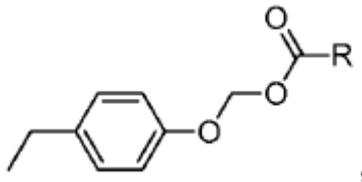
R" es alquilo C_{1-7} de cadena lineal o alquilo C_{1-7} ramificado;

los enlaces de trazos indican la presencia de un anillo opcional, que puede estar saturado o insaturado;

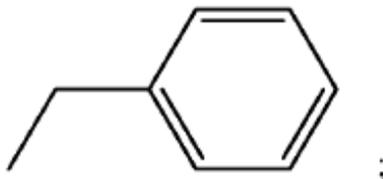
- 20 con la condición de que cuando R^2 sea



o

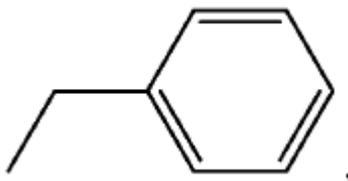


R^8 no sea

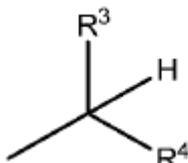


- 25

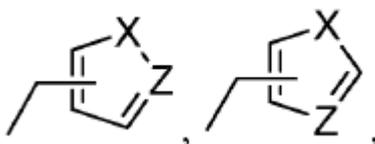
con la condición de que cuando R^2 sea



R⁸ sea

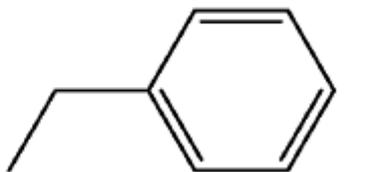


o cicloalquilo inferior; y con la condición de que cuando R⁶ sea NH₂, R² sea



5

o alquilo C₂₋₅; o R⁸ no sea



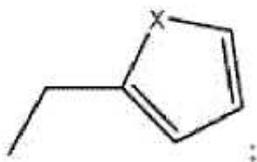
10 El término "alquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un compuesto de hidrocarburo y que puede ser saturado, parcialmente insaturado o totalmente insaturado. El grupo alquilo puede ser una cadena lineal o ramificada. Un grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido con, por ejemplo, halo. Los ejemplos de grupos alquilo de cadena lineal incluyen, pero sin limitación, etilo, n-propilo, n-butilo y n-pentilo, n-hexilo y n-heptilo. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados que tienen uno o más dobles enlaces de carbono-carbono incluyen, pero sin limitación, etenilo (vinilo, -CH=CH₂), 2-propenilo (alilo, -CH=CH-CH₂) y butenilo. Los ejemplos de alquilo insaturado que tienen uno o más enlaces triples carbono-carbono incluyen, pero sin limitación, etinilo y 2-propinilo (propargilo). Los ejemplos de grupos alquilo ramificados incluyen isopropilo, iso-butilo, sec-butilo, t-butilo e iso-pentilo.

20 El término "cicloalquilo inferior", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un compuesto de hidrocarburo que tiene de 3 a 5 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo inferior saturados incluyen, pero sin limitación, grupos tales como ciclopropilo, ciclobutilo y ciclopentilo. Los ejemplos de grupos cicloalquilo inferior insaturados que tienen uno o más dobles enlaces de carbono-carbono incluyen, pero sin limitación, grupos tales como ciclopropenilo, ciclobutenilo y ciclopentenilo.

25

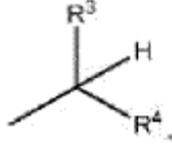
El término "halo", como se usa en el presente documento, se refiere a un halógeno, tal como Cl, F, Br o I.

R² puede ser



30 y X es O o S.

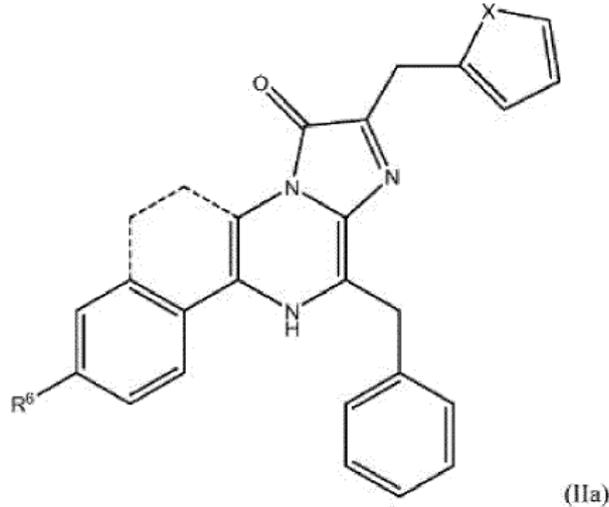
R₂ también puede ser alquilo C₂₋₅ de cadena lineal. R⁸ puede ser



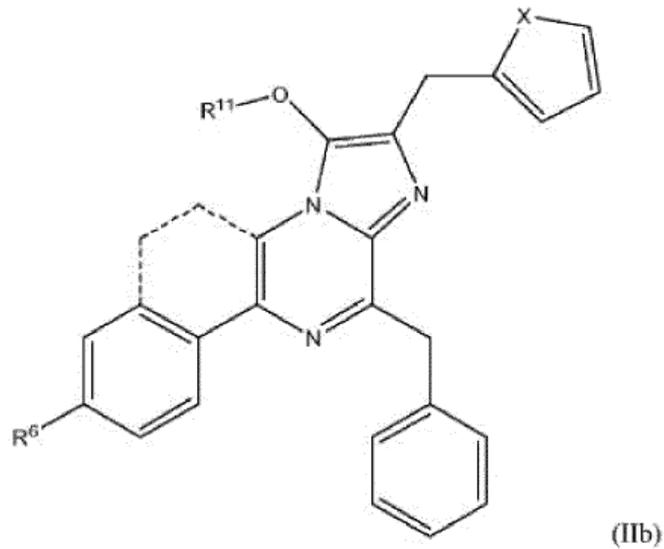
cicloalquilo inferior o H. R⁸ también puede ser bencilo. R⁹ puede ser -C(CH₃)₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂C(CH₃)₃ o -CH₂CH(CH₃)₂.

5

La presente divulgación proporciona compuestos que pueden ser de Fórmula (IIa) o (IIb):



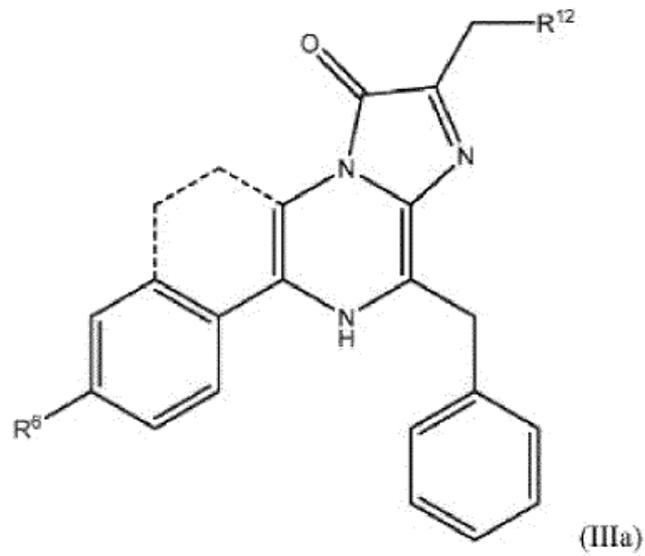
o



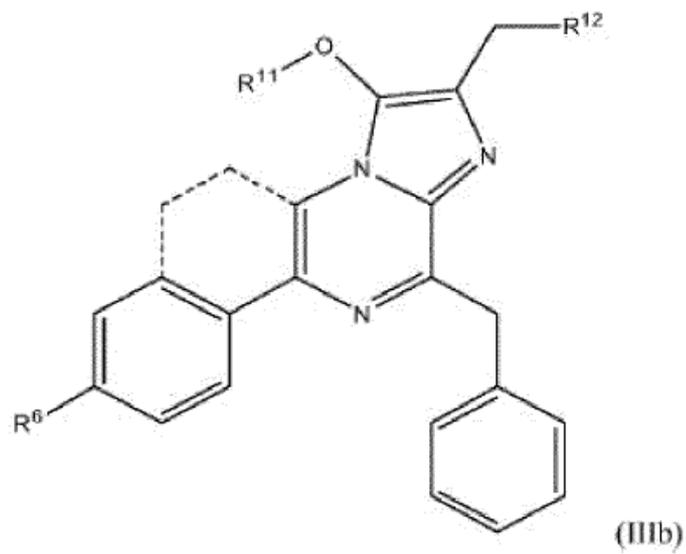
10

en las que X es O o S, R⁶ es H o OH, R¹¹ es como se ha definido anteriormente, y los enlaces de trazos indican la presencia de un anillo opcional.

La presente divulgación proporciona compuestos que pueden ser de Fórmula (IIIa) o (IIIb):

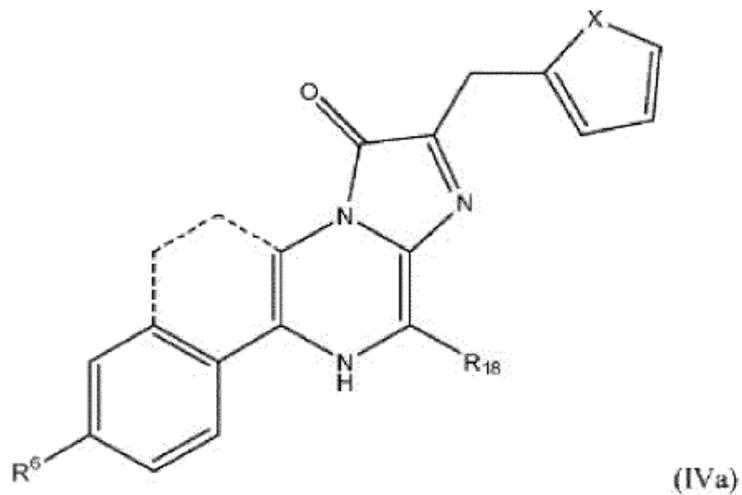


o

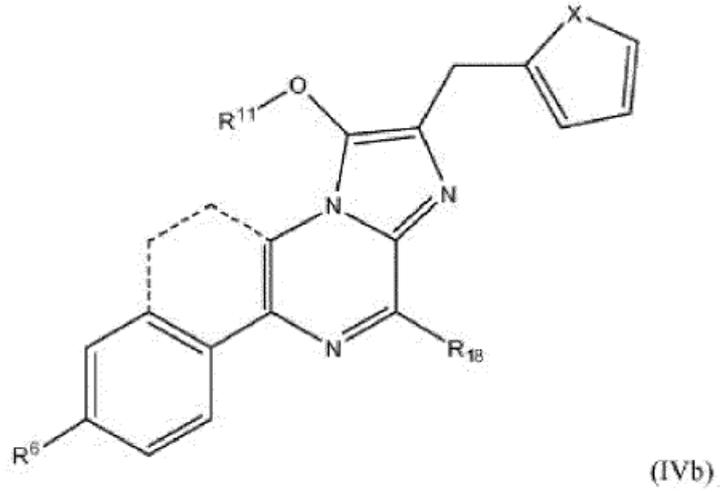


5 en las que R^{12} es alquilo C_{2-5} de cadena lineal, furilo o tienilo, R^6 es H o OH, R^{11} es como se ha definido anteriormente, y los enlaces de trazos indican la presencia de una anillo opcional.

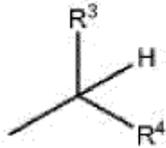
En el presente documento, se desvelan compuestos que pueden ser de Fórmula (IVa) o (IVb):



o



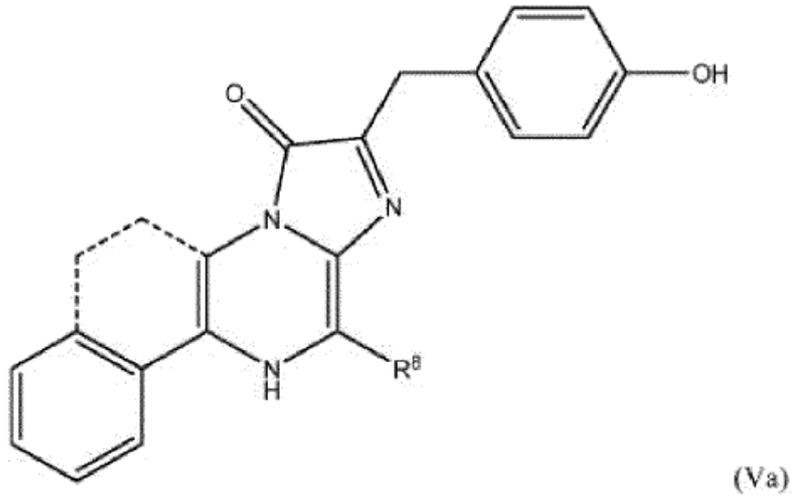
en las que X es O o S, R⁶ es H o OH, R¹⁸ es H,



5

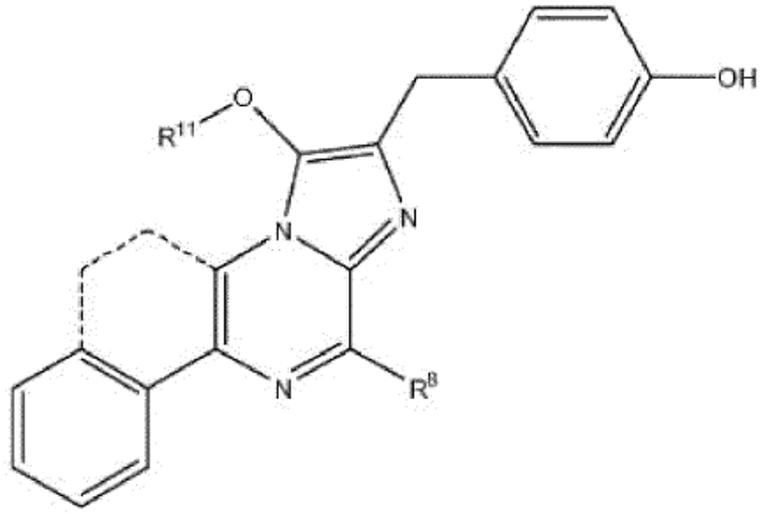
o cicloalquilo inferior, R³, R⁴ y R¹¹ son como se ha definido anteriormente, y los enlaces de trazos indican la presencia de un anillo opcional.

En el presente documento, se describen compuestos que pueden ser de Fórmula (Va) o (Vb):



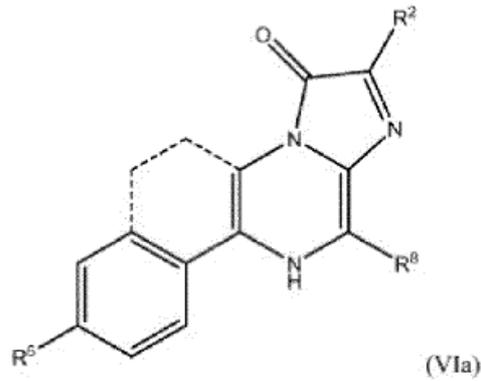
10

o

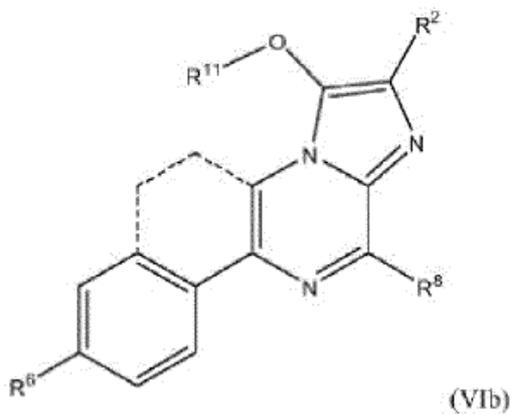


en las que R^8 es bencilo, R^{11} es como se ha definido anteriormente, y los enlaces de trazos indican la presencia de un anillo opcional.

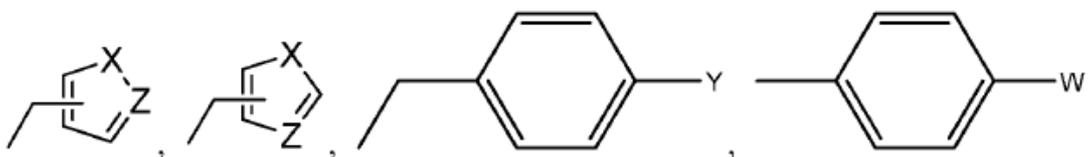
5 La presente divulgación proporciona nuevos derivados de coelenterazina que pueden ser de fórmula (VIa) o (VIb):



o



en las que R^2 se selecciona del grupo que consiste en

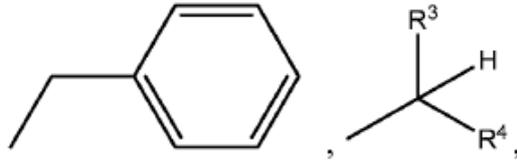


10

o alquilo C_{2-5} de cadena lineal;

R^6 se selecciona del grupo que consiste en $-H$, $-OH$, $-NH_2$, $-OC(O)R$ o $-OCH_2OC(O)R$;

R⁸ se selecciona del grupo que consiste en



H o cicloalquilo inferior;
 en la que R³ y R⁴ son ambos H o ambos alquilo C₁₋₂;

5 W es -NH₂, halo, -OH, -NHC(O)R, -CO₂R;

X es -S-, -O- o -NH-;

Y es -H, -OH o -OR¹¹;

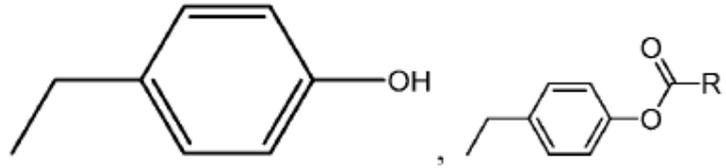
Z es -CH- o -N-;

cada R¹¹ es, de manera independiente, -C(O)R" o -CH₂OC(O)R";

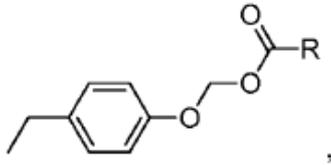
10 cada R es, de manera independiente, alquilo C₁₋₇ de cadena lineal o alquilo C₁₋₇ ramificado;

R" es alquilo C₁₋₇ de cadena lineal o alquilo C₁₋₇ ramificado;

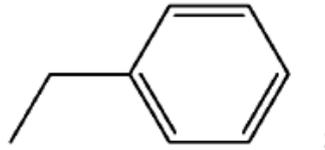
los enlaces de trazos indican la presencia de un anillo opcional, que puede estar saturado o insaturado;
 con la condición de que cuando R² sea



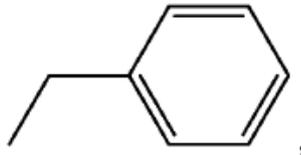
15 o



R⁸ no sea

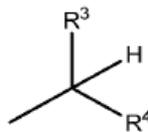


con la condición de que cuando R² sea



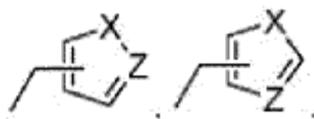
20

R⁸ sea



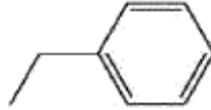
o cicloalquilo inferior; y

con la condición de que cuando R⁶ sea NH₂, R₂ sea

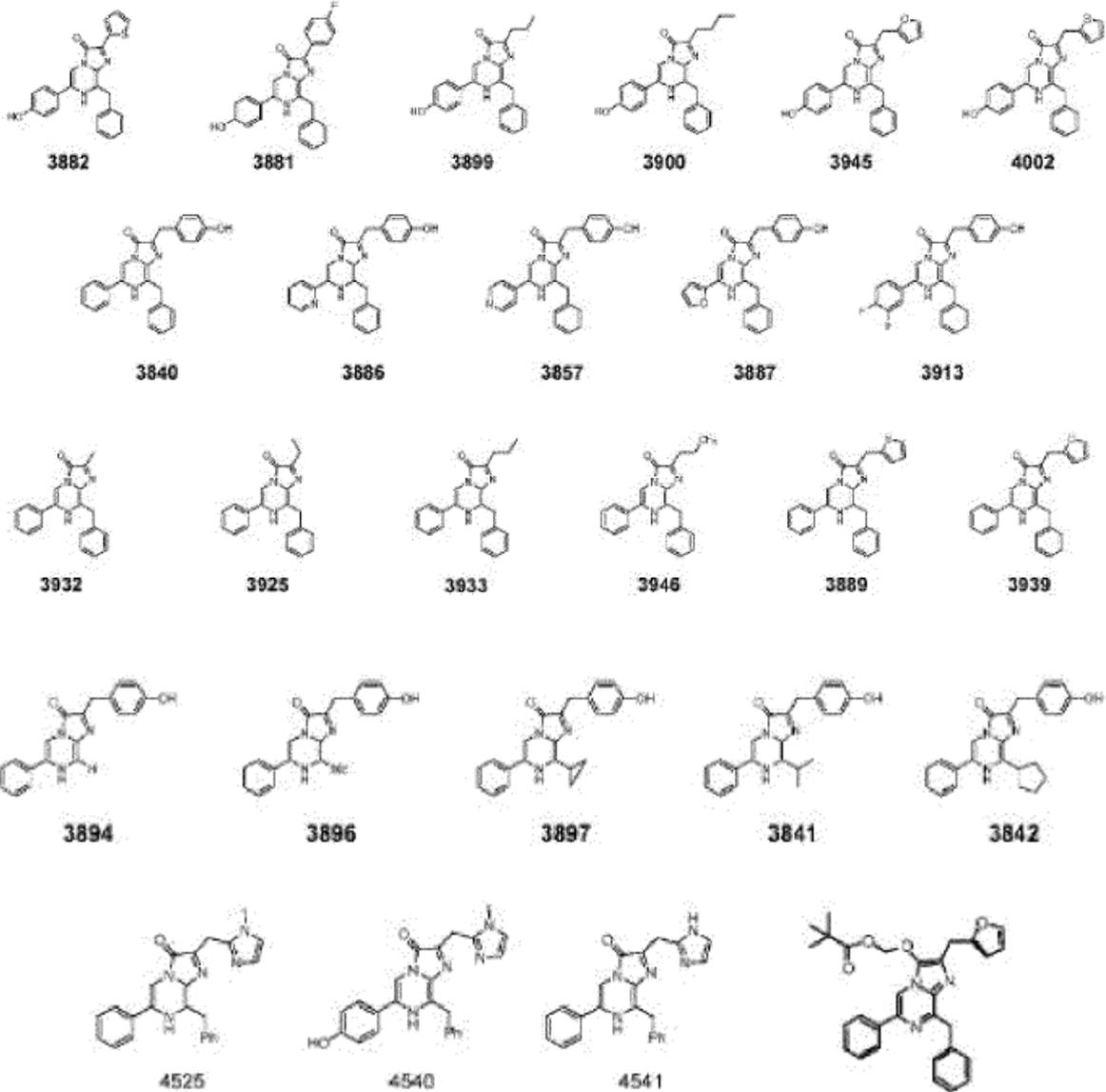


25

o alquilo C₂₋₅; o R⁹ no sea



Los compuestos adecuados de acuerdo con la presente divulgación incluyen



Isómeros, sales y formas protegidas

10 Ciertos compuestos pueden existir en una o más determinadas formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales o anoméricas, incluyendo, pero sin limitación, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t y r; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas sin y anti; formas sinclinales y anticlinales; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas de barco, silla, onda, sobre y media silla; y combinaciones de las mismas, denominadas en lo sucesivo colectivamente "isómeros" (o "formas isoméricas").

15 Cabe señalar que, a excepción de lo tratado a continuación para las formas tautoméricas, se excluyen específicamente del término "isómeros", como se usa en el presente documento, los isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre los átomos en lugar de simplemente en la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, -OCH₃, no se debe interpretar

como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$. Del mismo modo, una referencia a orto-clorofenilo no se debe interpretar como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras bien puede incluir formas estructuralmente isoméricas incluidas en esa clase (por ejemplo, alquilo C_{1-7} incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec- y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta- y para-metoxifenilo).

Cabe señalar que incluidos específicamente en el término "isómero" están los compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^1H , ^2H (D) y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un determinado compuesto incluye la totalidad de dichas formas isoméricas, incluyendo mezclas (total o parcialmente) racémicas y otras mezclas de los mismos. Los métodos de preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de dichas formas isoméricas bien son conocidos en la técnica o se obtienen fácilmente adaptando los métodos enseñados en el presente documento, o métodos conocidos, de una manera conocida.

A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un determinado compuesto también incluye la forma iónica, salina, de solvato y protegida de los mismos, por ejemplo, como se describe a continuación. Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto activo, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se tratan en Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 66: 1-19 (1977).

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, $-\text{COOH}$ puede ser $-\text{COO}^-$), entonces se puede formar una sal con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, iones de metales alcalinos tales como Na^+ y K^+ , cationes alcalinotérreos tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} y otros cationes tales como Al^+ . Los ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, ión amonio (es decir, NH_4^+) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Los ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ión amonio cuaternario común es $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, $-\text{NH}_2$ puede ser $-\text{NH}_3^+$), entonces, se puede formar una sal con un anión adecuado. Los ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, aquellos derivados de los siguientes ácidos inorgánicos: ácidos clorhídrico, bromhídrico yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fósforo. Los ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, aquellos derivados de los siguientes ácidos orgánicos: ácidos acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, palmítico, láctico, málico, pamoico, tartárico, cítrico, glucónico, ascórbico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, aspártico, benzoico, cinámico, pirúvico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, fenilsulfónico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, pantoténico, isetiónico, valérico, lactobiónico y glucónico. Los ejemplos de aniones poliméricos adecuados incluyen, pero sin limitación, aquellos derivados de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular un solvato correspondiente del compuesto activo. El término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo, compuesto activo, sal de compuesto activo) y disolvente. Si el disolvente es agua, se puede hacer referencia convenientemente al solvato como un hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un di-hidrato, un tri-hidrato, etc.

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular el compuesto activo en una forma químicamente protegida. La expresión "forma químicamente protegida", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto en el que uno o más grupos funcionales reactivos están protegidos de reacciones químicas no deseadas, es decir, están en forma de un grupo protegido o protector (también conocido como un grupo enmascarado o de enmascaramiento, o un grupo bloqueado o de bloqueo). Mediante la protección de un grupo funcional reactivo, se pueden realizar reacciones que incluyan otros grupos funcionales reactivos no protegidos, sin afectar el grupo protegido; el grupo protector se puede retirar, por lo general, en una etapa posterior, sin afectar sustancialmente al resto de la molécula. Véase, por ejemplo, "Protective Groups in Organic Synthesis" (T. Green y P. Wuts, Wiley, 1999).

Por ejemplo, se puede proteger un grupo hidroxilo como un éter ($-\text{O}$) o un éster ($-\text{OC}(=\text{O})\text{R}$), por ejemplo, como: un *t*-butiléter; un bencil, benzhidril(difenilmetil) o tritil(trifenilmetil)-éter; un trimetilsilil o *t*-butildimetilsilil-éter; o un acetiléster ($-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{OAc}$). Por ejemplo, un grupo aldehído o cetona puede protegerse como un acetal o cetal, respectivamente, en los que el grupo carbonilo ($>\text{C}=\text{O}$) se convierte en un diéter ($>\text{C}(\text{OR})_2$), mediante la reacción con, por ejemplo, un alcohol primario. El grupo aldehído o cetona se regenera fácilmente por hidrólisis usando un

gran exceso de agua en presencia de ácido. Por ejemplo, un grupo amina se puede proteger, por ejemplo, como una amida o un uretano, por ejemplo, como: una metilamida (-NHCO-CH₃); una benciloxiamida (-NHCO-OCH₂C₆H₅, -NHCbz); como una t-butoxi-amida (-NHCO-OC(CH₃)₃, -NH-Boc); una 2-bifenil-2-propoxi-amida (-NHCO-OC(CH₃)₂C₆H₄C₆H₅, -NH-Bpoc), como una 9-fluorenilmetoxiamida (-NH-Fmoc), como una 6-nitroveratrilo-xiamida (-NH- Nvoc), como una 2-trimetilsililetiloxiamida (-NH-Teoc), como una 2,2,2-tricloroetiloxiamida (-NH-Troc), como una aliloxiamida (-NH-Alloc), como una 2-(fenilsulfonil)etiloxiamida (-NH-Psec); o, en casos adecuados, como un N-óxido.

Por ejemplo, un grupo de ácido carboxílico se puede proteger como un éster, por ejemplo, como: un éster de alquilo C₁₋₇ (por ejemplo, un éster de metilo; un éster de t-butilo); un éster de haloalquilo C₁₋₇ (por ejemplo, un éster de trihaloalquilo C₁₋₇); un éster de tri-alquil C₁₋₇-silil-alquilo C₁₋₇; o un éster de aril C₅₋₂₀-alquilo C₁₋₇ (por ejemplo, un éster de bencilo; un éster de nitrobencilo); o como una amida, por ejemplo, como una metilamida.

Por ejemplo, un grupo tiol se puede proteger como un tioéter (-SR), por ejemplo, como: un tioéter de bencilo; un éter de acetamidometilo (-S-CH₂NHC(=O)CH₃).

Síntesis de derivados de coelenterazina

Los derivados de coelenterazina descritos en el presente documento se pueden sintetizar de acuerdo con los métodos detallados en los Ejemplos 1-16.

Luciferasa de *Oplophorus* mutante

Se pueden usar varias técnicas como las descritas en el presente documento para identificar los sitios de sustitución de aminoácidos para producir un polipéptido OgLuc sintético mejorado. Se usaron técnicas adicionales para optimizar los codones de los polinucleótidos que codifican los diversos polipéptidos con el fin de aumentar la expresión de los polipéptidos. Se encontró que la realización de una o más sustituciones de aminoácidos, ya sea solas o en diversas combinaciones, produjo polipéptidos de tipo OgLuc sintéticos que tenían una mayor luminiscencia (por ejemplo, mayor brillo, mayor estabilidad de la señal, mayor estabilidad enzimática y/o cambio en la especificidad de sustrato relativa). Además, al incluir una o más sustituciones de optimización de codones en los polinucleótidos que codifican los diversos polipéptidos sintéticos de variantes de OgLuc potenció la expresión de los polipéptidos en diversos sistemas de expresión eucariotas y procariotas. En el presente documento, se desvela un polinucleótido que codifica un polipéptido sintético de variante de OgLuc que es soluble y activo en la forma monomérica, cuando se expresa en células procariotas y/o eucariotas.

Las variantes de OgLuc descritas en el presente documento se pueden acoplar a cualquier proteína de interés o molécula de interés. Las variantes pueden ser proteínas de fusión, por ejemplo, algunas variantes se acoplan a un polipéptido HALOTAG[®] unido bien por el extremo N-terminal o por el extremo C-terminal. A menos que se indique lo contrario, las variantes que son fusiones HALOTAG[®] incluyen "HT7" como parte del nombre, por ejemplo, "IVY-HT7". Una secuencia señal (por ejemplo, la secuencia señal natural de *Oplophorus gracilirostris*) también se puede unir al extremo N-terminal de la proteína de fusión para facilitar la secreción de la proteína de fusión de la célula. Las secuencias señal, distintas de la secuencia señal de origen natural de OgLuc luciferasa, se conocen en la técnica por facilitar la secreción de proteínas en células de mamífero u otros tipos de células. Las secuencias señal, en combinación con secuencias de anclaje a la membrana, se pueden usar para colocar o mostrar variantes de OgLuc en la superficie externa de la membrana celular. Otros métodos, conocidos en la técnica también se pueden usar para colocar variantes de OgLuc en la membrana o en otros lugares dentro de la célula.

En el presente documento, se desvela una luciferasa de decápodo modificada que puede tener la luminiscencia potenciada con respecto a la correspondiente luciferasa de decápodo de variante parental. Por ejemplo, la variante parental de OgLuc es Cl+A4E, IVY, IV, QC27, QC27-9a, 9B8, 9B8 opt+K33N, 9B8 opt+K33N+170G, V2 o "L27V". En el presente documento, se describe una luciferasa de decápodo modificada que puede utilizar una nueva coelenterazina. La luciferasa de decápodo modificada puede tener un cambio en la especificidad relativa por coelenterazinas naturales, conocidas o nuevas. Como alternativa, la luciferasa de decápodo modificada puede tener un cambio en la especificidad relativa con respecto a una variante de luciferasa de decápodo, parental correspondiente.

La variante de luciferasa de decápodo, parental correspondiente, puede ser una especie de decápodo, incluyendo diversas especies de familias del orden de los decápodos que incluye, sin limitación, las luciferasas de la familia, Aristeidae, incluyendo *Plesiopenaeus coruscans*; la familia Pandalidea, incluyendo *Heterocarpus* y *Parapandalus richardi*, la familia Solenoceridae, incluyendo *Hymenopenaeus debilis* y *Mesopenaeus tropicalis*; la familia Luciferidae, incluyendo *Lucifer typus*; la familia Sergestidae, incluyendo *Sergestes atlanticus*, *Sergestes arcticus*, *Sergestes armatus*, *Sergestes pediformis*, *Sergestes comutus*, *Sergestes edwardsi*, *Sergestes henseni*, *Sergestes pectinatus*, *Sergestes sargassi*, *Sergestes similis*, *Sergestes vigilax*, *Sergia challengers*, *Sergia grandis*, *Sergia lucens*, *Sergia prehensilis*, *Sergia potens*, *Sergia robusta*, *Sergia scintillans* y *Sergia splendens*; la familia Pasiphaeidae, incluyendo *Glyphus marsupialis*, *Leptochela bermudensis*, *Parapasiphae sulcatifrons* y *Pasiphea tarda*; la familia Oplophoridae, incluyendo *Acanthephyra acanthitelsonis*, *Acanthephyra acutifrons*, *Acanthephyra*

- brevirostris*, *Acanthephyra cucullata*, *Acanthephyra curtirostris*, *Acanthephyra eximia*, *Acanthephyra gracilipes*, *Acanthephyra kingsleyi*, *Acanthephyra media*, *Acanthephyra microphthalmia*, *Acanthephyra pelagica*, *Acanthephyra prionota*, *Acanthephyra purpurea*, *Acanthephyra sanguinea*, *Acanthephyra sibogae*, *Acanthephyra stylostratis*, *Ephyrina bifida*, *Ephyrina figueirai*, *Ephyrina koskynii*, *Ephyrina ombango*, *Hymenodora glacialis*, *Hymenodora gracilis*, *Meningodora miccylla*, *Meningodora mollis*, *Meningodora vesca*, *Notostomus gibbosus*, *Notostomus auriculatus*, *Oplophorus gracilirostris*, *Oplophorus grimaldii*, *Oplophorus novaezealandiae*, *Oplophorus spinicauda*, *Oplophorus folinceus*, *Oplophorus spinosus*, *Oplophorus typus*, *Sistellaspis braueri*, *Sistellaspis cristata*, *Sistellaspis debilis* y *Sistellaspis pellucida*; y la familia Thalassocaridae, incluyendo *Chlorotocoides spinicauda*, *Thalassocaris crinita* y *Thalassocaris lucida*. La luciferasa modificada puede tener mayor emisión de luminiscencia, por ejemplo, al menos 1,3 veces, al menos 2 veces o al menos 4 veces, en una célula procariota y/o una célula eucariota con respecto a la luciferasa correspondiente de tipo silvestre. Se pueden comparar una o más propiedades de la luciferasa de decápodo modificada con propiedades comparables de una luciferasa de otra especie, por ejemplo, una luciferasa de luciérnaga o una luciferasa de *Renilla*.
- 15 La variante de OgLuc puede tener al menos 60 %, por ejemplo, al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, o 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 27, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 56, 58, 60, 62, 64, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93 o 95. La variante de OgLuc, o un fragmento funcional de la misma, puede tener no más de 5 diferencias, o más preferentemente, no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias, o lo más preferentemente ninguna diferencia, estando las diferencias en las posiciones correspondientes a la posición del patrón 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 15, 17 o 18 de la Fórmula (VII) de acuerdo con la Tabla 4. Las diferencias también pueden incluir huecos o inserciones entre las posiciones del patrón de la Tabla 4.
- 20 La variante de OgLuc desvelada en el presente documento puede tener una o más secuencias de aminoácidos heterólogas en el extremo N-terminal, C-terminal o ambos (un polipéptido de fusión tal como uno con un epítipo o marcador de fusión) que, opcionalmente, interaccionen directa o indirectamente con una molécula de interés. La presencia de la/s secuencia/s heteróloga/s puede no alterar sustancialmente la luminiscencia de la variante de OgLuc bien antes o después de la interacción con la molécula de interés. La secuencia de aminoácidos heteróloga puede ser un marcador de epítipo. La secuencia de aminoácidos heteróloga puede ser aquella que, durante o después de la interacción con una molécula de interés, sufra un cambio de configuración, que a su vez modifique la actividad de la variante de OgLuc, por ejemplo, una variante de OgLuc con dicha secuencia de aminoácidos es útil para detectar interacciones alostéricas. La variante de OgLuc o una fusión con la variante de OgLuc o un fragmento de la misma se puede emplear como un indicador.
- 25 Un fragmento de una variante de OgLuc como la desvelada en el presente documento se puede fusionar a una secuencia de aminoácidos heteróloga, formando la fusión de este modo un barril beta, siendo la proteína de fusión capaz de generar luminiscencia desde un coelenterazina de origen natural o un análogo de la misma incluyendo las diversas coelenterazinas conocidas descritas en el presente documento, o una nueva coelenterazina de la presente divulgación.
- 30 También se proporciona un polinucleótido que codifica una variante de OgLuc descrita en el presente documento o una fusión de la misma, una célula hospedadora aislada que tiene el polinucleótido o la variante de OgLuc o una fusión de la misma, y métodos de uso del polinucleótido, de la variante de OgLuc o de una fusión de la misma o célula hospedadora descrita en el presente documento.
- 35 El término "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima en una franja de comparación o región designada medida usando cualquier número de algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Los métodos de alineación de secuencia para la comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para su comparación se puede realizar mediante el algoritmo de Smith *et al.*, (*J. Mol. Biol.* 147: 195-197 (1981)), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, (*J. Mol. Biol.*, 48: 443-453 (1970)), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 85: 2444-2448 (1988)), mediante implementaciones computarizadas de algoritmos, por ejemplo, FASTA, SSEARCH, GGSEARCH (disponible en el servidor FASTA de la Universidad de Virginia por William R. Pearson http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_intro.shtml), la serie Clustal de programas (Chenna *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 31(13):3497-3500 (2003); ejemplos disponibles en <http://www.ebi.ac.uk> o <http://www.ch.embnet.org>), u otro programa informático de análisis de secuencias. Se sabe en la técnica que la generación de alineaciones con la máxima correspondencia entre las secuencias de polipéptidos con importantes modificaciones de la secuencia (por ejemplo, alteración del orden de dominio, dominios que faltan/añadidos, repetición de dominios, transposición de dominios, permutación circular) puede implicar el uso de métodos especializados, tales como el método ABA (Raphael *et al.*, *Genome Res.* 14(11):2336-2346 (2004)), otros métodos adecuados, o realizar la alineación con dos copias idénticas concatenadas de las secuencias polipeptídicas.
- 40 Las expresiones "molécula de ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" y el término "polinucleótido" como se usan en el presente documento, se refieren a ácido nucleico, incluyendo ADN o ARN, que comprende las
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

secuencias de codificación necesarias para la producción de un precursor de polipéptido o proteína. El polipéptido codificado puede ser un polipéptido de longitud completa, un fragmento del mismo (de longitud inferior a la completa) o una fusión de bien el polipéptido de longitud completa o fragmento del mismo con otro polipéptido, produciendo un polipéptido de fusión.

5 Un polinucleótido que codifica una proteína o un polipéptido significa una secuencia de ácido nucleico que comprende la región de codificación de un gen, o en otras palabras, la secuencia de ácido nucleico que codifica un producto génico. La región codificante puede estar presente en forma de ADNc, de ADN genómico o de ARN. Cuando está presente en una forma de ADN, el oligonucleótido puede ser de cadena sencilla (por ejemplo, la
10 cadena sentido) o de doble cadena. Se pueden colocar elementos de control adecuados tales como potenciadores/promotores, uniones de corte y empalme, señales de poliadenilación, etc., en estrecha proximidad con la región codificante del gen si es necesario para permitir la iniciación adecuada de la transcripción y/o el procesamiento correcto de la transcripción de ARN principal. Otros elementos de control o reguladores incluyen, pero sin limitación, los sitios de unión de factores de transcripción, señales de corte y empalme, señales de
15 poliadenilación, señales de terminación y elementos potenciadores.

Los términos "péptido", "proteína" y "polipéptido" pretenden significar cadenas de aminoácidos de diferentes longitudes, independientemente de la modificación posterior a la traducción (por ejemplo, glicosilación o fosforilación). Las moléculas de ácido nucleico desveladas en el presente documento codifican una variante de una
20 proteína variante artificial (es decir, sintética) o fragmento polipeptídico de la misma, que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 %, por ejemplo, al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la proteína parental de la que se deriva, pudiendo ser la proteína parental una secuencia de origen natural (natural o de tipo silvestre) o una secuencia variante que posteriormente se modifica adicionalmente. La expresión "polipéptido de
25 fusión" o "proteína de fusión" se refiere a una proteína quimérica que contiene una proteína de referencia (por ejemplo, variante de OgLuc) unida por el extremo N- y/o C-terminal a una o más secuencias heterólogas (por ejemplo, un polipéptido no OgLuc). La secuencia heteróloga puede incluir, pero sin limitación, proteínas indicadoras tales como la proteína de fusión HALO-TAG® (Promega Corp.), FIAsh (aglutinante de hélice de arsénico de fluoresceína) y ReAsH (aglutinante de hélice de arsénico rojo) (por ejemplo, la secuencia de reconocimiento de
30 marcador LUMIO™ (Invitrogen)), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β -galactosidasa (β -Gal), lactamasa (P-gal), resistencia a la neomicina (Neo), GUS, galactopiranosido, proteína verde fluorescente (GFP), luciferasa (por ejemplo, una luciferasa de *Renilla reniformis*, una luciferasa de luciérnaga (por ejemplo, *Photinus pyralis* o *Photuris pennsylvanica*) o una luciferasa de elatérico (por ejemplo, *Pyrophorus plagiophthalmus* o *termitilluminaans Pyrearinus*) o una luciferasa de bicho de luz (por ejemplo, *Phrixothrix hirtus*), xilosidasa, timidina quinasa,
35 arabinosidasa y marcador SNAP, marcador CLIP, marcador ACP y marcador MCP (New England Biolabs). Una proteína quimérica puede contener una variante de OgLuc unida en el extremo N-terminal a una proteína de fusión HALOTAG® (Promega Corp.). Una proteína quimérica también puede contener una variante de OgLuc unida en el extremo C-terminal a una proteína de fusión HALOTAG®.

40 Se sabe que los ácidos nucleicos contienen diferentes tipos de "mutaciones", lo que se refiere a una alteración en la secuencia de un nucleótido en la posición de una determinada base con respecto a la secuencia de tipo silvestre. Las mutaciones también pueden referirse a la inserción o eliminación de una o más bases de modo que la secuencia de ácido nucleico difiera de una referencia, por ejemplo, una secuencia de tipo silvestre, o la sustitución con un codón de parada. Una "sustitución" se refiere a un cambio en un aminoácido de una posición particular de una
45 secuencia, por ejemplo, un cambio de A a E en la posición 4.

El término "vector" se refiere a moléculas de ácido nucleico en las que se pueden insertar o clonar fragmentos de ADN, y que se pueden usar para transferir uno o más segmentos de ADN a una célula, siendo capaces de replicarse en una célula. Los vectores se pueden derivar de plásmidos, bacteriófagos, virus, cósmidos y similares.

50 La expresión "de tipo silvestre" o el término "natural", como se usan en el presente documento, se refieren a un gen o producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico aislado de una fuente de origen natural. Un gen de tipo silvestre es el que se observa con mayor frecuencia en una población y, por lo tanto, se designa arbitrariamente la forma de "tipo silvestre" del gen. Por el contrario, el término "mutante" se refiere a un gen o producto génico que muestra modificaciones en la secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o el producto génico de tipo silvestre. Se observa que los mutantes de origen natural pueden estar aislados; estos se identifican por el hecho de que tienen características modificadas en comparación con el gen o el producto génico de tipo silvestre.

60 **Polinucleótidos y proteínas ilustrativos**

En el presente documento, se desvela una variante de OgLuc o fragmentos proteicos de la misma, por ejemplo, aquellos con eliminaciones, por ejemplo una eliminación de 1 a aproximadamente 5 restos, y quimeras (fusiones) de los mismos (véase la publicación de patente de EE.UU. n.º 2009/0253131 y la publicación WIPO n.º WO
65 2007/120522) que tiene al menos una sustitución de aminoácido con relación a una OgLuc de tipo silvestre, sustitución que da lugar a la variante de OgLuc que tiene una estabilidad potenciada, luminiscencia potenciada, por

ejemplo, mayor emisión de la luminiscencia, mayor estabilidad de la cinética de luminiscencia y/o color modificado de la luminiscencia. Las secuencias de una variante de OgLuc son sustancialmente iguales la secuencia de aminoácidos de una OgLuc de tipo silvestre correspondiente. Un polipéptido o péptido que tiene sustancialmente la misma secuencia significa que una secuencia de aminoácidos es, en gran parte, pero no del todo, igual y conserva la actividad funcional de la secuencia con la que está relacionada. En general, dos secuencias de aminoácidos son sustancialmente iguales si tienen al menos 60 %, por ejemplo, al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), pero menos del 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos. La variante de OgLuc puede estar codificada por un polinucleótido recombinante. La variante de OgLuc, o un fragmento funcional de la misma, puede tener no más de 5 diferencias, o más preferentemente no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia, o lo más preferentemente ninguna diferencia, estando las diferencias en posiciones correspondientes a la posición del patrón 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 15, 17 o 18 de la Fórmula (VII) de acuerdo con la Tabla 4. Las diferencias también pueden incluir huecos, inserciones o permutaciones entre las posiciones del patrón de la Tabla 4.

Las proteínas variantes de OgLuc o proteínas de fusión descritas en el presente documento se pueden preparar mediante métodos recombinantes o métodos de síntesis química de péptidos en fase sólida. Dichos métodos son conocidos en la técnica.

Métodos de uso y kits

Los compuestos y las proteínas desvelados en el presente documento se pueden usar en cualquier forma en la que se hayan usado luciferasas y sustratos de luciferasa, por ejemplo, coelenterazinas. Por ejemplo, se pueden usar en un método bioluminogénico que emplee un análogo de coelenterazina para detectar una o más moléculas en una muestra, por ejemplo, una enzima, un cofactor para una reacción enzimática, un sustrato enzimático, un inhibidor enzimático, un activador enzimático o radicales OH, o una o más condiciones, por ejemplo, condiciones redox. La muestra puede incluir un animal (por ejemplo, un vertebrado), una planta, un hongo, fluido fisiológico (por ejemplo, sangre, plasma, orina, secreciones mucosas y similares), una célula, un lisado celular, un sobrenadante celular o una fracción purificada de una célula (por ejemplo, una fracción subcelular). La presencia, la cantidad, la distribución espectral, la cinética de emisión o la actividad específica de dicha molécula pueden detectarse o cuantificarse. La molécula se puede detectar o cuantificar en solución, incluyendo soluciones multifásicas (por ejemplo, emulsiones o suspensiones), o sobre soportes sólidos (por ejemplo, partículas, capilares o vasos de ensayo). La variante de OgLuc se puede usar en ensayos basados en luminiscencia para detectar una enzima de interés, por ejemplo, enzima CYP450, enzima MAO A o B, una caspasa, etc. Las nuevas coelenterazinas se podrían usar con fotoproteínas tales como aequorina, obelina o iPhotina. La variante de OgLuc se puede usar como un donante de energía a otra molécula (por ejemplo, a un fluoróforo, un cromóforo o una nanopartícula).

En el presente documento, se describe un polinucleótido que codifica un indicador de la transcripción. En algunas realizaciones, la variante de OgLuc o el fragmento de la misma se podrían ligar operativamente a secuencias reguladoras de la transcripción, por ejemplo, uno o más potenciadores, un promotor, una secuencia de terminación de la transcripción o una combinación de los mismos, para formar un casete de expresión. Por ejemplo, la variante de OgLuc se podría ligar operativamente a un promotor mínimo y un elemento de respuesta a cAMP (CRE).

Las proteínas desveladas en el presente documento se pueden usar como biosensores, por ejemplo, una variante de OgLuc, que, en presencia de otra molécula (por ejemplo, una o más moléculas de interés), o en ciertas condiciones, tiene una o más actividades alteradas. Al interactuar con una molécula de interés o someterse a ciertas condiciones, el biosensor experimenta un cambio de configuración o es modificado químicamente, lo que provoca una alteración de la actividad enzimática o de la luminiscencia, por ejemplo, actividad específica, distribución espectral o cinética de emisión. Por ejemplo, la variante de OgLuc desvelada en el presente documento, por ejemplo, una variante permutada circularmente, puede comprender un dominio de interacción para una molécula de interés. Como alternativa, por ejemplo, la variante de OgLuc puede acoplarse a un aceptor de energía, por ejemplo, una proteína fluorescente, y comprenden un dominio de interacción que altera la eficiencia de la transferencia energética desde la enzima al aceptor de energía. Por ejemplo, el biosensor se podría generar para detectar proteasas, quinasas, un ligando, una proteína de unión tal como un anticuerpo, nucleótidos cíclicos tales como cAMP o cGMP, o un metal tal como el calcio, mediante la inserción de una región de sensor adecuada en la secuencia de la variante de OgLuc. Se pueden insertar una o más regiones de sensor en el extremo C-terminal, el extremo N-terminal y/o en una o más ubicaciones adecuadas de la secuencia polipeptídica, comprendiendo la región de sensor uno o más aminoácidos. En el caso de una variante de OgLuc permutada circularmente, la región de sensor se puede insertar entre los extremos N- y C-terminales de la variante de OgLuc parental. Además, una o todas las regiones de sensor insertadas pueden incluir aminoácidos enlazadores para acoplar el sensor al resto de la variante polipeptídica de OgLuc. Los ejemplos de biosensores de luciferasa se desvelan en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2005/0153310 y 2009/0305280 y la publicación PCT n.º WO 2007/120522 A2.

Se pueden usar las variantes de OgLuc desveladas en el presente documento para transferir energía a un aceptor de energía, por ejemplo, en un análisis de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET). Por ejemplo, las variantes de OgLuc usadas en el análisis de BRET se pueden usar para determinar si dos moléculas son capaces de unirse entre sí o ubicarse conjuntamente en una célula. Por ejemplo, una variante de OgLuc se puede usar como una molécula donante de bioluminiscencia que se combina con una molécula o proteína de interés

para crear una primera proteína de fusión. La primera proteína de fusión puede contener una variante de OgLuc y una proteína de interés. Las primeras proteínas de fusión que contienen la variante de OgLuc se pueden usar en el análisis de BRET para detectar la interacción proteína/proteína en sistemas que incluyen, pero sin limitación, lisados celulares, células intactas y animales vivos. Se puede usar HALOTAG® como una molécula aceptora fluorescente.

5 HALOTAG® puede fusionarse a una segunda proteína de interés o a una variante de OgLuc. Por ejemplo, una variante de OgLuc puede fusionarse al HALOTAG®, expresado en células o animales, y marcarse con un ligando de HALOTAG® fluorescente tal como ligando HALOTAG® TMR. La fusión se puede excitar posteriormente para que emita fluorescencia en presencia de un sustrato de OgLuc que penetra a través de las células. Se puede realizar una BRET usando variantes de OgLuc en combinación con proteínas fluorescentes, incluyendo, pero sin limitación, la proteína verde fluorescente (GFP) o proteína roja fluorescente (RFP) o marcadores fluorescentes incluyendo fluoresceína, verde de rodamina, verde Oregon o Alexa 488, para nombrar unos cuantos ejemplos no limitantes.

Las variantes de OgLuc y/o las nuevas coelenterazinas de la presente invención se pueden usar en ensayos de complementación de proteínas (PCA) para detectar la interacción de dos biomoléculas, por ejemplo, polipéptidos. Por ejemplo, una variante de OgLuc descrita en el presente documento se puede separar en dos fragmentos en uno o más sitios tolerantes a la separación y cada fragmento de la variante de OgLuc separada se puede fusionar a uno de un par de polipéptidos de interés que se cree que interactúan, por ejemplo, FKBP y FRB. Si los dos polipéptidos de interés realmente interactúan, entonces, los fragmentos de OgLuc entran en estrecha proximidad entre sí para reconstituir la variante de OgLuc activa, funcional. La actividad de la variante de OgLuc reconstituida se puede entonces detectar y medir usando un coelenterazina natural o conocida, o una nueva coelenterazina de la presente divulgación. La variante de OgLuc dividida se puede usar en un sistema de complementación más general similar a lac-Z (Langley *et al.*, PNAS 72:1254-1257 (1975)) o ribonucleasa S (Levit y Berger, *J. Biol. Chem.* 251: 1333-1339 (1976)). Un fragmento de variante de OgLuc (designado "A") conocido por complementarse con otro fragmento de variante de OgLuc ("B") pueden fusionarse a una proteína diana, y la fusión resultante se puede controlar a través de la luminiscencia en una célula o lisado celular que contenga el fragmento B. La fuente del fragmento B puede ser la misma célula (por ejemplo, si el gen para el fragmento B se integra en el genoma de la célula o está contenido en otro plásmido dentro de la célula) o podría ser un lisado o una proteína purificada derivada de otra célula. En algunas realizaciones, esta misma proteína de fusión (fragmento A) se podría capturar o inmovilizar usando una fusión entre el fragmento B y un polipéptido tal como HALOTAG® capaz de unirse a un soporte sólido. La luminiscencia se puede usar para demostrar la captura con éxito o para cuantificar la cantidad de material capturado.

Las variantes de OgLuc y/o las nuevas coelenterazinas de la presente invención se pueden usar para cuantificar la coelenterazina. Una coelenterazina (por ejemplo, una coelenterazina natural o conocida, o una nueva coelenterazina de la presente divulgación) se puede usar como una sonda de una actividad bioquímica específica, por ejemplo, la apoptosis y el metabolismo de los fármacos. La concentración de coelenterazina se puede acoplar a una actividad enzimática específica mediante una "pro-coelenterazina" o un "pro-sustrato" que pueda ser activado por la enzima específica de interés. La pro-coelenterazina puede ser una molécula que no pueda soportar directamente la luminiscencia cuando se combine con la luciferasa, pero que se pueda convertir en coelenterazina a través del procesamiento catalítico de una enzima específica de interés. La metodología se puede usar para enzimas tales como las usadas en el metabolismo de fármacos, por ejemplo, las enzimas del citocromo P450, monoamina oxidasa y glutatión S-transferasa; y la apoptosis, por ejemplo, caspasas. Por ejemplo, la coelenterazina (por ejemplo, una coelenterazina natural o conocida, o una nueva coelenterazina descrita en el presente documento) se puede modificar para contener un grupo escindible, tal como 6'-O-metilo. Cuando se incuba con una enzima del citocromo P450, la 6'O-metilo se puede escindir y la pro-coelenterazina se puede convertir en coelenterazina que se puede detectar con una variante de OgLuc desvelada en el presente documento. La pro-coelenterazina se puede combinar con otros componentes necesarios para soportar la luminiscencia, por ejemplo, proteína luminiscente tal como una variante de OgLuc descrita en el presente documento, para proporcionar un único reactivo y un ensayo homogéneo. Por ejemplo, cuando se añade el reactivo a una muestra, se puede generar luminiscencia cuando la pro-coelenterazina se convierte en coelenterazina. Se pueden desarrollar ensayos similares para otras enzimas, moléculas pequeñas u otros procesos celulares que pueden estar vinculados a la generación de coelenterazinas de pro-coelenterazinas.

Las variantes de OgLuc y/o las nuevas coelenterazinas de la presente invención se pueden usar como sistemas indicadores de la transcripción genética. Las variantes de OgLuc se pueden multiplexar con una luciferasa que emita luz a una longitud de onda diferente, por ejemplo, luciferasa de escarabajo de resorte rojo (CHROMA-LUC™; Promega Corp.). Por ejemplo, si se usa una variante de OgLuc de la presente divulgación como un indicador funcional, entonces se podría usar la luciferasa CHROMA-LUC™ roja para controlar los efectos inespecíficos sobre la regulación genética o para normalizar la eficacia de transfección. La luminiscencia generada a partir de la variante de OgLuc (aproximadamente 460 nm) y CHROMA-LUC™ roja (aproximadamente 610 nm) se puede resolver fácilmente usando un luminómetro con filtros diferenciadores de la longitud de onda, lo que permite la medición de las dos señales de la misma muestra. En otro ejemplo, se podría usar una variante de OgLuc desvelada en el presente documento como un indicador de la transcripción y emparejarla con una luciferasa que emita luz a una longitud de onda diferente contenida en un reactivo de ensayo. Por ejemplo, se podría usar una variante de OgLuc descrita en el presente documento como indicador de la transcripción y emparejarla con cualquiera de aequorina o un biosensor de luciferasa de luciérnaga permutada circularmente con cAMP, o ambos a la vez, para la detección de múltiples vías en una sola muestra. En dicho sistema, por ejemplo, se podría usar aequorina para la detección y/o la

medición del calcio, el biosensor para la detección y/o la medición de AMPc y una variante de OgLuc para el control de la expresión génica cadena abajo. En otro ejemplo, se puede usar una variante de OgLuc con una o más luciferasas, en el que la luminiscencia de cada luciferasa se puede medir por separado mediante el uso de inhibidores enzimáticos selectivos. Por ejemplo, la luminiscencia de una primera luciferasa se puede medir después de la adición de sustratos y tampones apropiados, seguida de la medición de una segunda luciferasa tras una posterior adición de sustratos y tampones apropiados y uno o más inhibidores selectivos de la primera luciferasa. En otro ejemplo, la luciferasa contenida en un reactivo de ensayo se puede usar para medir un aspecto específico de la fisiología celular, por ejemplo, ATP para estimar la viabilidad celular, o la actividad de caspasa para estimar la apoptosis celular.

Las variantes de OgLuc desveladas en el presente documento se pueden usar como indicadores en líneas celulares difíciles de transfectar o incluso en células primarias que no se dividen, por ejemplo, células madre o células HepG2. Debido a su alta intensidad de señal, las variantes de OgLuc descritas en el presente documento permitirán la luminiscencia detectable cuando la eficacia de la transfección sea baja. Las variantes de OgLuc se pueden usar como indicadores en células que sean especialmente sensibles a las condiciones asociadas con la transfección, por ejemplo, que sean sensibles a concentraciones de ADN elevadas o la adición de reactivo de transfección. Por lo tanto, debido a la luminiscencia potenciada de las variantes de OgLuc de la presente divulgación, se puede lograr un nivel adecuado de luminiscencia usando concentraciones más bajas de ADN, menos reactivo de transfección y/o tiempos posteriores a la transfección más cortos antes de comenzar un ensayo de modo que haya una reducción de la carga de toxicidad en las células sensibles. La luminiscencia potenciada de las variantes de OgLuc también permitirá que una señal se detecte en puntos temporales muy posteriores. Las variantes de OgLuc también se pueden usar como indicadores de los promotores naturales de una sola copia.

Las variantes de OgLuc de la presente divulgación se pueden usar como marcadores de fusión para una proteína diana de interés como una forma de controlar los niveles intracelulares de la proteína diana. Las variantes de OgLuc se pueden usar para controlar las proteínas específicas que participan en las vías de respuesta al estrés (por ejemplo, daño en el ADN, estrés oxidativo, inflamación) en las células como una forma de probar el papel que diversos tipos de estímulos pueden desempeñar en estas vías. Las variantes de OgLuc también se pueden usar como un medio para controlar el tráfico celular de una proteína diana. Por ejemplo, las variantes de OgLuc también se pueden fusionar a genomas virales (por ejemplo, VIH, VHC), de modo que se puedan controlar los niveles de titulación, es decir, la infectividad, en las células después del tratamiento con agentes antivirales potenciales. Las variantes también se pueden fusionar a la proteína verde fluorescente (GFP) o HALOTAG® (además de una proteína diana) para la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) con el fin de identificar clones de expresión alta.

La identificación de líneas celulares estables, sólidas, que expresan una variante de OgLuc desvelada en el presente documento, ya sea en el citoplasma o como una forma secretada, puede verse facilitada por la señal potenciada de la variante de OgLuc y el pequeño tamaño del gen OgLuc. La secuencia del gen relativamente pequeño debería reducir la probabilidad de inestabilidad genética resultante de la integración del ADN foráneo en el genoma de una célula.

Las variantes de OgLuc de la presente divulgación se pueden integrar en varios conceptos diferentes de inmunoensayo. Por ejemplo, una variante de OgLuc puede fusionarse a un anticuerpo principal o secundario para proporcionar un método de detección para un determinado analito. Como otro ejemplo, una variante de OgLuc puede fusionarse a la proteína A o proteína G, y la fusión se podría usar después para detectar un anticuerpo específico unido a un analito en particular. Como otro ejemplo, una variante de OgLuc puede fusionarse con estreptavidina y usarse para detectar un anticuerpo biotinilado específico unido a un determinado analito. Como otro ejemplo más, los fragmentos complementarios de una variante de OgLuc pueden fusionarse con anticuerpos primarios y secundarios, en los que el anticuerpo principal reconoce un determinado analito y el anticuerpo secundario reconoce el anticuerpo principal. La actividad de la variante de OgLuc se puede reconstituir en presencia de analito. Como otro ejemplo más, una variante de OgLuc puede conjugarse con un analito (por ejemplo, prostaglandinas) y usarse en un formato de ELISA de tipo sándwich competitivo. La variante de OgLuc conjugada con un analito también se puede usar para detectar anticuerpos capaces de unirse al analito, permitiendo la actividad de unión que la variante de OgLuc se una selectivamente al anticuerpo. Un ejemplo en el que se usa luciferasa de *Renilla* para medir cuantitativamente los títulos de anticuerpos de los pacientes contra una diana antigénica es el sistema de inmunoprecipitación de la luciferasa (Burbelo *et al.*, "Expert Review of Vaccines" 9(6):567-578 (2010)).

Las variantes de OgLuc y los nuevos sustratos descritos en el presente documento se pueden usar para la detección de la luminiscencia en células vivas. Se puede expresar una variante de OgLuc en células (como indicador o de otra manera) y las células tratadas con una coelenterazina, por ejemplo, una nueva coelenterazina tal como PBI-3939, que penetrará a través de las células en cultivo, reaccionan con la variante de OgLuc y generan luminiscencia. Además de atravesar las células, PBI-3939 muestra biocompatibilidad comparable a la coelenterazina natural en términos de viabilidad celular. Se puede sintetizar una versión de PBI-3939 que contenga las modificaciones químicas conocidas por aumentar la estabilidad de la coelenterazina natural en los medios y usarse para ensayos con indicador basados en la variante de OgLuc en células vivas, más potentes. Se puede ensayar una muestra

(incluyendo células, tejidos, animales, etc.) que contenga una variante de OgLuc y/o una nueva coelenterazina desvelada en el presente documento usando diversas técnicas de microscopía y de imagen. Se puede expresar una variante de OgLuc secretable en las células como parte de un sistema indicador en células vivas.

- 5 Las variantes de OgLuc y/o las nuevas coelenterazinas desveladas en el presente documento se pueden proporcionar como parte de un kit. El kit puede incluir una o más variantes de OgLuc desveladas en el presente documento (en forma de un polipéptido, un polinucleótido, o ambos) y/o una coelenterazina, junto con los reactivos y las instrucciones adecuadas para permitir a un usuario realizar ensayos tales como los desvelados en el presente documento. La coelenterazina puede ser cualquiera de las coelenterazinas naturales, conocidas o nuevas
10 desveladas en el presente documento. El kit también puede incluir uno o más tampones, tales como los desvelados en el presente documento.

Vectores y células hospedadoras que codifican la luciferasa modificada o fusiones de la misma

- 15 Una vez que se prepara una molécula de ácido nucleico deseable que codifique una variante de OgLuc o un fragmento de la misma, tal como aquella con actividad de luminiscencia o que se pueda complementar por otra molécula que produzca actividad de luminiscencia, o una fusión de la misma con actividad de luminiscencia, se puede preparar un casete de expresión que codifique la variante de OgLuc o un fragmento de la misma, por ejemplo, uno para la complementación, o una fusión del mismo con actividad de luminiscencia. Por ejemplo, una molécula de
20 ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de OgLuc se liga opcionalmente operativamente a secuencias reguladoras de la transcripción, por ejemplo, uno o más potenciadores, un promotor, una secuencia de terminación de la transcripción o una combinación de los mismos, para formar un casete de expresión. La molécula de ácido nucleico o el casete de expresión se pueden introducir en un vector, por ejemplo, un plásmido o un vector viral, que incluya opcionalmente un gen marcador seleccionable, y el vector
25 introducido en una célula de interés, por ejemplo, una célula procariota tal como *E. coli*, *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. y similares, así como células eucariotas, incluyendo una planta (dicotiledónea o monocotiledónea), hongo (incluyendo levadura, por ejemplo, *Pichia*, *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*) o una célula de mamífero, lisados de la misma o en una mezcla de transcripción/traducción *in vitro*. Las células de mamífero incluyen, pero sin limitación, especies células bovinas, caprinas, ovinas, caninas, felinas, de primate
30 humano, por ejemplo, de simio y humanas. Las líneas celulares de mamífero incluyen, pero sin limitación, CHO, COS, HEK293, HeLa, CV-1, SH-SY5Y y NIH 3T3, aunque también se pueden usar otras numerosas líneas celulares.

- La expresión de una variante de OgLuc codificada puede ser controlada por cualquier promotor capaz de expresarse en células procariotas o células eucariotas incluyendo promotores sintéticos. Los promotores procarióticos incluyen, pero sin limitación, los promotores SP6, T7, *TS*, *tac*, *bla*, *tp*, *gal*, *lac* o de maltosa, incluyendo cualquier fragmento que tenga actividad de promotor. Los promotores eucariotas incluyen, pero sin limitación, promotores constitutivos, por ejemplo, promotores virales tales como promotores CMV, SV40 y RSV, así como promotores regulables, por ejemplo, un promotor inducible o reprimible tal como el promotor tet, el promotor hsp70 y un promotor sintético
40 regulado por CRE, incluyendo cualquier fragmento que tenga actividad de promotor. La expresión de una variante de OgLuc codificada también se puede controlar por procesos posteriores a la transcripción, tales como por la regulación del procesamiento del ARN o la regulación de la traducción, por ejemplo, por ARNi, ARNm, ARNh, ARNip o por ARN o la degradación de proteínas. La molécula de ácido nucleico, el casete de expresión y/o el vector desvelados en el presente documento se pueden introducir en una célula mediante cualquier método incluyendo, pero sin limitación, transformación mediada por calcio, electroporación, microinyección, lipofección y similares.

Secuencias optimizadas, y vectores y células hospedadoras que codifican las variantes de OgLuc

- También se proporciona una molécula aislada de ácido nucleico (polinucleótido) que comprende una secuencia de
50 ácido nucleico que codifica una variante de OgLuc descrita en el presente documento, un fragmento funcional de la misma o una de sus proteínas de fusión. La molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una secuencia de ácido nucleico que esté optimizada para la expresión en al menos un hospedador seleccionado. Las secuencias optimizadas incluyen secuencias con optimización de los codones, es decir, los codones que se emplean más frecuentemente en un organismo con respecto a otro organismo, por ejemplo, un organismo alejado, así como
55 modificaciones para añadir o modificar secuencias de Kozak y/o intrones y/o para eliminar las secuencias no deseadas, por ejemplo, sitios de unión de posibles factores de transcripción potencial. Dichas secuencias optimizadas pueden proporcionar una mayor expresión, por ejemplo, mayores niveles de expresión de proteínas, cuando se introducen en una célula hospedadora. Los ejemplos de secuencias optimizadas se desvelan en la patente de EE.UU. n.º 7.728.118 y las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2008/0070299,
60 2008/0090291 y 2006/0068395.

- El polinucleótido puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifique una variante de OgLuc descrita en el presente documento, cuya secuencia de ácido nucleico está optimizada para la expresión en una célula hospedadora de mamífero. Un polinucleótido optimizado ya no se puede hibridar con la secuencia no optimizada correspondiente, por ejemplo, no se hibrida con la secuencia no optimizada en condiciones de media o alta rigurosidad. El término "rigurosidad" se usa en referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y presencia
65

de otros compuestos, en las que se realizan las hibridaciones de ácidos nucleicos. Con condiciones de "alta rigurosidad", solo se producirá el apareamiento de bases de ácido nucleico entre fragmentos de ácido nucleico que tengan una alta frecuencia de secuencias de bases complementarias. Por lo tanto, las condiciones de rigurosidad "media" o "baja" a menudo se usan cuando se desea que los ácidos nucleicos que no sean completamente complementarios entre sí se hibriden o se apareen. En la técnica, se sabe bien que se pueden emplear numerosas condiciones equivalentes que comprendan condiciones de rigurosidad media o baja.

El polinucleótido puede tener menos del 90 %, por ejemplo, menos del 80 %, de identidad de secuencia de ácido nucleico con la secuencia no optimizada correspondiente y, opcionalmente, codifica un polipéptido que tiene al menos 60 %, por ejemplo, al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido codificado por la secuencia no optimizada. También se proporcionan construcciones, por ejemplo, casetes de expresión y vectores que comprendan la molécula de ácido nucleico aislada, por ejemplo, con la secuencia de ácido nucleico optimizada, así como kits que comprendan la molécula de ácido nucleico aislada, la construcción o el vector.

Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de OgLuc descrita en el presente documento, un fragmento de la misma o una de sus fusiones se optimiza opcionalmente para la expresión en una célula hospedadora en particular y también opcionalmente se liga operativamente a secuencias reguladoras de la transcripción, por ejemplo, uno o más potenciadores, un promotor, una secuencia de terminación de la transcripción o una combinación de los mismos, para formar un casete de expresión.

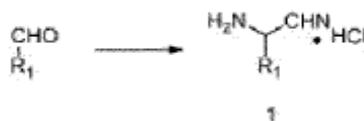
Una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de OgLuc desvelada en el presente documento, un fragmento de la misma o una de sus fusiones se optimiza mediante el reemplazo de codones, por ejemplo, al menos el 25 % de los codones de una secuencia de OgLuc parental por codones que se empleen preferentemente en una determinada célula (seleccionada). Los codones preferidos tienen una frecuencia relativamente alta de uso de codones en una célula seleccionada y, preferentemente, su introducción da lugar a la introducción de relativamente pocos sitios de unión a factores de transcripción para los factores de transcripción presentes en la célula hospedadora seleccionada, y relativamente pocos atributos estructurales no deseados distintos. Los ejemplos de atributos estructurales no deseados incluyen, pero sin limitación, sitios de enzimas de restricción, elementos de secuencias eucariotas, módulos de promotor de vertebrados y sitios de unión a factores de transcripción, elementos de respuesta, elementos de secuencia de *E. coli*, estructura secundaria de ARNm. Por lo tanto, el producto de ácido nucleico optimizado puede tener un mayor nivel de expresión debido a la mejor frecuencia de uso de los codones, y un menor riesgo de comportamiento de la transcripción inadecuado debido a un menor número de secuencias reguladoras de la transcripción no deseadas.

Una molécula de ácido nucleico aislada y optimizada puede tener una composición de codones que difiera de la de la secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre correspondiente en más del 30 %, 35 %, 40 % o más del 45 %, por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 % o más de los codones. Los codones de ejemplo para su uso según lo desvelado en el presente documento son aquellos que se emplean más frecuentemente que al menos otro codón para el mismo aminoácido en un determinado organismo y, también pueden no ser codones de bajo uso en ese organismo y no ser codones de bajo uso en el organismo usado para clonar o rastrear la expresión de la molécula de ácido nucleico. Por otra parte, los codones para ciertos aminoácidos (es decir, aquellos aminoácidos que tienen tres o más codones) pueden incluir dos o más codones que se emplean más frecuentemente que el otro o los otros codones (no preferidos). La presencia de codones en la molécula de ácido nucleico que se emplean más frecuentemente en un organismo que en otro organismo genera una molécula de ácido nucleico que, cuando se introduce en las células del organismo que emplea esos codones más frecuentemente, se expresa en esas células a un nivel que es mayor que la expresión de la secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre o parental en esas células.

Los codones que son diferentes pueden ser los que se emplean con mayor frecuencia en un mamífero, mientras que los codones que son diferentes pueden ser los que se emplean más frecuentemente en una planta. Los codones preferidos para diferentes organismos se conocen en la técnica, por ejemplo, véase <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Un tipo particular de mamífero, por ejemplo, un ser humano, puede tener un conjunto diferente de codones preferidos que otro tipo de mamífero. Del mismo modo, un determinado tipo de planta puede tener un conjunto diferente de codones preferidos que otro tipo de planta. La mayoría de los codones que difieren pueden ser los que son codones preferidos en una célula hospedadora deseada. Los codones preferidos para organismos incluyendo los mamíferos (por ejemplo, seres humanos) y las plantas son conocidos en la técnica (por ejemplo, Wada *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 18:2367 (1990); Murray *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:477 (1989)).

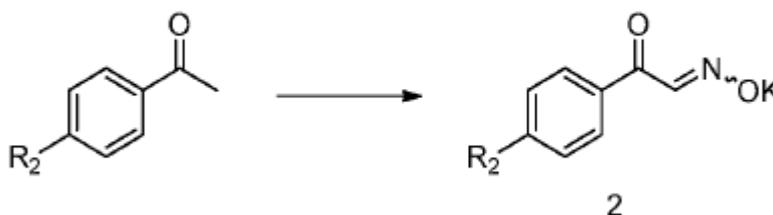
Ejemplos

Ejemplo de referencia 1 - Síntesis de α -aminonitrilo (Compuesto 1):



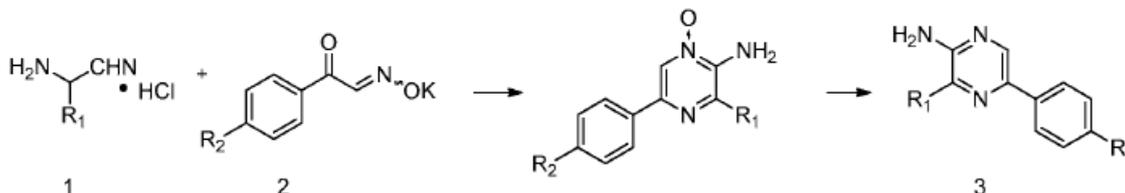
Se cargó un matraz con bisulfito de sodio (71,4 mmol) y 17 ml de agua. A esto, se añadió una solución de aldehído (69,3 mmol) en 14 ml de tetrahidrofurano (THF) gota a gota a una velocidad que mantuvo la temperatura interna por debajo de 60 °C. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 min y se añadió solución de hidróxido de amonio (4,85 ml) durante 2 min. La solución resultante se agitó magnéticamente mientras se calentaba en un baño de aceite a 60 °C durante 1 hora y luego se dejó a temperatura ambiente durante la noche. La solución se enfrió en un baño de hielo/agua salada hasta que la temperatura interna resultó ser inferior a 5 °C. A esto, se añadió una solución de cianuro de sodio (71,4 mmol) en 14 ml de agua gota a gota durante 30 min. La mezcla resultante se agitó a aproximadamente 10 °C durante 20 min, 30 °C durante 2 horas y a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se extrajo en tres porciones de 200 ml de éter dietílico, y los extractos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. La mezcla se filtró y la solución se enfrió en un baño de hielo durante 20 min. A la solución agitada, se añadió cloruro de hidrógeno gaseoso hasta que cesó la precipitación, y la suspensión se agitó durante 1 h. El sólido se aisló por filtración y se lavó con tres porciones de 50 ml de éter dietílico. El material se secó al vacío y se obtuvieron 6,4 g (47,5 mmol) de un sólido blanco (69 %). El procedimiento fue adaptado de: Freifelder y Hasbrouck, "Synthesis of Primary 1,2-Diamines by Hydrogenation of alpha-Aminonitriles", *Journal of the American Chemical Society*, 82(3):696-698 (1960).

Ejemplo de referencia 2 - Síntesis de oxima de 2-oxo-2-fenilacetaldehído (Compuesto 2):



Se cargó un matraz con *tert*-butóxido potásico (58 mmol) y 63 ml de alcohol *tert*-butílico. La mezcla se agitó hasta que se formó una solución, y se añadió una solución de la benzofenona apropiada (50 mmol) en 35 ml de alcohol *tert*-butílico gota a gota durante 15 min. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h, y se añadió el nitrito de isoamilo puro (75 mmol) durante cinco min. La mezcla de reacción se controló para determinar su finalización, y después se diluyó con 100 ml de heptanos. El sólido resultante (38 mmol) se recogió mediante filtración por succión y se secó a un peso constante al vacío. El procedimiento fue adaptado de: Hagedorn *et al.*, *Chem. Ber.*, 98:193 (1965).

Ejemplo de referencia 3 - Síntesis de derivados de pirazina (Compuesto 3)

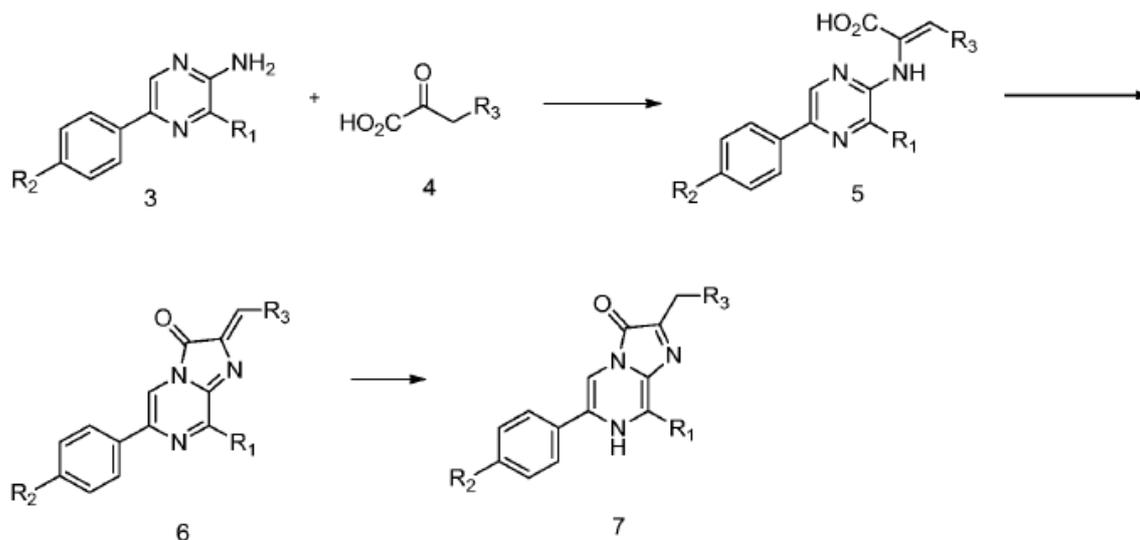


Se dotó un matraz de 3 bocas de un termómetro, septo y línea de argón. A esto, se añadieron aminonitrilo (47,5 mmol), piridina seca (190 ml) y oxima (61,75 mmol). La mezcla se agitó bien durante 15 min, y se añadió complejo de tetra-cloro(bis-piridil)titanio (94,9 mmol) en cinco porciones durante 35 min, asegurándose de que la temperatura interna permaneciera por debajo de 40 °C. Una vez completada la adición, se agitó la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió la mezcla de reacción lentamente a una solución de bicarbonato de sodio (21,75 g en 174 ml de agua) en pequeñas porciones. La mezcla resultante se agitó bien durante 15 min, y se añadieron 80 g de celite. La suspensión se agitó durante 30 min y se filtró a través de un embudo Buchner. El filtrado se retiró mediante un embudo de decantación, y la torta del filtro se suspendió en 400 ml de metanol. La mezcla se agitó durante 30 min y se filtró de nuevo. Este proceso se repitió un total de cuatro veces. Los filtrados metanólicos se combinaron y se concentraron, y el resto se disolvió en 200 ml de acetato de etilo (EtOAc). Se añadió la solución al embudo de decantación que contenía el filtrado original, y la mezcla se extrajo adicionalmente con tres porciones de 100 ml de EtOAc. Los extractos combinados se lavaron con dos porciones de 100 ml de carbonato de sodio saturado y dos porciones de 100 ml de solución de salmuera. El disolvente orgánico se evaporó, y se obtuvo óxido de pirazina bruto en forma de un aceite marrón. El material se disolvió en 3 ml de

metanol, y se añadieron 89 ml de diclorometano (DCM). A esta solución, se añadió polvo de cinc (80,7 mmol) y se obtuvo la mezcla enfriada en un baño de hielo hasta una temperatura interna de 15 °C. La mezcla se trató con ácido acético glacial (3 ml) y se calentó a una temperatura interna de 30 °C en un baño de aceite durante 40 min. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se filtró a través de un lecho corto de celite. La torta del filtro se enjuagó con DCM y los filtrados combinados se lavaron con una solución acuosa de bicarbonato sódico saturado. El producto bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de heptano/EtOAc. Esto dio 2,9 g (29 %) de la pirazina como un sólido marrón. El procedimiento fue adaptado de: Kishi *et al.*, "The structure confirmation of the light-emitting moiety of bioluminescent jellyfish". *Tetrahedron Lett.*, 13(27):2747 (1972).

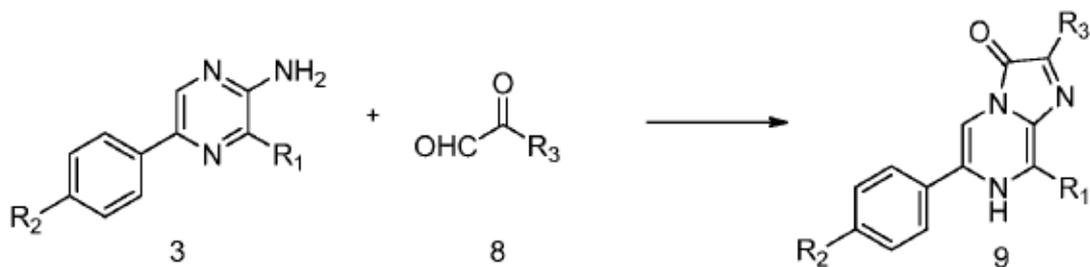
10 Ejemplo de referencia 4 - Síntesis de coelenterazinas

Método A: (los siguientes compuestos se pueden sintetizar mediante el Método A: compuestos PBI-3840, PBI-3886, PBI-3857, PBI-3887, PBI-3913, PBI-3894, PBI-3896, PBI-3897, PBI-3841 y PBI-3842)



Se cargó un matraz con pirazina (8,25 mmol), ácido pirúvico (14,0 mmol), ácido alcanforsulfónico (0,8 mmol) y 2-metil-THF anhidro (150 ml). Se dotó al matraz de un condensador y extractor soxhlet cargado con tamices moleculares de 4 angstrom, y la mezcla de reacción se calentó en un baño de aceite a 110 °C durante 18 horas. Los tamices se reemplazaron por otros nuevos, y se continuó el reflujo durante 24 horas. La mezcla de reacción se filtró y se concentró, y el resto se disolvió en EtOAc (200 ml). Esta solución se lavó con tres porciones de 25 ml de solución saturada de bicarbonato sódico, 100 ml de tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5 y 100 ml de solución de salmuera. La solución se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró, dando 2,3 g (6,2 mmol, 75 %) de la enamina/ácido en bruto. Este material se disolvió en THF anhidro (30 ml) y la solución se enfrió en un baño de hielo/agua durante 10 min. A esto, se añadieron la carbodiimida (9,0 mmol) y diisopropiletilamina pura (14,9 mmol). El baño frío se retiró después de 10 min y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. A la mezcla de reacción, se añadieron 50 ml de tampón de acetato de sodio 0,1 M a pH 5, y la mezcla se agitó bien durante 10 min. La mezcla bifásica se extrajo con tres porciones de 100 ml de EtOAc y los extractos combinados se lavaron con solución de salmuera. La solución orgánica se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de DCM/metanol. Esto dio 336 mg (0,94 mmol, 16 %) de la deshidrocoelenterazina en forma de un sólido rojo. Este material se suspendió en 10 ml de metanol y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. A esto, se añadió borohidruro de sodio (100 mg, 2,6 mmol) en tres porciones durante 1 h. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min más, y se añadió ácido acético glacial puro gota a gota hasta que se alcanzó un pH 5. La solución se concentró y el residuo se trituró con 15 ml de agua. El sólido se aisló mediante filtración por succión y se secó al vacío durante varias horas, dando 318 mg (94 %) de la coelenterazina en bruto en forma de un sólido amarillo. El procedimiento fue adaptado de: Kakoi e Inoue, *Chem. Lett.* 11(3):299-300 (1980).

Método B: (los siguientes compuestos se pueden sintetizar mediante el método B: compuestos PBI-3882, PBI-3932, PBI-3881)



5 Se cargó un matraz con el glicoxal (2,2 mmol), aminopirazina (1,1 mmol), etanol (20 ml), HCl 12 N (0,6 ml) y agua (1 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 24 horas y se concentró. El resto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando un gradiente de DCM/metanol. Esto dio 100 mg (0,25 mmol, 23 %) del producto de coelenterazina en forma de un sólido oscuro. El procedimiento fue adaptado de: Inoue *et al.* "Squid bioluminescence. II. Isolation from *Watasenia scintillans* and synthesis of 2-(p-hydroxybenzyl)-6-(p-hydroxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one". *Chem. Lett.*, 4(2):141-4 (1975).

10 **Método C:** Síntesis de nuevas coelenterazinas (los siguientes compuestos se pueden sintetizar mediante el método C: PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889, PBI-4002)

15 El compuesto 4-(5-amino-6-bencilpirazin-2-il)fenol se puede preparar de acuerdo con métodos descritos previamente (Kishi *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 13: 2747 (1972); Mosrin *et al.*, *Organic Letters*, 11: 3406 (2009); Kakoi, *Chem. Pharm. Bull.*, 50: 301 (2002)).

20 **Síntesis de 2-amino-3-bencil-5-fenilpirazina.** Se cargó un matraz de fondo redondo con 5 g (33,5 mmol) de 2-isonitrosoacetofenona, 6,7 g (36,8 mmol) de clorhidrato de 2-amino-3-fenilpropanonitrilo y 100 ml de piridina seca. La mezcla se enfrió hasta -20 °C, y se añadieron 4,6 ml (40,0 mmol) de TiCl₄ gota a gota. La reacción se mantuvo a -20 °C durante 30 min y se calentó hasta 80 °C durante 2,5 h. El disolvente se evaporó y el residuo se recogió en 1 l de DCM. Esta solución se lavó con solución saturada de NaHCO₃ y salmuera. Todos los volátiles se evaporaron y el residuo se volvió a disolver en etanol (400 ml). Se añadió Ni Raney (2,0 g, suspensión acuosa), y la reacción se dejó en agitación durante 5 días bajo 1 atmósfera de hidrógeno. La mezcla se pasó a través de celite y las sustancias volátiles se eliminaron. El residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice (heptano/DCM), dando 2,5 g (29 %) de 2-amino-3-bencil-5-fenilpirazina.

30 **Síntesis de clorhidrato de 2-amino-3-fenilpropanonitrilo.** Se cargó un matraz de fondo redondo con 65 g (0,624 mol) de hidrogenosulfuro de sodio y 150 ml de agua. Se añadió gota a gota una solución de 75 g (0,624 mol) de fenilacetaldehído en 150 ml de THF. Después de agitar durante 20 min, se añadieron 37 ml de hidróxido de amonio 14 M en una porción, y la mezcla se calentó hasta 60 °C durante 60 min. Tras enfriar hasta 0 °C, la mezcla se diluyó con 150 ml de agua, y se añadió una solución de cianuro de sodio (27,5 g, 0,560 mol) en 100 ml de agua gota a gota, manteniendo la temperatura interna por debajo de 10 °C. Tras la adición, la mezcla se calentó hasta 30 °C durante 2 horas y se extrajo con éter. Después de secar con sulfato de sodio, se evaporaron todas las sustancias volátiles, y el residuo se disolvió en 3,5 l de éter y se trató con 400 ml de HCl etanólico 3,3 M. El precipitado resultante se filtró y se secó al vacío, dando 55 g (60 %) de producto.

40 **Síntesis de ácido 3-(furan-2-il)-2-oxopropanoico.** A una matraz de 100 ml, se añadió 3-(furan-2-il)-2-oxopropanoato (940 mg) junto con 23 ml de NaOH 6 N frío. La mezcla insoluble se agitó en un baño de 90 °C durante 5 min hasta que se disolvió. Se añadió HCl 1 N frío hasta que la solución se volvió ácida (aproximadamente 120 ml). Se extrajo la solución 2 veces con 50 ml de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 40 ml de salmuera y se secaron con Na₂SO₄. La solución se evaporó, proporcionando 540 mg de sólido marrón. El sólido se purificó adicionalmente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (HPLC) con rampa de ácido trifluoroacético acuoso al 97 % (TFA) a acetonitrilo (ACN).

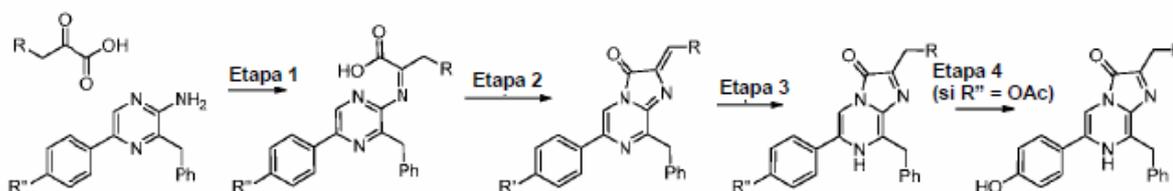
45 **Síntesis de 3-(furan-2-il)-2-oxopropanoato de etilo.** A una matraz de 500 ml que contiene la mezcla de isómeros (E/Z)-etil-2-formamido-3-(furan-2-il)acrilato (5,0 g), se añadió una solución enfriada de 220 ml de HCl 1,4 M (5 %) en etanol/agua a 50/50. Después de 5 h, la reacción se repartió entre 200 ml de EtOAc y 30 ml de salmuera. La capa acuosa se extrajo 2 veces con 50 ml de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 1 x 50 ml de agua y 1 x 50 ml de salmuera, y se secaron sobre Na₂SO₄. Las capas orgánicas se evaporaron conjuntamente con 26 g de celite y se eluyeron a través de 80 g de oro de sílice con rampa de heptano a EtOAc. Las fracciones combinadas apropiadas se evaporaron, dando 2,1 g.

55 **Síntesis de (E/Z)-etil-2-formamido-3-(furan-2-il)acrilato.** A un matraz de 500 ml, se añadieron 50 ml de éter dietílico, Cu₂O (320 mg) y aldehído furilo (5,2 ml). Se enfrió el matraz en un baño de hielo, y se añadió 2-isocianoacetato de etilo (5,3 ml). Después de 1,5 horas, se añadió *tert*-butóxido de potasio (5 g) a la reacción. Después de 4 horas, se

filtró la reacción heterogénea. Se añadieron 60 ml de ácido cítrico al 30 % y 20 ml de EtOAc, y se agitó durante 10 min. La capa acuosa se extrajo con 50 ml de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Las capas de EtOAc se evaporaron junto con 24 g de celite, y se eluyeron a través de 80 g de oro de sílice con rampa de heptano a EtOAc. El jarabe de color amarillo se usó sin purificación adicional.

5 *Síntesis de ácido 2-oxo-3-(tiofen-2-il)propanoico.* A una matraz de 250 ml, se añadieron (E/Z)-5-(tiofen-2-ilmetileno)imidazolidin-2,4-diona (5,0 g) y 100 ml de NaOH 6 N frío. La mezcla se calentó hasta 100 °C durante 1 h. Se añadió HCl concentrado a la solución enfriada hasta la acidez (pH = 1). La mezcla se extrajo 8 veces con 50 ml de éter dietílico. Las capas de éter combinadas se lavaron con 50 ml de salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron, dando 3,36 g de sólido. La muestra se purificó adicionalmente por recristalización con α,α,α-trifluorotolueno, dando 1,63 g.

15 *Síntesis de (E/Z)-5-(tiofen-2-ilmetileno)imidazolidin-2,4-diona.* A un matraz de 250 ml, se añadieron hidantoina (9,8 g) y tiofen-2-carbaldehído (10 g). A la mezcla, se goteó piperidina (9,6 ml). La mezcla se calentó hasta 100 °C durante 1 hora y después se vertió en 300 ml de HCl 1 N. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío, dando 4,9 g de sólido.



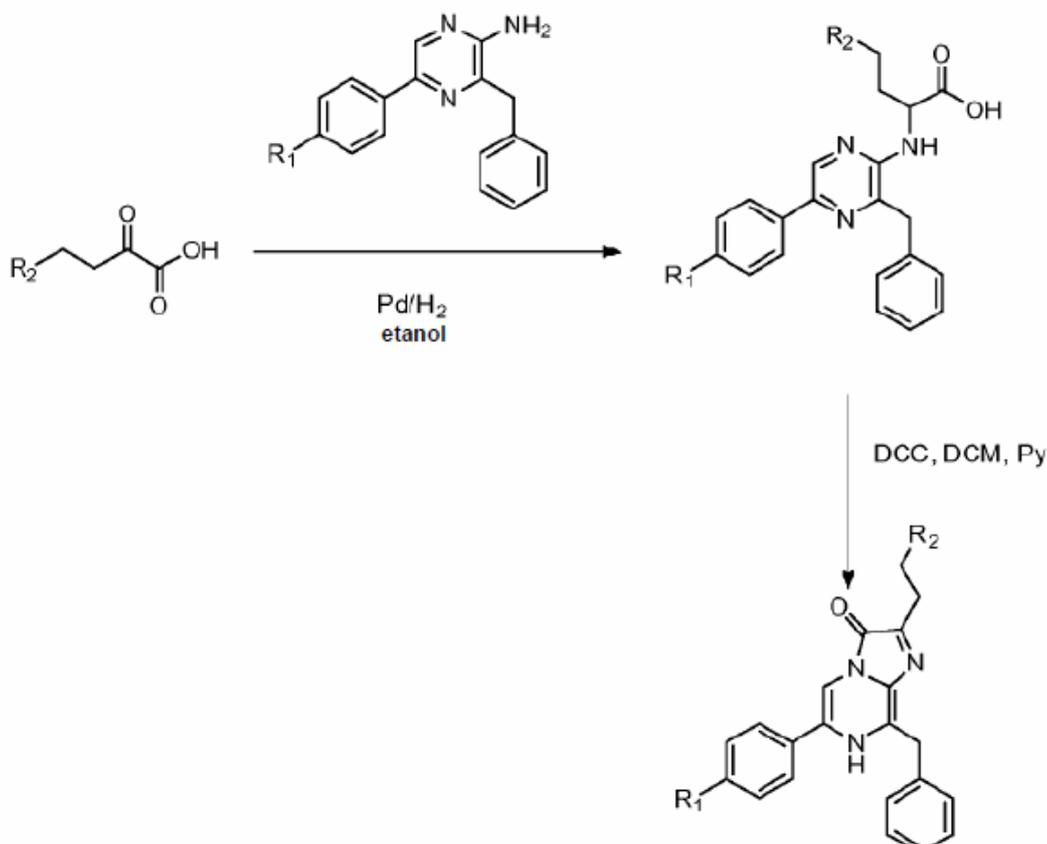
20 *Etapa 1* - En un vial de microondas (10 ml), se calentaron la fenilpirazina-2-amina apropiada (100 mg), el ácido pirúvico apropiado (2 equivalentes), DCM (1 ml) y 1,1,1-trifluoroetanol (1 ml) con agitación durante 30 min a 80 °C. La reacción se coadsorbió en 2 gramos de celite, y los disolventes retiraron al vacío. Se cargó el Celite en 24 g de gel de sílice esférica y se eluyó con una rampa de heptanos a acetato de etilo. Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron.

25 *Etapa 2* - Se enfrió el material aislado en la etapa 1 disuelto en THF (0,5 ml) en un baño de hielo. Se añadieron anhídrido acético (25 µl), dimetilaminopiridina (8,5 mg) y trietilamina (25 µl). Después de 2 horas, la mayoría del THF se había eliminado al vacío. El producto se precipitó con una solución acuosa de ácido cítrico al 30 % (2 ml). El sólido se lavó con agua (2 ml) y después se disolvió en 3 ml de DCM. El DCM se lavó 1 vez con 2 ml de agua seguidos de 1 vez con 2 ml de salmuera. La capa de DCM se coadsorbió en 2 gramos de celite y el disolvente se eliminó al vacío. Se cargó el Celite en 12 g de gel de sílice esférica y se eluyó con una rampa de heptanos a DCM. Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron.

35 *Etapa 3* - Se enfrió el material de la etapa 2 disuelto en DCM (1 ml) en un baño de hielo. A la solución, se añadieron metanol (0,5 ml) y una solución de borohidruro de sodio en diglima (325 µl de 0,5 M). Después de 2 horas, se añadió ácido acético (10 µl), y se dividió rápidamente la solución entre una solución acuosa de ácido cítrico al 30 % (1 ml) y DCM (2 ml). La capa de DCM se coadsorbió en 1 gramo de Celite, y el disolvente se eliminó al vacío. Se cargó el Celite en 4 g de gel de sílice esférica y se eluyó con una rampa de DCM a EtOAc. Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron.

40 *Etapa 4* (solo si R'' = OAc) - El material de la etapa 3 se disolvió en THF (200 µl) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió 1 equivalente de metóxido de potasio 1,35 M en THF a la solución. Tras 30 min, se dividió la reacción entre DCM (1 ml) y ácido cítrico al 30 % (1 ml). La capa de DCM se coadsorbió en 0,5 g de Celite, y el disolvente se eliminó al vacío. Se cargó el Celite en 4 g de gel de sílice esférica y se eluyó con una rampa de DCM a EtOAc. Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron.

45 *Método D:* (los siguientes compuestos se pueden sintetizar mediante el método D: compuestos PBI-3899, PBI-3900, PBI-3925, PBI-3933, PBI-3946). En general, se condensó una aminopirazina con 2 equivalentes de un 2-oxoácido en una atmósfera de hidrógeno en presencia de catalizador de paladio. El ácido alfa-amino producido se purificó y posteriormente se activó para la condensación intramolecular, dando lugar a la imidazopirazinona correspondiente.



Ejemplo 5 - Síntesis de 8-bencil-6-(4-hidroxifenil)-2-propilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona

5 *Ácido 2-((3-bencil-5-(4-hidroxifenil)pirazin-2-il)amino)pentanoico.* Se mezcló 4-(5-amino-6-bencilpirazin-2-il)fenol (100 mg, 0,36 mmol) con ácido 2-oxovalérico (84 mg, 0,72 mmol) en etanol (20 ml). Se añadió Pd/C (paladio al 10 % en carbón activo, 40 mg) y la mezcla de reacción se calentó hasta 65 °C. Se burbujeó aire mediante gas N₂ y se aplicó un globo de hidrógeno al matraz de reacción. La reacción se agitó continuamente durante 4 horas. Después de enfriar, se filtró y la solución resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (disolvente de elución: EtOAc al 50 % en heptano), dando el producto en forma de un polvo amarillo (70 mg, 52 %). RMN de ¹H (300 MHz, CD₂Cl₂, δ): 8,31 (s, 1H), 7,82 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,31 (m, 5H), 6,92 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 5,34 (s, 2H), 4,20 (m, 1H), 1,10 (m, 2H), 0,98 (m, 2H), 0,87 (t, 3H); MS (ESI) m/z 378,3 (M+1).

15 *8-Bencil-6-(4-hidroxifenil)-2-propilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona.* Se disolvió 2-((3-bencil-5-(4-hidroxifenil)pirazin-2-il)amino)pentanoico (49 mg, 0,13 mmol) en DCM (10 ml). Se añadió piridina (0,5 ml) seguida de N,N'-dodiclohexilcarbodiimida (54 mg, 0,26 mmol). La mezcla de reacción se agitó lentamente a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (disolvente de elución: EtOAc a DCM a metanol al 10 % en DCM), dando el producto en forma de un polvo amarillo (40 mg, 86 %). RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD, δ): 7,35 (m, 8H), 6,88 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 2,81 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,02 (t, J = 7,5 Hz, 3H); MS (ESI) m/z 359,0.

Ejemplo 6 - Síntesis de 8-bencil-2-butil-6-(4-hidroxifenil)imidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona

25 *Ácido 2-((3-bencil-5-(4-hidroxifenil)pirazin-2-il)amino)hexanoico.* Se mezcló 4-(5-amino-6-bencilpirazin-2-il)fenol (200 mg, 0,72 mmol) con la sal de sodio de ácido 2-cetohexanoico (220 mg, 1,44 mmol) en etanol (20 ml). Se añadió Pd/C (paladio al 10 % en carbón activo, 100 mg) con unas cuantas gotas de ácido acético, y se calentó la mezcla de reacción hasta 65 °C. Se burbujeó aire mediante gas N₂ y se aplicó un globo de hidrógeno al matraz de reacción. La reacción se agitó continuamente durante 4 horas. Tras volver a enfriar, se filtró y la solución resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (disolvente de elución: EtOAc al 50 % en heptanos), dando el producto en forma de un polvo amarillo (130 mg, 46 %). MS (ESI): m/z 392,2 (M+1).

30 *8-Bencil-2-butil-6-(4-hidroxifenil)imidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona.* Se disolvió ácido 2-((3-bencil-5-(4-hidroxifenil)pirazin-2-il)amino)hexanoico (130 mg, 0,33 mmol) en DCM (10 ml). Se añadió piridina (0,5 ml) seguida por N,N'-dodiclohexilcarbodiimida (137 mg, 0,67 mmol). La mezcla de reacción se agitó lentamente a temperatura

ambiente durante 1 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (disolvente de elución: EtOAc a DCM a metanol al 10 % en DCM), dando el producto en forma de un polvo amarillo (110 mg, 89 %). RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD , δ): 7,30 (m, 8H), 6,88 (d, 2H), 4,40 (s, 2H), 2,84 (t, 2H), 1,77 (m, 2H), 1,51 (m, 2H), 0,89 (m, 3H); MS (ESI) m/z 374,3 (M + 1).

5

Ejemplo 7-Síntesis de 8-bencil-2-etil-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona (PBI- 3925)

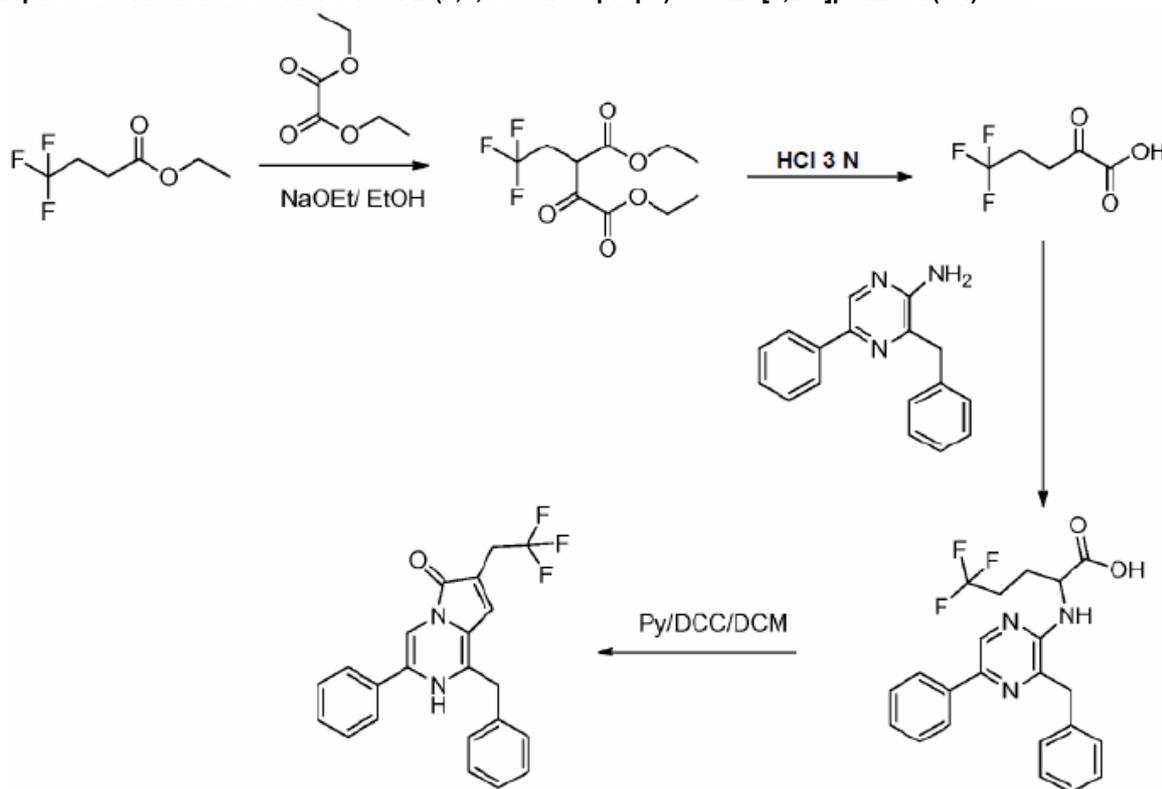
Ácido 2-((3-bencil-5-fenilpirazin-2-il)amino)butanoico. Se mezcló 3-bencil-5-fenilpirazin-2-amina (200 mg, 0,77 mmol) con ácido 2-oxobutírico (157 mg, 1,54 mmol) en etanol (20 ml). Se añadió Pd/C (paladio al 10 % en carbón activo, 100 mg) y la mezcla de reacción se calentó hasta 65 °C. Se burbujeó aire mediante gas N_2 y se aplicó un globo de hidrógeno al matraz de reacción. La reacción se agitó continuamente durante 4 horas. Después de enfriar, se filtró y la solución resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (disolvente de elución: EtOAc al 50 % en heptano), dando el producto en forma de un polvo amarillo (90 mg, 34 %). RMN de ^1H (300 MHz, CD_2Cl_2 , δ): 7,72 (s, 1H), 7,32-7,48 (m, 10H), 4,46 (s, 2H), 4,20 (m, 2H), 2,25 (c, 2H), 0,99 (t, 3H); MS (ESI): m/z 348,3 (M+1).

15

Se disolvió ácido 2-((3-bencil-5-fenilpirazin-2-il)amino)butanoico en DCM (10 ml). Se añadió piridina (0,5 ml) seguida de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (137 mg, 0,67 mmol). La mezcla de reacción se agitó lentamente a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (disolvente de elución: EtOAc a DCM a metanol al 10 % en DCM), dando el producto en forma de un polvo amarillo (110 mg, 89 %). RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD , δ): 7,26 (m, 3H), 6,84-7,07 (m, 8H), 4,03 (s, 2H), 2,47 (c, J = 9,0 Hz, 2H), 0,96 (t, J = 9,0 Hz, 3H); MS (ESI): m/z 330,2 (M+1).

20

Ejemplo 8 - Síntesis de 8-bencil-6-fenil-2-(3,3,3-trifluoropropil)imidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona



25

Ácido 5,5,5-trifluoro-2-oxopentanoico. Se disolvieron 4,4,4-trifluorobutirato de etilo (1 g, 5,88 mmol) y oxalato de dietilo (3,87 g, 26,5 mmol) en etanol. Se añadió etóxido de sodio (21 % en etanol, 2,09 g) a la solución y se agitó la mezcla de reacción durante 0,5 h. Se separó el disolvente por destilación, y el residuo se extrajo con EtOAc/agua. Las capas orgánicas se recogieron y se secaron sobre sulfato de sodio. Después de la filtración, se eliminó el disolvente, dando un líquido transparente. MS (ESI): m/z 269,1 (M-1). A continuación, se disolvió el líquido en HCl 3 N (20 ml) y se sometió la mezcla de reacción a reflujo durante 4 h. Después de enfriar, se extrajo la mezcla de reacción con EtOAc. Las capas orgánicas se recogieron y se secaron sobre sulfato de sodio. Después de la filtración, se eliminó el disolvente y el residuo se usó directamente en la siguiente etapa. MS (ESI): m/z 169,7 (M-1).

30

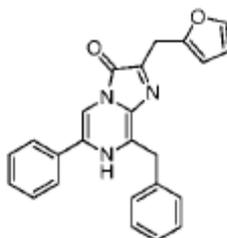
Ácido 5,5,5-trifluoro-2-((3-bencil-5-fenilpirazin-2-il)amino)butanoico. Se mezcló 3-bencil-5-fenilpirazin-2-amina (240 mg, 0,92 mmol) con ácido 5,5,5-trifluoro-2-oxopentanoico (150 mg, 0,88 mmol) en etanol (20 ml). Se añadió Pd/C (paladio al 10 % en carbón activo, 100 mg) y la mezcla de reacción se calentó hasta 65 °C. Se burbujeó aire mediante gas N_2 y se aplicó un globo de hidrógeno al matraz de reacción. La reacción se agitó continuamente

35

durante 4 horas. Después de enfriar, se filtró y la solución resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (disolvente de elución: EtOAc al 50 % en heptano), dando el producto en forma de un polvo amarillo (200 mg, 54 %). RMN de ^1H (300 MHz, CD_2Cl_2 , δ): 11,45 (s, 1H), 10,20 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,34 (m, 10H), 5,34 (s, 2H), 3,96-4,23 (m, 2H), 3,02-3,28 (m, 2H); FNMR: -76,3; MS (ESI): m/z 416,1 (M+1).

5 *Coelenterazina* ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$). Se disolvió ácido 5,5,5-trifluoro-2-((3-bencil-5-fenilpirazin-2-il)amino)butanoico (100 mg, 0,24 mmol) en DCM (10 ml). Se añadió piridina (0,5 ml) seguida de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (100 mg, 0,48 mmol). La mezcla de reacción se agitó lentamente a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (disolvente de elución: EtOAc a DCM a metanol al 10 % en DCM), dando el producto en forma de un polvo amarillo (80 mg, 87 %). RMN de ^1H (300 MHz, CD_2Cl_2 , δ): 7,36 (m, 11H), 3,43 (s, 2H), 1,60-1,92 (m, 4H); FNMR: 67,4 (t, $J = 18$ Hz); MS (ESI): m/z 398,2 (M+1).

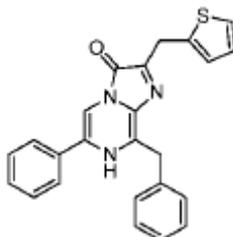
Ejemplo 9 - Síntesis de 8-bencil-2-(furan-2-ilmetil)-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona (PBI-3939)



PBI-3939

15 *8-Bencil-2-(furan-2-ilmetil)-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona*: sintetizada a partir del método C usando ácido 3-(furan-2-il)-2-oxopropanoico y 3-bencil-5-fenilpirazin-2-amina como materiales de partida. RMN de ^1H (300 MHz, dmsó) δ 8,88 (s, 1H), 8,02 (d, $J = 7,9$, 2H), 7,61-7,38 (m, 6H), 7,37-7,14 (m, 3H), 6,38 (s, 1H), 6,26 (d, $J = 3,2$, 1H), 20 4,64 (s, 3H), 4,40 (s, 3H); masa exacta calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2^+$ $m/z + 382,16$; encontrada $m/z + 382$.

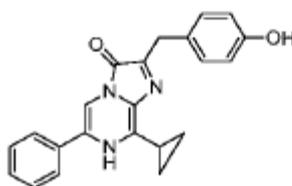
Ejemplo 10 - Síntesis de 8-bencil-6-fenil-2-(tiofen-2-ilmetil)imidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona (PBI-3889)



PBI-3889

25 *8-Bencil-6-fenil-2-(tiofen-2-ilmetil)imidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona*: sintetizada a partir del método C usando ácido 2-oxo-3-(tiofen-2-il)propanoico y 3-bencil-5-fenilpirazin-2-amina como materiales de partida. RMN de ^1H (300 MHz, dmsó) δ 8,85 (s, 1H), 7,99 (d, $J = 6,8$, 2H), 7,63-7,02 (m, 10H), 6,94 (dd, $J = 3,5; 5,1$, 1H), 4,62 (s, 2H), 4,58 (s, 2H), 2,69 (contaminado); masa exacta calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2^+$ $m/z + 398,13$, encontrada $m/z + 398$.

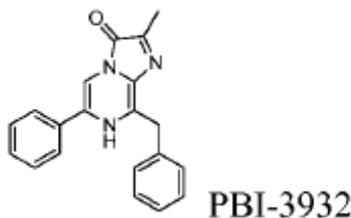
Ejemplo 11 - Síntesis de 8-ciclopropil-2-(4-hidroxibencil)-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona (PBI-3897)



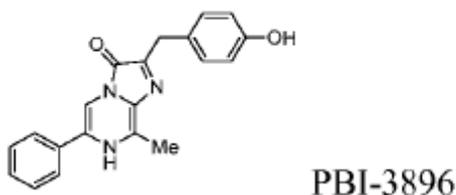
PBI-3897

30 *8-Ciclopropil-2-(4-hidroxibencil)-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona*: sintetizada usando el método A con 3-ciclopropil-5-fenilpirazin-2-amina y ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-oxopropanoico como materiales de partida. Masa exacta calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2^-$ $m/z - 356,14$, encontrada $m/z - 356$.

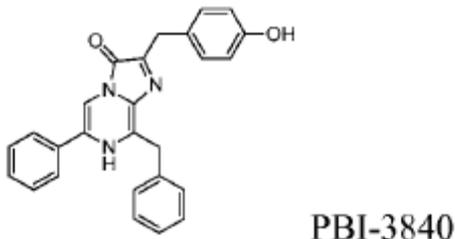
35

Ejemplo 12 - Síntesis de 8-bencil-2-metil-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona (PBI-3932)

5 *8-Bencil-2-metil-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona*: sintetizada usando el método B con 1,1-dimetoxipropan-2-ona y 3-bencil-5-fenilpirazin-2-amina como materiales de partida. Masa exacta calculada para $C_{20}H_{18}N_3O^+$ $m/z+ 316,14$, encontrada $m/z+ 316$.

Ejemplo 13 - Síntesis de 2-(4-hidroxibencil)-8-metil-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona (PBI-3896)

10 *2-(4-Hidroxibencil)-8-metil-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona*: sintetizada usando el método A con 3-metil-5-fenilpirazin-2-amina y ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-oxopropanoico como materiales de partida. RMN de 1H (300 MHz, dmso) δ 8,84 (s, 1H), 8,00 (d, J = 7,6, 2H), 7,47 (dd, J = 8,6; 16,2, 3H), 7,17 (d, J = 7,3, 2H), 6,69 (d, J = 8,4, 2H), 6,26 (s, 4H), 4,17 (s, 2H), 2,86 (s, 3H), 2,48 (s, 1H).

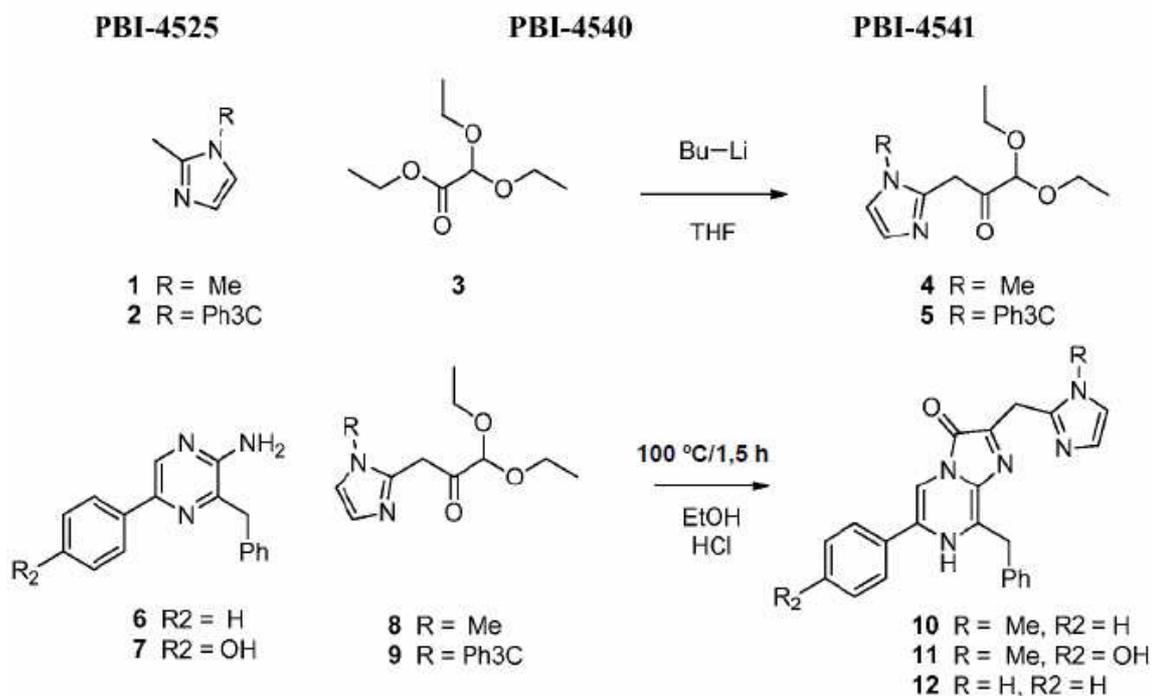
Ejemplo 14 - Síntesis de 8-bencil-2-(4-hidroxibencil)-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona (PBI-3840)

15 *8-Bencil-2-(4-hidroxibencil)-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona*: sintetizada usando el método A con ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-oxopropanoico y 3-bencil-5-fenilpirazin-2-amina como materiales de partida. Masa exacta calculada para $C_{26}H_{22}N_3O_2^+$ $m/z+ 408,17$, encontrada $m/z+ 408$.

Ejemplo 15 - Síntesis de Coelenterazina protegida (estabilizada) (PBI-4377)

25 A una mezcla de PBI-3939, carbonato de potasio (1,1 equiv) y yoduro de potasio (1,1 equiv) en dimetilformamida (DMF), bajo una atmósfera de argón, se añadió un equivalente de pivalato de clorometilo a temperatura ambiente. Se controló el progreso de la reacción mediante cromatografía en capa fina y, al finalizar, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo durante varios minutos antes de la adición de un volumen de agua igual al volumen de reacción. La mezcla resultante se extrajo con un disolvente orgánico adecuado (por ejemplo, EtOAc) y el extracto se concentró, dando el producto en bruto. El material se purificó adicionalmente por cromatografía sobre gel de sílice.

30 **Ejemplo 16 - Síntesis de 8-bencil-2-((1-metil-1H-imidazol-2-il)metil)-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona (PBI-4525), 8-bencil-6-(4-hidroxifenil)-2-((1-metil-1H-imidazol-2-il)metil)-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona (PBI-4540) y 2-((1H-imidazol-2-il)metil)-8-bencil-6-fenilimidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-ona (PBI-4541)**



A un matraz que contenía 10 mmol de derivado 1 o 2 de 2-metil-imidazol bajo una atmósfera de argón, se añadieron 20 ml de THF seco, y la solución se enfrió en un baño de hielo seco/acetona hasta aproximadamente -78 °C. A la mezcla fría, se añadieron 9,3 mmol de una solución de n-butil-litio (2,46 M en hexanos) gota a gota durante varios minutos. La solución resultante se agitó a aproximadamente -78 °C durante 30 min, y se añadieron 6,7 mmol de compuesto 3 con una jeringa. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas y se inactivó con la adición de 20 ml de solución saturada de cloruro de amonio y 20 ml de solución saturada de bicarbonato sódico. El baño frío se retiró y, después de calentar hasta la temperatura ambiente, la mezcla se extrajo 3 veces con 100 ml de EtOAc. Los extractos combinados se secaron (MgSO₄), se concentraron al vacío y los compuestos 4 o 5 en bruto se purificaron por cromatografía en columna usando gel de sílice (EtOAc/heptano).

Se cargó un vial de microondas con 100 mg (1 eq) de compuesto 6 o 7 y 2 equivalentes de compuesto 8 o 9. A la mezcla, se añadieron 4,5 ml de etanol y 0,25 ml de HCl concentrado. La mezcla de reacción se calentó en un microondas a 100 °C durante 1,5 h. La mezcla resultante se añadió a 50 ml de EtOAc y se lavó secuencialmente con 20 ml de solución saturada de bicarbonato sódico y 20 ml de salmuera. La fase orgánica se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando gel de sílice (metanol/diclorometano), dando los compuestos 10-12.

20 Ejemplo 17 - Estabilidad y caracterización de la autoluminiscencia de las nuevas coelenterazinas

Se determinaron la estabilidad y la caracterización de la autoluminiscencia de las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3889, PBI-3945, PBI-4002 o PBI-3896. Una mayor estabilidad y una menor autoluminiscencia es una característica técnica atractiva en un sustrato/reactivo.

Para determinar la estabilidad, se colocaron 20 μM de las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3889, PBI-3945, PBI-4002 o PBI-3896, 30 μM de coelenterazina natural o 22 μM de coelenterazina-h conocida o coelenterazina-hh conocida en un tampón de reactivo indicador que contenía CDTA 50 mM, KCl 150 mM, DTT 50 mM, tiourea 35 mM, TERGITOL® NP-9 al 1 % (v/v) y MAZU® DF 204 al 0,1 %. Se incubaron muestras idénticas a temperatura ambiente (es decir, a 22-24 °C) durante distintos periodos de tiempo y después se transfirieron a -70 °C. Una vez recogidas y congeladas todas las muestras, se descongelaron y se mezclaron con 10 μl de lisado celular bacteriano que contenía la variante de OgLuc IV en 40 μl de DMEM sin rojo de fenol + PRIONEX® al 0,1 %. La luminiscencia de la muestra se leyó a los 5 min de la adición de IV.

"T₉₀" indica la cantidad de tiempo que tardó la señal luminiscente en desintegrarse en un 10 % (es decir, pérdida de actividad del 10 %) a temperatura ambiente, es decir, a 22 °C. La tasa de desintegración de la señal luminiscente ("T₉₀") se determinó a partir de la pendiente del ajuste lineal de los datos representados como URL en función del tiempo, que se calculó a partir de la siguiente ecuación: $t = \ln(A/A_0) / (-k)$, donde A = intensidad en el tiempo t, A₀ = intensidad en el tiempo 0 y k = la tasa de desintegración. Como se muestra en la Tabla 1, los valores de T₉₀ para las coelenterazinas-h y -hh conocidas, las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3889, PBI-3945, PBI-4002 y PBI-3896 fueron superiores a los de la coelenterazina natural, lo que indica que estas coelenterazinas fueron compuestos más

estables que la coelenterazina natural.

Para determinar la caracterización de la autoluminiscencia, se cultivaron las células HEK293 durante la noche a 15.000 células por pocillo en DMEM + FBS al 10 % + piruvato. Se eliminó el medio y se reemplazó con 20 μ M de cada una de las nuevas coelenterazinas mostradas en la FIG. 2, es decir, PBI-3939, PBI-3889, PBI-3945, PBI-4002, PBI-3841, PBI-3897, PBI-3896, PBI-3925, PBI-3894, PBI-3932 y PBI-3840, coelenterazina natural y coelenterazinas conocidas, coelenterazina-h y coelenterazina-hh, diluidas en medios independientes de CO₂ más FBS al 10 %. La luminiscencia se midió poco después de la adición del sustrato en el luminómetro GLOMAX® (1 s/pocillo). La luminiscencia de fondo fue de 154 \pm 15 URL. La Tabla 1 muestra la caracterización de la autoluminiscencia normalizada con respecto a la coelenterazina natural ("Autolum (normalizada con respecto a coel)"). Aunque la coelenterazina-h tuvo una mayor autoluminiscencia que la coelenterazina natural, el resto de coelenterazinas ensayadas resultó tener menos autoluminiscencia.

Tabla 1: Experimentos de estabilidad y caracterización de la autoluminiscencia de IV con diversas Coelenterazinas

ID del sustrato	Estabilidad (pH 8) (T ₉₀ en h)	Autolum (normalizada con respecto a coel)
Coel	1,7	1
Coel h	2,1	1,2
Coel hh	2,0	0,3
3939	4,1	0,2
3889	2,9	0,2
3945	3,3	0,5
4002	3,5	0,6
3841		0,1
3897		0,1
3896	2,8	0,1
3894		0,2
3932		0,1
3840		0,2
3925		0,2

Ejemplo 18-Toxicidad de las nuevas coelenterazinas

La toxicidad de las nuevas coelenterazinas se examinó en células HEK293. Se cultivaron las células HEK293 durante la noche a 15.000/pocillo en DMEM + FBS al 10 % + piruvato. Se retiró el medio y se sustituyó con los nuevos compuestos de coelenterazina (o control de DMSO) diluidos en medio independiente del CO₂ más FBS al 10 %. La viabilidad celular se midió 24 horas después de la adición de los compuestos usando reactivo de ensayo CELLTITER-GLO® (Promega Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la luminiscencia se midió en el luminómetro GLOMAX® (1 s/pocillo). La Tabla 2 muestra la toxicidad de la coelenterazina natural, y la coelenterazina-h y la coelenterazina-hh conocidas, y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3889, PBI-3841, PBI-3897, PBI-3945, PBI-4002 y PBI-3840 en células HEK293. A excepción de PBI-3840, las nuevas coelenterazinas resultaron tener al menos la misma toxicidad que la coelenterazina-hh. Algunas de las nuevas coelenterazinas resultaron tener la misma toxicidad que la coelenterazina natural y la coelenterazina-h.

Tabla 2: Toxicidad de diversas coelenterazinas en células HEK293 basada en CELLTITER-GLO®

Sustrato	Viabilidad (normalizada con respecto al control de vehículo (DMSO)) (%)
Coelenterazina natural	100
Coelenterazina h	100
Coelenterazina hh	87
PBI-3939	89
PBI-3889	90
PBI-3841	100
PBI-3897	100
PBI-3945	100
PBI-4002	100
PBI-3840	60

Ejemplo 19 - Km de PBI-3939

Para determinar la Km de PBI-3939, se purificó la variante de OgLuc L27V (descrita en el Ejemplo 26) a través de la

fusión HALOTAG® usando el Sistema de Purificación de Proteínas HALOTAG® de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se diluyeron en DMEM sin rojo de fenol y PRIONEX® al 0,1 %. Se añadieron 50 µl de tampón de ensayo (MES 100 mM, pH 6, tiourea 35 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v), CDTA 1 mM, DTT 2 mM y KCl 150 mM) con cantidades variables de PBI-3939-50 a 50 µl de enzima diluida (concentración final de enzima de aproximadamente 20 pM), y se midió la luminiscencia a los 3 minutos a 22 °C. Como los datos de la FIG. 3 demuestran, la Km de PBI-3939 es de aproximadamente 10 µM.

Ejemplo 20 - Caracterización de los compuestos PBI-4525, PBI-4540 y PBI-4541

Se seleccionaron los compuestos PBI-4525, PBI-4540 y PBI-4541 por su capacidad para detectar la luminiscencia. Para el análisis, se añadieron 20 µM de cada compuesto a tampón de ensayo (MES 100 mM pH 6, tiourea 35 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v), CDTA 1 mM, DTT 2 mM y KCl 150 mM), que se ajustó a pH 7 con HEPES 100 mM pH 7 para crear un reactivo de ensayo. A continuación, se mezcló el reactivo de ensayo con la enzima L27V02 purificada 36 pM (descrita en el Ejemplo 25B), en DMEM sin rojo de fenol y PRIONEX® al 0,1 %. Como control, se usó tampón de ensayo con PBI-3939 o PBI-4528 20 µM. La luminiscencia se midió como se ha descrito previamente 3 min después de la adición del reactivo de ensayo a la mezcla de enzima. La Tabla 3 demuestra que los compuestos PBI-4525, PBI-4540 y PBI-4541 se pueden usar para detectar la luminiscencia de una luciferasa que utiliza coelenterazina.

Tabla 3

Comp.	URL	+/-
4525	20.655	1.006
4528	202.080	5.688
3939	9.808.880	307.565
4540	909	7
4541	5.676	80

Ejemplo 21 - Secuencia de patrones de OgLuc

Se pueden reconocer familias de enzimas, incluyendo las diferentes clases de luciferasas, por tener estructuras tridimensionales comunes y actividad catalítica definida. Dado que las familias de enzimas comparten antecedentes evolutivos con otras familias de enzimas, también presentarán similitudes en sus estructuras tridimensionales. A través de diversos medios de análisis estructural y funcional, los inventores han determinado que OgLuc, como representante de las luciferasas de decápodos, tiene una estructura tridimensional sorprendentemente similar a las proteínas de unión a los ácidos grasos (FABP), lo que indica antecedentes evolutivos comunes. Por lo tanto, la luciferasa de decápodo puede definirse como aquella que tiene una estructura tridimensional característica similar a las FABP y la utilización de coelenterazina como sustrato para catalizar la emisión de la luminiscencia. Otras luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga, luciferasa de *Renilla*, luciferasa bacteriana, etc., tienen estructuras tridimensionales claramente distintas, lo que indica que pertenecen a diferentes familias de enzimas y no comparten antecedentes evolutivos. La luciferasa de dinoflagelado tiene una estructura tridimensional que presenta algunas similitudes con las FABP, lo que sugiere antecedentes evolutivos compartidos, pero no utiliza la coelenterazina como sustrato y, por tanto, no pertenecen a la misma familia de enzimas luciferasas de decápodo.

Dado que las secuencias de aminoácidos no están tan bien conservadas como las estructuras tridimensionales, la definición de familias de enzimas basadas únicamente en las comparaciones de las secuencias puede ser difícil. Por ejemplo, a pesar de que todas las FABP tienen una forma tridimensional característica de barril, la comparación de sus secuencias de aminoácidos a menudo revela niveles muy bajos de identidad de secuencia. Sin embargo, la identidad de secuencia se puede usar para demostrar que las estructuras tridimensionales son comunes. Dos proteínas tendrán estructuras tridimensionales análogas si sus secuencias de aminoácidos se pueden alinear para revelar > 30 % de identidad de secuencia, preferentemente > 40 % de identidad de secuencia y lo más preferentemente > 50 % de identidad de secuencia (Chothia y Lesk, *EMBO J.* 5(4):823-826 (1986); Tramontano, *Genomics*, 4:402-405 (2003)). Por lo tanto, una proteína es una luciferasa de decápodo si, tras la alineación de su secuencia de aminoácidos con la secuencia de OgLuc, la identidad de secuencia es > 30 %, preferentemente > 40 % y lo más preferentemente > 50 %, y la proteína puede utilizar coelenterazina como sustrato para catalizar la emisión de luminiscencia.

Debido a las limitaciones estructurales necesarias para mantener la estructura tridimensional característica de una familia de enzimas, algunas partes de las secuencias de aminoácidos de una familia de enzimas presentan mayores cantidades de conservación (es decir, un mayor nivel de identidad de secuencia). Por lo tanto, estas regiones conservadas pueden servir como una prueba más de una estructura tridimensional común compartida entre dos proteínas. Un patrón de secuencia conservada, también denominado distintivo, motivo o identificación genética, se puede generar mediante métodos manuales o de cálculo que son conocidos en la técnica. Los patrones se pueden encontrar en bases de datos públicas tales como PROSITE (<http://expasy.org/prosite>; Sigrist *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 38(supl 1):D161-D166 (2010)).

Por ejemplo, se puede encontrar un patrón de aminoácidos conservados examinando un gran número de FABP conocidas. PROSITE (versión 20.67, de 05 de octubre de 2010) contiene un patrón de FABP (número de acceso PS00214, creado en abril de 1990, datos actualizados en abril de 2006). Este patrón de FABP abarca 18 posiciones de aminoácidos y se define como:

[GSAIVK]-{FE}-[FYW]-x-[LIVMF]-x-x-{K}-x-[NHG]-[FY]-[DE]-x-[LIVMFY]-
 [LIVM]-{N}-{G}-[LIVMAKR] (SEQ ID NO: 329) (VI),

5 donde:

- se usan los códigos de una letra IUPAC convencionales para los aminoácidos.
- Se usa el símbolo "x" para una posición en la que se acepta cualquier aminoácido.
- 10 • Los aminoácidos alternativos de un sitio se indican enumerando los aminoácidos entre corchetes "[]" (por ejemplo: [ALT] representa la posibilidad de una Ala, Leu o Thr en la posición).
- La ausencia de determinados aminoácidos de un sitio se indica mediante corchetes redondos "{ }" (por ejemplo: {AM} representa cualquier aminoácido de una posición excepto Ala y Met).
- 15 • Cada posición de la secuencia (o elemento del patrón) se separa de su vecino por "-". Cada posición de la secuencia se conoce como una "posición del patrón", por ejemplo [GSAIVK] se consideraría la posición 1 del patrón de Fórmula (VI), {FE} se considera la posición 2 del patrón de Fórmula (VI), etc.

20 Aunque un patrón de secuencia conservado procede de una estructura tridimensional subyacente común, se pueden permitir algunos cambios en el patrón de secuencia sin interrupción en la estructura tridimensional. Por ejemplo, para algunos miembros de la familia de FABP, se encuentran diferencias en cuatro sitios del patrón PROSITE. Estos miembros adicionales de la familia de FABP incluyen cinco proteínas enumeradas en PROSITE como falsos negativos, es decir, los miembros de la familia de proteínas FABP que no han sido recogidos por el patrón FABP (números de acceso de la base de datos UniProt FBP12_HUMAN, FABP1_FASGI, FABP2_FASHE, FABPL_SCHBI, RET5_BOVIN) y una proteína conocida por tener un pliegue de FABP (número de acceso del Protein Data Bank 2A02).

25 Aunque Ogluc comparte una estructura tridimensional muy similar con las FABP, los patrones de secuencia de las secuencias de aminoácidos naturales y variantes también difieren ligeramente, con diferencias en 5 posiciones del patrón PROSITE. El patrón de Ogluc puede comenzar en una posición correspondiente a la posición 8 de la SEC ID NO: 1. Una sustitución, eliminación o inserción de aminoácidos del patrón de secuencia se cuenta como una diferencia.

30 Con la combinación de la información de la secuencia de estas FABP adicionales y las variantes de Ogluc, se puede obtener un patrón de secuencia mejorado:

[GSAIVK]-{FE}-[FYW]-x-[LIVMFSYQ]-x-x-{K}-x-[NHGK]-x-
 [DE]-x-[LIVMFY]-[LIVMWF]-x-{G}-[LIVMAKRG] (SEQ ID NO: 330)
 (VII).

35 La información de la secuencia usada para obtener este patrón se muestra en la Tabla 4. La columna 1 identifica la posición del patrón (enumeradas desde el extremo N-terminal al C-terminal; siendo la longitud del patrón de 18 aminoácidos) y la columna 6 identifica la posición de la secuencia correspondiente de Ogluc (numeración de acuerdo con SEQ ID NO: 1). La columna 2 muestra el elemento del patrón de FABP PROSITE (Fórmula (VI)) para cada posición del patrón. La columna 3 enumera los aminoácidos presentes en seis miembros de la familia FABP que no están representadas por el patrón de FABP PROSITE. La columna 4 enumera los aminoácidos presentes en Ogluc (SEQ ID NO: 1) o las variantes de Ogluc que no están representadas por el patrón de PROSITE. La columna 5 enumera el patrón mejorado ("patrón de Ogluc") (fórmula (VII)) creado combinando la información del patrón de las columnas 2, 3 y 4. La columna 7 enumera los aminoácidos de Ogluc (SEQ ID NO: 1) correspondientes a las posiciones del patrón de FABP PROSITE. La columna 8 enumera los aminoácidos encontrados en las secuencias de luciferasa de dinoflagelado (8 especies diferentes) en las posiciones correspondientes al patrón mejorado

40 (números de acceso del GenBank 2021262A, AAA68491, AAC36472, AAV35379, AAV35380, AAL40676, AAL40677, AAV35378, AAV35377, AAV35381 y número de acceso del Protein Data Bank 1VPR).

50 El patrón mejorado (Fórmula (VII)) sirve como indicativo (es decir, una identificación genética) de la estructura tridimensional de las proteínas compartida entre las FABP y Ogluc. Sin embargo, no es necesario coincidir estrictamente con este patrón para indicar concordancia de la estructura tridimensional. A partir de los ejemplos dados en el presente documento, una estructura tridimensional común puede existir incluso con hasta 5 cambios en el patrón. También, por ejemplo, si bien la luciferasa de dinoflagelado tiene una estructura tridimensional similar a las FABP y Ogluc, tiene 4 diferencias con el patrón mejorado.

55 Por lo tanto, aunque es posible reconocer una proteína como una luciferasa de decápodo basándose en la similitud

de secuencia y en la utilización de la coelenterazina para la luminiscencia, se puede reconocer además por tener también el patrón de secuencia mejorado. En concreto, una proteína es una luciferasa de decápodo si, al alinear su secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma, la identidad de secuencia es > 30 %, preferentemente > 40 % y lo más preferentemente > 50 %, y la proteína puede utilizar coelenterazina como sustrato para catalizar la emisión de luminiscencia, y la secuencia de aminoácidos que comienza en la posición correspondiente a la posición 8 de la SEC ID NO: 1 es:



con no más de 5 diferencias, o más preferentemente no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia, o lo más preferentemente sin diferencias, estando las diferencias en las posiciones correspondientes a la posición del patrón 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 15, 17 o 18 de Fórmula (VII) de acuerdo con la Tabla 4. Las diferencias también pueden incluir huecos o inserciones entre las posiciones del patrón de la Tabla 4.

Tabla 4: Patrones de secuencias de proteínas

Posición del patrón	Patrón de FABP PROSITE PS00214	Otras FABP	OgLuc wt y variantes	Patrón e OgLuc	Posición de OgLuc	Secuencia wt de OgLuc	Luc de Dinofl.
1	[GSAIVK] (SEQ ID NO: 427)			[GSAIVK] (SEQ ID NO: 579)	8	G	G
2	{FE}			{FE}	9	D	R
3	[FYW]			[FYW]	10	W	W
4	x			x	11	Q	I
5	[LIVMF] (SEQ ID NO: 590)	SY	Q	[LIVMFSYQ] (SEQ ID NO: 591)	12	Q	T
6	x			x	13	T	[VI]
7	x			x	14	A	S
8	{K}			{K}	15	G	G
9	x			x	16	Y	G
10	[NHG]	K		[NHGK] (SEQ ID NO: 580)	17	N	Q
11	[FY]	SILM (SEQ ID NO: 581)	{FY}	x	18	Q	[AVTK] (SEQ ID NO: 582)
12	[DE]			[DE]	19	D	[AE]
13	X			x	20	Q	F
14	[LIVMFY] (SEQ ID NO: 583)			[LIVMFY] (SEQ ID NO: 584)	21	V	I
15	[LIVM] (SEQ ID NO: 585)	W	F	[LIVMWF] (SEQ ID NO: 586)	22	L	K
16	{K}		K	x	23	E	[EKTQ] (SEQ ID NO: 587)
17	{G}			{G}	24	Q	[AV]
18	[LIVMAKR] (SEQ ID NO: 588)		G	[LIVMAKRG] (SEQ ID NO: 589)	25	G	[VI]

Ejemplo 22 - Generación de variantes de OgLuc

Datos experimentales

A menos que se indique lo contrario, se generaron variantes adicionales de una secuencia de variante de OgLuc de partida con sustituciones aleatorias usando el sistema basado en la PCR mutagénica, propensa a errores GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Stratagene; Daughtery, *PNAS EE.UU.*, 97(5):2029 (2000)), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la saturación del sitio de NNK (Zheng *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 32:e115 (2004)).

Se generaron otras variantes adicionales de una variante de OgLuc de partida que tenía mutaciones específicas

usando el kit de mutagénesis dirigida basada en oligo QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene; Kunkel, *PNAS EE.UU.*, 82 (2): 488 (1985)), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las variantes resultantes se construyeron en el contexto del pF1K FLEXI® para la expresión basada en el promotor de T7 (Promega Corp.). Como alternativa, las variantes resultantes se construyeron en el contexto del vector pF4Ag (una versión del PF4A disponible en el mercado (Promega Corp.), que contenía los promotores de T7 y CMV modificados para contener un sitio de unión a ribosomas de *E. coli* con o sin un HALOTAG® C-terminal (Promega Corp.; denominado en el presente documento "HT7") (Ohana *et al.*, "Protein Expression and Purification", 68: 110-120 (2009)) para generar una proteína de fusión. Por ejemplo, para obtener variantes C1+A4E, se realizaron experimentos de mutagénesis de saturación de NNK en un fondo de vector pF1K. La biblioteca de C1+A4E se generó en un fondo de vector pF4Ag sin HT7 C-terminal. Las bibliotecas de QC27, QC27-9a e IVY se generaron en un fondo de vector pF4Ag con HT7 C-terminal. Las variantes basadas en IV se generaron en un fondo de vector pF4Ag sin HT7. Los vectores resultantes se usaron para transformar KRX de *E. coli* usando técnicas conocidas en la materia.

Las variantes de OgLuc generadas se nombran por las sustituciones de aminoácidos identificadas en la variante y/o para el clon de *E. coli* que contenía la variante, por ejemplo, la FIG. 6A muestra, entre otros resultados, que el clon de *E. coli* 16C5 tiene la sustitución Q20R.

Datos de la exploración

Las bibliotecas resultantes se expresaron en *E. coli* y se realizó una exploración primaria con un sistema robótico de variantes de OgLuc que tenían una mayor producción de luz (es decir, mayor luminiscencia, mayor brillo o mayor emisión de luz) o un cambio en la especificidad relativa en comparación con la correspondiente variante de OgLuc de partida. La exploración robótica primaria se llevó a cabo de la siguiente manera: se usaron colonias individuales de la biblioteca generada para inocular medio mínimo en placas de 96 pocillos y se cultivaron a 37 °C durante 17 a 20 horas ("cultivo M1"). Se diluyó el cultivo M1 1:20 con medio mínimo recién preparado y se cultivó a 37 °C durante 17-20 horas ("cultivo M2"). Se diluyó el cultivo M2 1:20 en medios de inducción y se cultivó durante 17-20 horas a 25 °C con la inducción guiada, es decir, autoinducción (Stratagene; Daughtery, *PNAS EE.UU.*, 97(5):2029 (2000)), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y saturación del sitio de NNK (Schagat *et al.*, "KRX Autoinduction Protocol: A Convenient Method for Protein Expression". Promega Notes, 98:16-18 (2008)). Los medios de inducción contenían ramnosa y glucosa cuando se usaron las nuevas coelenterazinas PBI-3841, PBI-3842, PBI-3857, PBI-3880, PBI-3881, PBI-3886, PBI-3887, PBI-3897, PBI-3896 o PBI-3894 como sustratos en la exploración primaria. Los medios de inducción no contenían ramnosa ni glucosa cuando se usaron coelenterazina natural, coelenterazina-h conocida o las nuevas coelenterazinas PBI-3840, PBI-3889, PBI-3899 o PBI-3900 como sustratos en la exploración primaria. El uso de los diferentes medios de inducción se determinó basándose en la luminiscencia generada entre C1+A4E y las nuevas coelenterazinas, es decir, se usaron los medios de inducción que contenían ramnosa y glucosa con nuevas coelenterazinas que generaron menos luminiscencia con C1+A4E en comparación con las otras nuevas coelenterazinas con C1+A4E.

Se lisaron diez µl de células inducidas usando 60 µl de tampón de lisis que contenía HEPES 300 mM, pH 8,0, tiourea 300 mM, 0,3 x tampón de lisis pasivo ("PLB"; Promega Corp. N.º de catálogo E194A), 0,3 mg/ml de lisozima y 0,003 U/µl de RQI Onasa, y se midió la luminiscencia con 50 µl de tampón de ensayo que contenía KCl 150 mM, COTA 1 mM, OTT 10 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v) y 20 µM de una coelenterazina natural, conocida o nueva como sustrato. Se tomaron mediciones de luminiscencia para cada variante 3 min después de la adición de reactivo, y los valores las unidades relativas de luminiscencia (URL) se normalizaron con respecto a una media de 8 pocillos de control de la variante de OgLuc de partida correspondiente para cada placa. El ensayo se completó en un sistema robótico TECAN®.

Se secuenciaron las variantes de OgLuc de interés usando técnicas de secuenciación convencionales conocidas en la técnica para identificar cualquier sustitución de aminoácido adicional de cada variante. Se realizó una exploración secundaria usando un sistema no robótico (manual) en los clones de variantes de interés. La exploración manual se realizó de la siguiente manera: se cultivaron clones de variantes, por triplicado, en placas de 96 pocillos, y se expresaron y se ensayaron como se describe para el ensayo automatizado, a excepción de la adición de tampón de ensayo de forma manual con una pipeta multicanal. Para cada variante, se midió la luminiscencia, se calculó la media y se normalizó con respecto a la variante de OgLuc de partida correspondiente. Se realizaron mediciones de luminiscencia usando un luminómetro TECAN® INFINITE® F500.

Determinación del cambio en la especificidad relativa

Se determinó la especificidad relativa de sustrato dividiendo la luminiscencia de una luciferasa en presencia de un sustrato de coelenterazina de ensayo entre la luminiscencia de la luciferasa en presencia de un sustrato de coelenterazina de referencia. Por ejemplo, la especificidad relativa se determinó dividiendo la luminiscencia de la luciferasa con una nueva coelenterazina desvelada en el presente documento entre la luminiscencia de la luciferasa con una coelenterazina diferente (por ejemplo, coelenterazina natural o conocida, o una nueva coelenterazina diferente de la presente divulgación). El sustrato de coelenterazina de ensayo y el sustrato de coelenterazina de

referencia que se compararon se consideraron un par de sustratos de comparación para determinar la especificidad de sustrato relativa.

Se determinó un cambio en la especificidad de sustrato relativa dividiendo la especificidad de sustrato relativa de una luciferasa de ensayo usando un par de sustratos de comparación entre la especificidad de sustrato relativa de una luciferasa de referencia usando el mismo par de sustratos de comparación. Por ejemplo, un cambio en la especificidad relativa se determinó dividiendo la especificidad de sustrato relativa de una luciferasa de ensayo con una nueva coelenterazina descrita en el presente documento en comparación con una coelenterazina diferente (por ejemplo, coelenterazina natural o conocida, o una nueva coelenterazina diferente de la presente divulgación), entre la especificidad de sustrato relativa de una luciferasa de referencia con la misma nueva coelenterazina de la presente divulgación en comparación con la misma coelenterazina diferente usada para la luciferasa de ensayo.

Se comparó la luminiscencia con una nueva coelenterazina con la luminiscencia con una nueva coelenterazina diferente. La luminiscencia con una coelenterazina natural o conocida se comparó con la luminiscencia con otra coelenterazina natural o conocida. La luminiscencia con una coelenterazina natural o conocida se comparó con la luminiscencia con una nueva coelenterazina.

Un aumento de la luminiscencia (URL) para la variante de OgLuc en comparación con el molde de OgLuc de partida correspondiente para la nueva coelenterazina, y una disminución o ningún cambio en la luminiscencia de una coelenterazina de referencia eran indicativos de un cambio en la especificidad relativa. Una disminución de la luminiscencia de una variante de OgLuc tanto para la coelenterazina nueva como para la de referencia en comparación con la correspondiente OgLuc de partida, pero la mayor reducción de la luminiscencia de la variante de OgLuc con la coelenterazina nueva, también fueron indicativas de un cambio en la especificidad relativa. Un aumento de la luminiscencia de la variante de OgLuc en comparación con la OgLuc de partida correspondiente para la coelenterazina nueva y de referencia indicó una mejora de la actividad/estabilidad/expresión. Si la luminiscencia de la variante de OgLuc tanto con la coelenterazina nueva como la de referencia aumentó, pero el aumento de la luminiscencia con la coelenterazina nueva fue superior, ello indicó un aumento en la especificidad relativa y una mejora en la actividad/estabilidad/expresión de la variante de OgLuc.

A. Variantes C1+A4E

Se usó C1+A4E (SEQ ID NO: 2 y 3), anteriormente descrita en la solicitud de EE.UU. con nº de serie 12/773.002 (solicitud publicada de EE.UU. n.º 2010/0281552) como una secuencia de partida principal (es decir, la secuencia parental) para la generación de variantes de OgLuc adicionales, sintéticas. C1+A4E tiene las siguientes sustituciones de aminoácidos: A4E, Q11R, A33K, V44I, A54F, P115E, Q124K y 138I y N166R, con respecto a SEQ ID NO: 1. La luminiscencia de C1+A4E que contiene lisados bacterianos, usando las nuevas coelenterazinas descritas en los Ejemplos 1-14 (véase la FIG. 4 para consultar ejemplos) como sustratos, se midió como se ha descrito anteriormente y en comparación con la luminiscencia usando coelenterazinas naturales y conocidas como sustratos (FIG. 5A-G). La FIG. 5A muestra la luminiscencia de C1+A4E usando coelenterazina natural ("coelenterazina"), PBI-3880 conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3842, PBI-3857, PBI-3881, PBI-3882, PBI-3886 y PBI-3887 como sustratos. Las mediciones de luminiscencia usando coelenterazinas conocidas y nuevas se normalizaron con respecto a la luminiscencia de C1+A4E usando coelenterazina natural y las veces de reducción en comparación con la coelenterazina natural (FIG. 5B). Las Fig. 5C-E muestran la luminiscencia de C1+A4E usando coelenterazina natural y nuevas coelenterazinas PBI-3945, PBI-3894 y PBI-4002, respectivamente. La FIG. 5F muestra la luminiscencia de C1+A4E usando coelenterazina natural y las nuevas coelenterazinas PBI-3840, PBI-3897, PBI-3889, PBI-3899 y PBI-3900. La FIG. 5G muestra la luminiscencia de C1+A4E usando coelenterazina natural, coelenterazina conocida PBI-3912 y las nuevas coelenterazinas PBI-3913, PBI-3925, PBI-3939, PBI-3933, PBI-3932, PBI-3946, PBI-3841 y PBI-3896. Los datos indican que la variante C1+A4E puede usar cada una de las nuevas coelenterazinas como sustratos.

Se generaron variantes C1+A4E que tenían al menos las sustituciones de aminoácidos identificadas en C1+A4E, a menos que se indique lo contrario. Se generó una biblioteca (Biblioteca 1) de 400 clones de variantes C1+A4E por mutagénesis aleatoria como se ha descrito anteriormente y se exploró como se ha descrito previamente para determinar la mejora del cambio de especificidad relativa y/o el cambio de actividad, por ejemplo, el brillo. Las variantes se realizó una exploración primaria con coelenterazina natural, coelenterazina-h conocida, PBI-3880 conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3840, PBI-3841, PBI-3842, PBI-3857, PBI-3881, PBI-3886, PBI-3887, PBI-3889, PBI-3897 y PBI-3900 como sustratos. Además, la mitad de las variantes se exploró con las nuevas coelenterazinas PBI-3896 y PBI-3894 como sustratos. Se exploraron las placas que contenían variantes que tenían mutaciones conocidas de interés identificadas a partir de la exploración de los nuevos compuestos anteriores. Las variantes que mostraron una mejora (ya sea en el cambio especificidad relativa o en el cambio de actividad) para una o más de las nuevas coelenterazinas ensayadas en la exploración primaria se aislaron, se secuenciaron y se exploraron en una exploración secundaria.

En la exploración manual secundaria, las variantes se ensayaron con las coelenterazinas conocidas PBI-3912, coelenterazina-h, coelenterazina-hh, 2-metil-coelenterazina y coelenterazina v; y las nuevas coelenterazinas PBI-3840, PBI-3897, PBI-3889, PBI-3899, PBI-3900, PBI-3925, PBI-3944, PBI-3932, PBI-3945, PBI-3913 y PBI-3896

como sustratos. Las FIG. 6A-D resumen la luminiscencia media normalizada con respecto a C1+A4E para las variantes ("clon"). Las FIG. 6A-D resumen las sustituciones en estas variantes ("secuencia de aa"), que tenían por lo menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos adicionales: A14V, G15R, Q18L, Q20R, L22I, E23K, L27V, L27M, K33N, T39I, E49K, F54S, F54I, D55G, I56V, V58I, V58L, I59T, S66T, G67S, F68S, L72Q, M75K, I76N, F77T, F77C, K89E, I90V, I90T, L92H, H93R, M106K, Y109F, P113T, 30 I117F, T126R, V127A, L136M, D139G, P145L, S148T, C164S o A169V.

Las sustituciones de aminoácidos de la posición 54, 92 y 109 fueron de interés, pues las sustituciones en estas posiciones proporcionaron una mayor producción de luz o mejor especificidad relativa, es decir, la especificidad alejada de la coelenterazina natural y hacia al menos una nueva coelenterazina, como se muestra en las FIG. 6A-C. La sustitución de aminoácido F54I en el clon 29H7 proporcionó una mayor producción de luz con la coelenterazina natural y varios de las nuevas coelenterazinas. La sustitución de aminoácido Q18L en el clon 40H11, la sustitución de aminoácido L92H en el clon 04A12 y la sustitución de aminoácido Y109F en el clon 43F9 proporcionó mejor especificidad relativa.

La Tabla 5 enumera las variantes C1+A4E con una sustitución de aminoácido adicional en la posición 77, 92 o 109 ("cambio de aa"), generada como se ha descrito anteriormente. Estas variantes se analizaron para determinar la mayor producción de luz como se ha descrito anteriormente, es decir, se exploraron las variantes que eran al menos 1,3 veces más brillantes que C1+A4E, usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3894, PBI-3896, PBI-3897, PBI-3932 o PBI-3925 como sustrato. Los siguientes sustituciones adicionales produjeron una variante que era al menos 1,3 veces más brillante que C1+A4E: L92G, L92Q, L92S, L92A, L92M, L92H, L92Y, F77W, F77Y, F77S, F77T, F77V, F77A, F77G, F77C, F77D, F77M y Y109F. Como se muestra en la Tabla 5, las sustituciones L92H, F77W y F77A tuvieron las mejoras más espectaculares con PBI-3897, PBI-3896 y PBI-3932.

Tabla 5: Saturación del sitio de las posiciones 77, 92 y 109

Cambio de aa	natural	hh	PBI-3939	PBI-3894	PBI-3896	PBI-3897	PBI-3932	PBI-3925
L92G	2,2							
L92Q	2	1,8	1,6	1,3	1,4	2,8	1,4	3,4
L92S	2,9				1,5	2,9	2,7	6
L92A	2,5	1,3						
L92M		1,3						
L92H				2,2	21	9,1	3,4	5,9
L92Y								2,5
F77W	1,4		1,4	1,4	8,3	3,2	1,7	2,3
F77Y					1,6	1,3	4,9	6,5
F77S							2,6	
F77T							2,3	
F77V							2,3	
F77A							7,9	2,5
F77G							3,1	
F77C							2,3	
F77D							1,5	
F77M							1,5	1,6
Y109F					1,34	14		

Se generaron variantes C1+A4E adicionales (Grupo A) por mutagénesis dirigida como se ha descrito anteriormente para tener una sustitución adicional en al menos una de las siguientes posiciones de aminoácidos con relación a SEQ ID NO: 1: 18, 20, 54, 59, 72, 77, 89, 92, 109, 113, 127, 136 o 164. Se seleccionaron estas posiciones de aminoácidos porque, basándose en la exploración primaria y secundaria de la biblioteca 1, las sustituciones en estas posiciones habían aumentado la producción total de luz en comparación con C1+A4E usando al menos una de las siguientes como sustrato: las nuevas coelenterazinas PBI-3841, PBI-3896, PBI-3897, PBI-3894, PBI-3925 o PBI-3932, o las coelenterazinas conocidas 2-metil-coelenterazina o PBI-3912. La FIG. 7 enumera las variantes ("Clon") y las sustituciones de aminoácidos adicionales contenidas en cada variante. Los clones de las variantes se ensayaron por triplicado como se describe para la exploración manual secundaria como se ha descrito anteriormente y normalizado con respecto a C1+A4E. Las FIG. 8A-B y 9 muestran la luminiscencia media normalizada de las variantes enumeradas en la FIG. 7 con varias coelenterazinas como sustratos. Las FIG. 8A-B y 9 muestran variantes ya sea con un gran aumento de la luminiscencia para los nuevos compuestos enumerados en comparación con C1+A4E, o ningún cambio o una disminución de la luminiscencia para la coelenterazina conocida en comparación con C1+A4E. El clon QC27, que tiene sustituciones de aminoácidos adicionales Q18L, F54I, L92H y Y109F, resultó tener un aumento de 561,32 veces de luminiscencia con PBI-3896, un aumento de 392,98 veces con PBI-3894 y un aumento de 283,85 veces con PBI-3896 en comparación con C1+A4E. Estos datos muestran que Q18L, L92H y Y109F se pueden combinar entre sí y con sustituciones adicionales, dando lugar a variantes con una mejor

especificidad relativa.

Se combinaron otras sustituciones de interés identificadas a partir de la biblioteca 1 para generar variantes adicionales (Grupo B) (FIG. 10). Se crearon sustituciones de aminoácidos adicionales en al menos una de las siguientes posiciones de aminoácidos con relación a SEQ ID NO: 1: 18, 20, 54, 71, 77, 90, 92, 109 o 127. Estas sustituciones mostraron una mejoría con al menos una de las siguientes nuevas coelenterazinas como sustrato: PBI-3841, PBI-3896, PBI-3897, PBI-3894, PBI-3925 o PBI-3932. Estas variantes se analizaron como se ha descrito para el grupo A de variantes usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3840, PBI-3932, PBI-3925, PBI-3894 y PBI-3896. Los clones de las variantes se ensayaron por triplicado como se ha descrito para la exploración manual secundaria como se ha descrito anteriormente y normalizado con respecto a C1+A4E. La FIG. 11 muestra la luminiscencia media normalizada de las variantes enumeradas en la FIG. 10 con las diversas coelenterazinas como sustratos. La FIG. 11 muestra variantes bien con grandes aumentos de la luminiscencia para las nuevas coelenterazinas enumeradas en comparación con C1+A4E, o sin cambio o una disminución de la luminiscencia para la coelenterazina natural y conocida en comparación con C1+A4E.

Se generaron variantes adicionales con la sustitución de aminoácido adicional I90V y/o Y109F (Grupo C) y se compararon con las variantes generadas del Grupo A o B (véase la FIG. 12). Se compararon los clones que contenían las variantes con una sustitución I90V ("I90V"), una sustitución Y109F ("Y109F") o ambas sustituciones ("LE2") con los clones QC #27, QC#2 E7, QC#2 F4 y QC#1 A11 usando ensayos como se ha descrito para los recombinantes del Grupo A con coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889, PBI-3840, PBI-3925, PBI-3932, PBI-3894, PBI-3896 y PBI-3897 como sustratos (FIG. 12). Los clones de las variantes se ensayaron por triplicado como se ha descrito para la exploración manual secundaria como se ha descrito anteriormente y normalizado con respecto a C1+A4E (FIG. 12). La FIG. 12 muestra variantes ya sea con grandes aumentos de la luminiscencia para las nuevas coelenterazinas enumeradas en comparación con C1+A4E, y ningún cambio o una reducción de la luminiscencia para la coelenterazina natural o conocida en comparación con C1+A4E. La FIG. 12 muestra que I90V proporcionó una mayor producción de luz para la coelenterazina natural y varios de los nuevos sustratos.

30 B. Variantes QC27

La variante QC27 (SEQ ID NO: 4 y 5) de A, que tiene las sustituciones de aminoácidos adicionales Q18L, F54I, L92H y Y109F, se clonó en un vector PF4A modificado como se ha descrito anteriormente para crear una proteína de fusión de HT7 C-terminal (Promega Corp.) ("QC27-HT7") (SEQ ID NO: 44 y 45). Se generaron 4.400 variantes de QC27-HT7 (Biblioteca 2) por mutagénesis aleatoria como se ha descrito anteriormente, y se realizó una exploración primaria para determinar el aumento en el cambio de especificidad relativa como se ha descrito anteriormente usando coelenterazina natural y las nuevas coelenterazinas PBI-3896 y PBI-3897 como sustratos. Se seleccionaron los clones de las variantes, se secuenciaron y se analizaron en una exploración manual secundaria como se ha descrito anteriormente usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3897, PBI-3896 y PBI-3894 como sustratos.

La FIG. 13 enumera las sustituciones de aminoácidos adicionales ("Secuencia") identificadas en estas variantes ("Muestra") y la luminiscencia de las variantes usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3897, PBI-3896 y PBI-3894 como sustratos en la exploración secundaria normalizada con respecto a la QC27-HT7 de partida correspondiente. Las variantes de la FIG. 14 tenían al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos adicionales: F1I, R11Q, L18I, L18Q, V21L, V21M, L22F, F31I, Q32H, V45E, L46Q, S47P, G48R, E49D, G51E, D55E, G67S, F68Y, F68L, Q69H, L72Q, E74K, E74I, M75K, I76F, I76V, H86R, I90T, H92Q, H92R, T96A, V98F, I99V, I99T, V102M, M106I, F109Y, L142V, V158I, T159S, L168F o G170R (G170R está situada en la región enlazadora entre HT7 y la variante de OgLuc).

Las sustituciones de aminoácidos F68Y de la variante 24B12, L72Q de la variante 29C4 y M75K de la variante 3H11 proporcionaron una mayor producción de luz para la coelenterazina natural y varios de los nuevos sustratos. Las sustituciones de aminoácidos V21L de la variante 25A11 y H92R de la variante 1B6 proporcionaron una mejor especificidad relativa. Ambas sustituciones fueron casos en los que las señales de luminiscencia se redujeron usando las nuevas coelenterazinas como sustratos, pero se redujeron más usando coelenterazinas naturales y conocidas como sustratos.

Se generaron variantes QC27-HT7 adicionales que tenían sustituciones de aminoácidos específicas (FIG. 14) usando mutagénesis dirigida como se ha descrito anteriormente. Se realizaron sustituciones adicionales en al menos una de las siguientes posiciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 1: 21, 68, 72, 75, 76, 90, 92 y 158, ya que estas posiciones mostraron una mejora en el cambio de especificidad relativa, como se muestra en la FIG. 14. La FIG. 15 muestra la luminiscencia de las variantes QC27-HT7 usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3897, PBI-3841, PBI-3896 y PBI-3894 como sustratos normalizados con respecto a la QC27-HT7 de partida correspondiente. Como se observa en la FIG. 15, la combinación de las tres sustituciones de aminoácidos F68Y, L72Q y M75K con V158I, como, por ejemplo, en la variante QC27#1, proporcionaron una mayor producción de luz para cada coelenterazina ensayada.

C. Variantes QC27-9a

Se usó la variante QC27-9a (SEQ ID NO: 6 y 7) de B, una proteína de fusión QC27-HT7 con las sustituciones de aminoácidos adicionales V21L, H29R, F68Y, L72Q, M75K y V158I, como secuencia de partida para generar una biblioteca. Se generaron 4.400 variantes de QC27-9a (Biblioteca 3) por mutagénesis aleatoria como se ha descrito anteriormente y se exploraron para determinar el aumento del cambio en la especificidad relativa mediante coelenterazina natural y las nuevas coelenterazinas PBI-3841 y PBI-3897. Se seleccionaron clones de las variantes, se secuenciaron y se analizaron en una exploración manual secundaria como se ha descrito anteriormente usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida, coelenterazina-h conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3841 y PBI-3897 como sustratos. La FIG. 16 enumera las sustituciones adicionales ("cambio de aa") identificadas en las variantes ("Muestra") y la luminiscencia media de las variantes que usan coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida, coelenterazina-h conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3841 y PBI-3897 como sustratos en la exploración secundaria normalizada con respecto a la correspondiente QC27-9a de partida. El aumento de la especificidad relativa representa casos en los que había una reducción de la luminiscencia para la variante con las coelenterazinas nuevas, naturales y conocidas en comparación con el molde de partida, pero la luminiscencia con las coelenterazinas naturales y conocidas disminuyó más. Por ejemplo, la variante 30D12 con la sustitución de aminoácidos L22F tuvo una pérdida de aproximadamente tres veces de actividad con las nuevas coelenterazinas PBI-3841 y PBI-3897. Sin embargo, con coelenterazina natural, coelenterazina-h conocida y coelenterazina-hh conocida, la luminiscencia de la variante 30D12 se redujo en diez veces o más.

La FIG. 17 muestra una comparación de la luminiscencia de C1+A4E, QC27-HT7 y QC27-9a en comparación con la luciferasa de *Renilla* humanizada (denominada en el presente documento "hRL") (SEQ ID NO: 30 y 31) usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3841 y PBI-3897 como sustratos. Aunque la reacción de QC27-9a con PBI-3897 fue más brillante que QC27-9a con PBI-3841 (véase la FIG. 17), la tendencia de la evolución, es decir, la magnitud de mejora de la luminiscencia, fue mayor para PBI-3841 (Tabla 6). La combinación de la mejora de la luminiscencia (440 veces) con la disminución de la luminiscencia para la coelenterazina natural (800 veces) indicó un cambio en la especificidad relativa (350.000 veces) de QC27-9a usando PBI-3841 en comparación con la coelenterazina natural.

Tabla 6: Cambio en la especificidad relativa de las variantes de OgLuc para PBI-3897 y PBI-3841 en comparación con la coelenterazina natural y coelenterazina-hh

Compuesto	Tendencia evolutiva: C1A4E a QC27 #9a	Cambio en la especificidad relativa (nueva coelenterazina/coelenterazina natural)
coelenterazina	BAJADA x 800	
Coelenterazina-hh	BAJADA x 300	
PBI-3897	SUBIDA x 100	x 80.000
PBI-3841	SUBIDA x 440	x 350.000

D. Variantes IVY

IVY (SEQ ID NO: 8 y 9), una variante C1+A4E con las sustituciones de aminoácidos adicionales F54I, I90V y F77Y, se clonó en un vector pF4A modificado como se ha descrito anteriormente para crear una proteína de fusión HT7 C-terminal ("IVY-HT7"). Se generaron 4.400 variantes de IVY-HT7 (Biblioteca 4) por mutagénesis aleatoria y se seleccionaron para determinar el aumento de producción de luz (es decir, el aumento del brillo) y el aumento de la especificidad relativa usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3840, PBI-3889 PBI-3925, PBI-3932 y PBI-3945 como sustratos. Se seleccionaron clones de variantes, se secuenciaron y se ensayaron por triplicado en una exploración secundaria como se ha descrito anteriormente usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3889, PBI-3939, PBI-3945 y PBI-4002 como sustratos. Las FIG. 18 y 19 se enumeran las sustituciones adicionales ("cambio de aa") identificadas en las variantes ("Muestra") y la luminiscencia media de las variantes normalizadas con respecto a IVY-HT7 usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3889, PBI-3939, PBI-3945 y PBI-4002 como sustratos en la exploración secundaria. La FIG. 18 enumera las variantes seleccionadas basadas en el rendimiento con PBI-3945 (Grupo A), que tenía al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Q18H, D19N, Q20P, Q32P, K33N, V38I, V38F, K43N, I44F, E49G, I60V, Q69H, I76N, Y77N, Y94F, G95S, G95D, F110I, V119M, K124M, L149I o R152S. La FIG. 19 enumera las variantes seleccionadas basándose en el rendimiento con PBI-3889 (Grupo B), que tenía al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: F6Y, Q18L, L27V, S28Y, Q32L, K33N, V36E, P40T, Q42H, N50K, G51R, H86L, N135D o I155T.

Se generaron variantes de IVY-HT7 adicionales que tenían sustituciones de aminoácidos específicas adicionales usando mutagénesis dirigida tal como se ha descrito anteriormente. La FIG. 20 enumera variantes con al menos una de las siguientes posiciones de aminoácidos adicionales con respecto a la SEQ ID NO: 1: 19, 20, 27, 32, 38, 43, 49, 58, 77, 95, 110 y 149, ya que estas sustituciones se identificaron en las variantes de la FIG. 18, que mostró especificidad hacia PBI-3945 y PBI-4002. La FIG. 21 muestra la luminiscencia de las variantes enumeradas en la

FIG. 20 normalizada con respecto a IVY-HT7 usando coelenterazina natural, coelenterazina-h conocida, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3945, PBI-4002, PBI-3932 y PBI-3840 como sustratos. Ninguna de las variantes mostró una mejora con respecto IVY-HT7, pero hubo casos, tales como la variante C5.19 (SEQ ID NO: 12 y 13), en los que la luminiscencia con un coelenterazina natural o conocida se redujo

5 aproximadamente 3-4 registros, pero la luminiscencia con PBI-3945 y PBI-4002 disminuyeron solo dos veces. La variante C5.19 tiene las sustituciones de aminoácidos adicionales L27V, V38I y L149I.

La FIG. 22 enumera variantes con al menos una de las siguientes posiciones de aminoácidos adicionales con respecto a la SEQ ID NO: 1: 6, 18, 27, 28, 33, 34, 36, 40, 50, 51, 135 y 155, ya que estas sustituciones se

10 identificaron en las variantes de la FIG. 19, que mostraron especificidad hacia PBI-3889 y PBI-3939. La FIG. 23 muestra la luminiscencia de las variantes enumeradas en la FIG. 21 usando coelenterazina natural, coelenterazina-h conocida, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889, PBI-4002, PBI-3932 y PBI-3840 como sustratos normalizados con respecto a la IVY-HT7. La luminiscencia se redujo para cada una de las variantes en comparación con IVY-HT7. La variante C1.3 (SEQ ID NO: 10 y 11) resultó tener

15 aproximadamente 2.000 veces más luminiscencia con PBI-3939 que con la coelenterazina natural o conocida. La variante C1.3 tiene las sustituciones de aminoácidos adicionales F6Y, K33N, N135D e I155T.

Las mejores variantes de IVY-HT7 para el cambio de especificidad relativa en comparación con hRL e IVY HT7 fueron C5.19, que tuvo la mejor luminiscencia con PBI-3945, y C1.3, que tuvo la mejor luminiscencia con PBI-3889.

20 La FIG. 24 muestra la luminiscencia de hRL, IVY-HT7, C5.19 (una fusión de HT7 C-terminal) y C1.3 (una fusión de HT7 C-terminal) con coelenterazina natural, coelenterazina-h conocida, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3939 y PBI-3945.

E. Variantes IV

25 IV (SEQ ID NO: 14 y 15), una variante C1+A4E con las sustituciones de aminoácidos adicionales F54I e I90V, se generó como se ha descrito previamente. Para determinar la variante más brillante para su uso como un indicador de la transcripción, se midió la luminiscencia como se ha descrito previamente proporcionada para C1+A4E (SEQ ID NO: 2 y 3), IVY (SEQ ID NO: 8 y 9) e IV (SEQ ID NO: 14 y 15) usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889 y PBI-4002 como sustratos. hRL se usó como control. Como se observa en la FIG. 25, IV fue más brillante que tanto C1+A4E como IVY. La sustitución de aminoácido F54I en IV proporcionó una mayor producción de luz para la coelenterazina natural y varios de los nuevos sustratos. Las tres variantes fueron más brillantes que hRL con los coelenterazinas ensayadas.

30

35 Se revisaron los datos de la A, B y D (es decir, la exploraciones de las bibliotecas generadas a partir de C1+A4E, IVY y QC27 como secuencias de partida) para determinar aquellas sustituciones de aminoácidos adicionales con aumento de la producción de luz (es decir, el aumento del brillo) con varias coelenterazinas. Se generaron variantes de IV como se ha descrito previamente que tenían sustituciones adicionales con menor especificidad hacia la coelenterazina natural en dos a diez veces. Como se enumera en la FIG. 26, las variantes de IV ("clon") tenían una sustitución de aminoácido adicional ("Secuencia") de al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: F1I, E4K, Q18L, L27V, K33N, V38I, F68Y, M70V, L72Q, M75K o V102E.

40

45 Se realizó una exploración primaria en dieciséis placas de clones de variantes para todas las combinaciones de sustituciones de aminoácidos y se ensayaron usando el método de robótica automatizado descrito previamente con coelenterazina natural, coelenterazina-h conocida, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3889 y PBI-3945 como sustratos. Se seleccionaron variantes con una mejor luminiscencia, se secuenciaron y se ensayaron por triplicado usando la exploración manual como se ha descrito anteriormente. Se midió la luminiscencia usando coelenterazina natural, coelenterazina-h conocida, coelenterazina-hh conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3889, PBI-3939, PBI-3945 y PBI-4002 como sustratos. Se usaron las correspondientes secuencias de partida IV y hRL como controles.

50

La FIG. 26 enumera las variantes y las sustituciones de aminoácidos adicionales identificadas en las variantes. La FIG. 27 muestra la luminiscencia media de las variantes en la exploración secundaria normalizada con respecto a IV. La variante 8A3 (SEQ ID NO: 26 y 27), que tiene las sustituciones de aminoácidos adicionales F1I, L27V y V38I, resultaron tener mejor especificidad relativa con las nuevas coelenterazinas, pero no fue más brillante que IV. La variante 8F2 (SEQ ID NO: 46 y 47), que tiene la sustitución de aminoácidos adicional L27V, ofreció mejor especificidad relativa y brillo con 3 de las 4 nuevas coelenterazinas usadas. La variante 9B8 (SEQ ID NO: 18 y 19), que tiene las sustituciones de aminoácidos adicionales Q18L, F68Y, L72Q y M75K, fue más brillante para todos los sustratos y ofreció alguna ventaja de especificidad relativa frente a la coelenterazina natural también. La variante 9F6 (SEQ ID NO: 20 y 21), que tiene las sustituciones de aminoácidos adicionales Q18L, L27V, V38I, F68Y, L72Q y M75K, mostró mejoras similares como se ha visto con 8F2. La variante 15C1 (SEQ ID NO: 16 y 17), que tiene las sustituciones de aminoácidos adicionales E4K, K33N, F68Y, L72Q y M75K, fue más brillante para todas las coelenterazinas nuevas, pero no tuvo ningún beneficio de especificidad relativa potenciado. La sustitución de aminoácido Q18L en la variante 1D6 proporcionó mejor especificidad relativa, es decir, alejada de la coelenterazina natural y hacia los nuevos sustratos, en el contexto de IV. En general, la sustitución de aminoácidos L27V proporcionó especificidad relativa potenciada en el contexto de IV.

55

60

65

La FIG. 28 muestra la luminiscencia de las variantes 8A3, 9B8, 9F6 y 15C1 en la exploración secundaria usando coelenterazina natural, coelenterazina-hh conocida, coelenterazina-h conocida y las nuevas coelenterazinas PBI-3939, PBI-3945, PBI-3889 y PBI-4002 como sustratos en comparación con IV y hRL. La variante 8A3 tuvo 2 registros menos de brillo con la coelenterazina natural en comparación con IV. La variante 9F6 tuvo 1 registro menos de brillo con la coelenterazina natural en comparación con IV. La variante 15C1 con PBI-3945 fue la más brillante, pero la semivida de la señal fue corta (véase el Ejemplo 27).

F. Variantes 9B8

La variante 9B8 de E se modificó adicionalmente para generar variantes adicionales con una mayor emisión de luz y/o mejor especificidad relativa por PBI-3939. La sustitución de aminoácido L72Q pareció ser una sustitución de aminoácido beneficiosa para el aumento de la emisión de luz (es decir, el brillo), pues dicha sustitución se identificó en las variantes 9B8, 9F6 y 15C1, mostrando todas ellas una mejor emisión de luz. Para determinar si otras sustituciones de aminoácidos de la posición 72 proporcionarían aumentos similares en el brillo, se generaron variantes adicionales de 9B8 como se ha descrito anteriormente mediante la saturación de la posición 72 con restos alternativos. Se prepararon cuatro repeticiones de lisados de *E. coli* y se analizaron para determinar el brillo como se ha descrito anteriormente usando PBI-3939 como sustrato, excepto que el tampón de ensayo contenía CDTA 10 mM, KCl 150 mM, DTT 10 mM, HEPES 100 mM, pH 7,0, tiourea 35 mM y TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v). La Tabla 7 enumera las variantes 9B8 ("variantes") con la luminiscencia similar o potenciada en comparación con 9B8 según lo indicado por la luminiscencia normalizada con respecto a 9B8 ("URL (normalizada con respecto a 9B8)", es decir, veces de mejora). Las sustituciones de aminoácidos de A, G, N, R y M en la posición 72 proporcionaron al menos el mismo beneficio de brillo que el aminoácido Q, es decir, 1 vez.

Tabla 7: Variantes con luminiscencia similar en comparación con la variante 9B8

Variante	URL (normalizadas con respecto a 9B8)
9B8 + Q72A	1,1
9B8 + Q72G	1
9B8 + Q72N	1
9B8 + Q72R	1
9B8 + Q72M	1

Se generaron variantes adicionales con especificidad relativa potenciada con relación a la nueva PBI-3939 como se ha descrito previamente mediante la saturación de las posiciones de aminoácidos 18, 68, 72, 75 y 90 de la variante 9B8. Se prepararon lisados de *E. coli* y se analizaron para determinar el brillo como se ha descrito anteriormente usando coelenterazina natural y la nueva PBI-3939 como sustratos. Se determinó la especificidad relativa a partir de la proporción de la luminiscencia de la variante con PBI-3939 con respecto a la luminiscencia de la variante con coelenterazina natural, normalizada con respecto a la proporción de la luminiscencia correspondiente de 9B8. La Tabla 8 enumera variantes 9B8 ("variantes") con al menos 1,1 veces de aumento de la especificidad relativa por PBI-3939. Los resultados demuestran que al menos un cambio adicional en cada uno de los sitios proporcionó especificidad relativa potenciada por PBI-3939 frente a la coelenterazina natural. Las variantes 9B8 con sustituciones de aminoácidos K, D, F, G, Y, W y H en la posición 18 tuvieron el número de veces de mejora más alta en la especificidad relativa.

Tabla 8: Variantes con especificidad relativa potenciada por PBI-3939

Variante	Especificidad relativa (URL de PBI-3939/URL de coelenterazina natural; normalizadas con respecto a 9B8)
9B8 + L18K	40,7
9B8 + L18D	25,8
9B8 + L18F	25,6
9B8 + L18G	18,2
9B8 + L18Y	17,8
9B8 + L18W	11,2
9B8 + L18H	9,1
9B8 + L18R	3,5
9B8 + L18M	3,4
9B8 + L18N	2,9
9B8 + L18P	2,6
9B8 + L18S	2,3
9B8 + Y68W	1,1
9B8 + Q72W	6,1
9B8 + Q72Y	2,5

9B8 + Q72F	2,2
9B8 + Q72V	2,2
9B8 + Q72I	2,1
9B8 + Q72T	1,9
9B8 + Q72N	1,8
9B8 + Q72R	1,7
9B8 + Q72P	1,6
9B8 + Q72G	1,5
9B8 + Q72A	1,4
9B8 + Q72M	1,3
9B8 + Q72C	1,3
9B8 + Q72H	1,2
9B8 + Q72S	1,2
9B8 + M75F	1,2
9B8 + V90R	2,4
9B8 + V90Y	1,6
9B8 + V90D	1,4
9B8 + V90P	1,4
9B8+V90K	1,3
9B8 + V90Q	1,2

G. Variantes 9B8+K33N

- 5 Se generó una variante adicional, 9B8 opt+K33N (SEQ ID NO: 42 y 43) para examinar los beneficios de la sustitución de aminoácido K33N en el brillo, la especificidad relativa y la estabilidad térmica. Se examinó 9B8 opt+K33N y se comparó con 9B8 opt (descrito en el Ejemplo 25A) en diversas aplicaciones.

- 10 Se prepararon lisados de *E. coli* que contenían la variante 9B8 opt o 9B8 opt+K33N y se analizaron como se ha descrito anteriormente, excepto el tampón de ensayo que contenía TERGITOL® NP-9 al 0,1 % (v/v). Se midió la luminiscencia generada de los lisados usando la nueva PBI-3939 y la coelenterazina natural como sustratos. Se calculó la especificidad relativa de las variantes para PBI-3939 y para la coelenterazina natural como se ha descrito anteriormente. 9B8 opt+K33N ("K33N") tuvo una mayor producción de luz (URL) y una especificidad relativa más alta por PBI-3939 que la coelenterazina natural en comparación con 9B8 opt (FIG. 29), lo que indica que la sustitución K33N proporciona una mayor producción de luz y mejora la especificidad relativa.

- 20 Se creó una nueva biblioteca de OgLuc usando 9B8opt+K33N como molde de partida. La biblioteca aleatoria se creó usando el kit de mutagénesis aleatoria DIVERSIFY® PCR (Clontech; n.º de catálogo 630703). Se usó la condición 5 (como se indica en el manual del usuario) para generar variantes adicionales, y la tasa de mutación media se calculó en 2,6 mutaciones por gen mediante la compilación de los datos de secuencias de 83 clones seleccionados al azar. Se clonó esta biblioteca PCR en el fondo de vector no de fusión, basado en pF4Ag, descrito anteriormente y el fondo de tipo sándwich, es decir, Id-OgLuc-HT7 (que se describe en el Ejemplo 45). Las variantes del fondo de vector no de fusión, basado en pF4Ag se designan con (NF). Las variantes en el fondo del vector de tipo sándwich se designan con (F). Para clonar el producto de PCR en ambos vectores, se añadió un aminoácido, es decir, una glicina, a la secuencia variante en pF4Ag, generando una nueva posición 170 en la variante de OgLuc ("170G"). 170G está presente en la construcción de sándwich, pero, en este caso, se considera parte del enlazador entre OgLuc y HT7. Para cada biblioteca, se ensayaron 4.400 clones de *E. coli* como se ha descrito anteriormente con las siguientes excepciones. El tampón de lisis contenía MES 300 mM, pH 6,0, en lugar de HEPES y TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v), pero no contenía tiourea. El tampón de ensayo contenía MES 100 mM, pH 6,0 en lugar de HEPES y tiourea 35 mM. Los volúmenes de ensayo fueron los siguientes: 10 µl de células, 40 µl de tampón de lisis y 50 µl de tampón de ensayo.

- 35 Se exploró la biblioteca de PCR del fondo de no fusión basado en pF4Ag para determinar variantes adicionales con mayor luminiscencia en comparación con 9B8 opt+K33N+170G (SEQ ID NO: 68 y 69). Las variantes seleccionadas se ensayaron en células HEK293 y NIH3T3. Para cada tipo de células, se sembraron 15.000 células y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se transfectaron las células como se describe en el Ejemplo 25 con 10 ng de pGL4.13 (Promega Corp.) como control de transfección y 100 ng del ADN de ensayo de OgLuc. se retiró el medio y las células se lisaron con 100 µl de tampón de lisis como se describe en el Ejemplo 25, a excepción de que el tampón de lisis contenía MES 100 mM, pH 6,0, en lugar de HEPES y la luminiscencia se midió usando un luminómetro GLOMAX®. Para cada muestra, se ensayaron 10 µl de lisado con 50 µl de tampón de lisis que contenía PBI-3939 20 µM. Para el control de transfección, se ensayaron 10 µl de lisado con 50 µl de Reactivo de ensayo BRIGHT-GLO™.

La Tabla 9 muestra las veces de aumento de la luminiscencia de variantes en células de *E. coli*, HEK293 y NIH3T3, y las sustituciones de aminoácidos que se encuentran en las variantes. Las variantes 27A5 (NF) (SEQ ID NOS: 70 y 71), 23D4 (NF) (SEQ ID NO: 72 y 73) y 24C2 (NF) (SEQ ID NO: 74 y 75) tuvieron al menos 1,3 veces de aumento de la luminiscencia en células de *E. coli* y HEK293.

5

Tabla 9: Aumento de la luminiscencia generada por variantes de OgLuc en comparación con 9B8 opt+K33N+170G en células de *E. coli*, HEK293 y NIH3T3

Muestra	Secuencia	Veces frente a 9B8 opt+K33N + 170G		
		<i>E. coli</i>	HEK293	NIH3T3
27A5 (NF)	T39T,170G	1,3	1,5	1,3
23D4 (NF)	G26G, M106L, R112R,170G	1,5	1,6	1,2
24C2 (NF)	R11Q, T39T, 170G	1,5	1,5	1,1

Basándose en los datos anteriores, se diseñaron otras variantes de combinación y se generaron (véase la Tabla 10) en el contexto del fondo de vector de no fusión basado en pF4Ag sin 170G. Las variantes se analizaron en células de *E. coli*, HEK293 y NIH3T3 como se ha descrito anteriormente y se compararon con 9B8 opt+K33N. También se examinaron las variantes para determinar la luminiscencia con la coelenterazina natural. La Tabla 10 muestra las veces de aumento de la luminiscencia de las variantes en células de *E. coli*, HEK293 y NIH3T3, y las sustituciones de aminoácidos encontradas en las variantes ("Muestra"). Las variantes se nombraron mediante la adición de las sustituciones de aminoácidos adicionales en la variante al prefijo "9B8 opt+K33N". La Tabla 11 muestra la especificidad relativa de las diferentes variantes por PBI-3939 en comparación con la coelenterazina natural en células de *E. coli*, NIH3T3 y HEK293. Como se muestra en la Tabla 10, la variante 9B8 opt+K33N+T39T+K43R+Y68D ("V2"; SEQ ID NO: 92 y 93) tuvo mejor luminiscencia en *E. coli* y una ligera mejora de la luminiscencia en las células NIH3T3. La variante 9B8 opt+K33N+L27V+K43R+Y68D ("L27V, K43R, Y68D") tuvo una mejora neutral de la luminiscencia (Tabla 10) y un aumento de cinco veces de la especificidad relativa frente a 9B8 opt+K33N (Tabla 11) en los tres tipos de células examinadas.

10

15

20

Tabla 10: Aumento de la luminiscencia generada por variantes de combinación de OgLuc en comparación con 9B8 opt+K33N en células de *E. coli*, NIH3T3 y HEK293

Muestra	Veces frente a 9B8 opt +K33N		
	<i>E. coli</i>	NIH3T3	HEK293
T39T	1,8	1,1	1,1
K43R	1,2	1,1	1,1
T39T, K43R	1,3	0,9	1,1
Y68D	1,0	1,0	1,2
K43R, Y68D	1,2	1,2	1,2
T39T, K43R, Y68D ("V2")	1,8	1,1	1,3
L27V	0,9	0,7	0,8
L27V, K43R	0,7	0,6	0,6
L27V, K43R, Y68D	1,2	0,8	0,9
L27V, Y68D	1,2	0,8	0,7
S66N, K43R	0,9	1,1	1,1
L27V, K43R, S66N	1,0	0,6	0,7
9B8 opt + K33N	1,0	1,0	1,0

25

Tabla 11: Cambio en la especificidad relativa de variantes de combinación de OgLuc por PBI-3939 en comparación con la coelenterazina natural en células de *E. coli*, NIH3T3 y HEK293

Muestra	Veces frente a la Coelenterazina natural		
	<i>E. coli</i>	NIH3T3	HEK293
T39T	18,2	18	20
K43R	29,5	31	32
T39T, K43R	29,4	30	32
Y68D	11,4	10	12
K43R, Y68D	18,6	19	21
T39T, K43R, Y68D ("V2")	18,5	18	21
L27V	85,2	85	97
L27V, K43R	120,1	131	147
L27V, K43R, Y68D	98,3	98	101
L27V, Y68D	59,9	61	64
S66N, K43R	22,9	23	25
L27V, K43R, S66N	100,4	97	106
9B8 opt + K33N	19,0	19	19

Se generaron variantes de Ogluc adicionales a partir de 9B8 opt+K33N para que contuvieran al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos adicionales con respecto a SEQ ID NO: 1: L27V, T39T, K43R, Y68D o S66N (véase "Muestra" en la Tabla 12 para las sustituciones de aminoácidos de las variantes). Las variantes se nombraron mediante la adición de las sustituciones de aminoácidos adicionales en la variante detrás del prefijo "9B8 opt+K33N". Se examinaron estas variantes adicionales y las variantes 9B8 opt+K33N+L27V+Y68D ("L27V, Y68D"), 9B8 opt+K33N+L27V+K43R+Y68D ("L27V, K43R, Y68D"), 9B8 opt+K33N+L27V+K43R+S66N ("L27V, K43R, S66N") y 9B8 opt+K33N+T39T+K43R+Y68D ("T39T, K43R, Y68D"; también conocidas como "V2") de lo anterior, para determinar el brillo, la especificidad relativa, la estabilidad de la señal y la estabilidad térmica. Las variantes se compararon con la variantes 9B8 opt ("9B8") y 9B8 opt+K33N ("K33N").

Se prepararon lisados de *E. coli* que contenían las variantes, y se analizaron como se ha descrito previamente. Se midió la luminiscencia generada por los lisados usando la PBI-3939 nueva y la coelenterazina natural como sustratos. La luminiscencia de las variantes se normalizó con respecto a la luminiscencia generada por 9B8 opt (Tabla 12). Se calculó la especificidad relativa de las variantes por PBI-3939 y la coelenterazina natural dividiendo la luminiscencia de las variantes usando PBI-3939 como sustrato con la luminiscencia de las variantes usando la coelenterazina natural como sustrato (Tabla 12). Estos datos indican que la sustitución de aminoácido L27V disminuye la especificidad por la coelenterazina natural.

Tabla 12: Aumento de la luminiscencia generada por variantes de Ogluc en comparación con 9B8 y cambio en la especificidad de las variantes de Ogluc por PBI-3939 en comparación con la coelenterazina natural en lisados bacterianos

Muestra	Veces frente a 9B8	Veces frente a la coelenterazina
9B8	1,0	7
K33N	1,1	21
T39T, Y68D	0,9	12
T39T, L27V, K43R	1,2	149
L27V, T39T, K43R, Y68D	1,8	110
T39T, K43R, Y68D	1,6	21
L27V, T39T, K43R, S66N	1,3	114
L27V, K43R, Y68D	1,3	110
L27V, Y68D	1,0	63
L27V, K43R, S66N	1,1	114

H. Variantes V2

Se diseñó un conjunto de variantes adicionales usando V2 (9B8opt con las sustituciones de aminoácidos adicionales K33N+T39T+K43R+Y68D) como molde. Las sustituciones que se muestran en la Tabla 13 se diseñaron basándose en cualquiera de 1) la diversidad conocida de acuerdo con la alineación basada en la estructura de 28 proteínas de unión a ácidos grasos (1VYF, 1FDQ, 2A0A, 1O8V, 1BWY, 2ANS, 1VIV, 1PMP, 1FTP, 2HNX, 1JJJ, 1CBR, 2CBS, 1LPJ, 1KQW, 2RCQ, 1EII, 1CRB, 1IFC, 2PYI, 2JU3, 1MVG, 2QO4, 1P6P, 2FT9, 1MDC, 1O1U, 1EIO; véase la solicitud publicada n.º 2010/0281552); o 2) el sondeo de restos alternativos en las posiciones identificadas anteriormente que desempeñan un papel en la especificidad de sustrato. Los cambios que aparecen en "Consenso" de la Tabla 13 se refieren a los restos identificados en al menos el 50 % de las proteínas de unión a ácidos grasos mencionadas anteriormente, alineadas. Los cambios que aparecen en "Minoría predominante" se refieren a los restos identificados en muchas de las proteínas de unión a ácidos grasos mencionadas anteriormente, pero que se encuentran en menos del 50 % de las secuencias alineadas. Los cambios que aparecen en "Otros" se refieren a los restos que se identificaron con menor frecuencia que el resto de la minoría predominante en una posición dada de las secuencias alineadas. Por último, los cambios que aparecen en "Especificidad" se refieren a las posiciones sospechosas de participar en la determinación de la especificidad de una variante por la coelenterazina o un análogo de coelenterazina. Por ejemplo, los cambios de especificidad diseñados en la posición 27 (resto de leucina de la secuencia parental, es decir, V2) se cambiaron a otros restos o aminoácidos hidrófobos que representaban compuestos químicos alternativos (por ejemplo, otros restos hidrófobos que contienen anillos, restos que contienen cadenas laterales polares sin carga o restos que contienen cadenas laterales cargadas); y los cambios de especificidad diseñados en la posición 40 (prolina en la secuencia parental) eran de una muestra de diferentes compuestos químicos (compuestos químicos (por ejemplo, otros restos hidrófobos que contienen anillos, restos que contienen cadenas laterales polares descargadas o restos que contienen cadenas laterales cargadas); cabe señalar que la glicina, glutamina, isoleucina y leucina se identifican en esta posición las proteínas de unión a ácidos grasos alineadas).

Tabla 13

Consenso	Minoría predominante	Otro	Especificidad
9 T	9 K	9 R	27 A, I, M, G, D
14 S	10 Y	40 G	40 T, S, F, D, Y

16 E 23 R
 22 M 32 T
 23 K 63 T
 24 A 87 P
 25 L 100 I
 32 R 111 N, D
 35 A 118 I
 39 K 134 K
 46 Q 142 K, W
 57 F 147 N
 63 S 149 M
 87 N 152 E
 97 E 162 Q
 98 F
 100 E
 102 T
 110 D
 113 K
 118 V
 125 L
 126 V
 129 Q
 130 K
 142 E
 146 G
 147 D
 150 V
 152 T
 165 K

Las variantes se construyeron usando protocolos convencionales de mutagénesis dirigida (véanse los ejemplos anteriores) y los plásmidos resultantes se transformaron en *E. coli* para su análisis. Los cultivos se desarrollaron mediante inducción guiada convencional en medio mínimo como se ha descrito anteriormente. A 10 µl de las células de *E. coli* cultivadas transformadas, se añadieron 40 µl de tampón de lisis (MES 100 mM, pH 6,0, 0,3 x PLB, 0,3 mg/ml de lisozima, 0,003 U/µl de RQ1 DNasa I y TERGITOL® NP 9 al 0,25 % (v/v)) seguidos de la adición de un volumen igual (50 µl) de reactivo de ensayo (CDTA 1 mM, KCl 150 mM, DTT 2 mM, PBI-3939 20 µM o coelenterazina natural, MES 100 mM, pH 6,0, tiourea 35 mM y TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v)). Se midió la luminiscencia en un luminómetro de microplacas GLOMAX® 96 (Promega Corp.).

La Tabla 14 resume las diferentes sustituciones de aminoácidos identificadas en el análisis. Los datos se presentan como normalizados con respecto al clon parental (V2) con respecto a la luminiscencia medida tanto para PBI-3939 como para la coelenterazina natural. También se muestra el cambio relativo en la especificidad hacia PBI-3939 con respecto a la coelenterazina natural.

Tabla 14

Sustitución	PBI-3939 NORMALIZADA	COELENTERAZINA NORMALIZADA	CAMBIO RELATIVO EN ESPECIFICIDAD POR PBI-3939
10 Y	0,7	0,2	3,5
14 S	1,3	1,2	1,1
16 E	0,5	0,2	2,5
23 K	1,3	4	0,3
24 A	0,4	0,2	2,0
25 L	0,0001	0,000023	4,3
27 A	0,8	0,1	8,0
27 D	0,006	0,001	6,0
27 G	0,088	0,005	17,6
27 I	0,2	0,024	8,3
27 M	2,2	0,9	2,4
40 I	0,0017	0,0002	8,5
40 L	0,0007	0,0001	7,0

ES 2 567 410 T3

40 Q	0,0001	0,000026	3,8
87 H	1,2	1,5	0,8
87 T	1,3	1,6	0,8
97 E	0,014	0,01	1,4
100 I	0,002	0,002	1,0
102 T	1,1	1,1	1,0
111 N	0,6	0,6	1,0
113 K	1,2	0,6	2,0
125 L	0,6	0,4	1,5
129 Q	0,0003	0,0001	3,0
130 K	1,1	0,9	1,2
142 E	0,9	0,3	3,0
142 K	0,9	0,3	3,0
142 N	0,8	0,4	2,0
146 G	0,9	0,8	1,1
147 N	0,4	0,4	1,0
149 M	0,7	0,4	1,8
150 V	0,9	0,4	2,3
152 E	0,9	0,5	1,8
152 T	0,9	0,3	3,0

I. Variantes L27V

5 Usando la variante de OgLuc L27V como molde de partida, es decir, secuencia de partida o secuencia parental, se realizaron variantes adicionales en las que algunos de los aminoácidos (Tabla 15) de la variante L27V se revirtieron a los aminoácidos que se encuentran en la luciferasa de OgLuc natural de SEQ ID NO: 1. Las variantes se construyeron mediante mutagénesis dirigida como se ha descrito anteriormente. Entonces, se exploraron las variantes como se ha descrito anteriormente para determinar la actividad relativa ya sea con la coelenterazina natural o con PBI-3939. La luminiscencia se midió en un TECAN® INFINITE® F500, 5 min después de la adición del sustrato/reactivo de ensayo (como se describe en H) y se normalizó con respecto al molde de partida de la variante L27V. El análisis por SDS-PAGE de los lisados indica niveles de expresión comparables (datos no mostrados).

15 La Tabla 15 muestra las actividades relativas de las variantes L27V con la coelenterazina natural o PBI-3939. Las actividades relativas < 1 indican que la reversión es perjudicial en comparación con el resto en ese sitio de la variante L27V. Las actividades relativas > 1 indican que la reversión es favorable para la actividad en comparación con el resto en ese sitio de la variante L27V. Algunos datos adicionales sobre estos mutantes indicaron lo siguiente: 166K, 54F, 54A y L27V se ensayaron para determinar la estabilidad térmica. Los $T_{1/2}$ a 60 °C para 166K, 54F y 54A fueron del 87, 74 y 33 %, respectivamente, lo que indica que estas sustituciones causan una reducción de la estabilidad térmica. Los valores de Km para estas mismas 4 variantes fueron las siguientes: para la coelenterazina natural, L27V fue de 16 μ M, 54A fue de 23 μ M, 54F fue de 40 μ M y 166K fue de 21 μ M; para PBI-3939, L27V fue de 18 μ M, 54A fue de 62 μ M, 54F fue de 163 μ M y 166K fue de 23 μ M. Esto indica una mayor afinidad de sustrato por L27V, en particular para las sustituciones de la posición 54.

Tabla 15

Coelenterazina natural (50 mM)		PBI-3939 (50 mM)	
Sustitución de aa	Actividad relativa (5 min)	Sustitución de aa	Actividad relativa (5 min)
72L	0,2	72L	0,6
4A	1,0	4A	1,0
124Q	1,6	124Q	1,0
43K	1,9	43K	1,1
115P	0,6	115P	0,9
166N	2	166N	2,0
75M	1,1	75M	1,2
54F	0,1	54F	0,4
68F	0,5	68F	0,9
33A	1,7	33A	1,0
138Y	1,0	138Y	1,0
54A	0,6	54A	1,6
90I	0,8	90I	0,6
33K	4,2	33K	0,8
44V	0,7	44V	1

166K	2,1	166K	2
11Q	1,6	11Q	1,3
166F	0,3	166F	0,4
18Q	4,1	18Q	0,6

Ejemplo 23 - Análisis mutacional de la posición 166

- 5 A. Para evaluar el efecto de diferentes aminoácidos en la posición 166 sobre la actividad de la luciferasa, se sustituyó el resto de arginina (R) de la posición 166 con cada uno de los otros 19 aminoácidos usando mutagénesis dirigida como se ha descrito anteriormente en el contexto de un vector pF4Ag (es decir, en el contexto de la secuencia de OgLuc de tipo silvestre SEQ ID NO: 1). A continuación, se expresaron estas variantes de la posición 166 en *E. coli* como se ha descrito anteriormente.
- 10 Para crear lisados, se añadieron 50 µl de 0,5 x reactivo de lisis celular FASTBREAK™ (Promega Corp.) a 950 µl de cultivos inducidos y se incubaron las mezclas durante 30 minutos a 22 °C. Para el análisis, se ensayaron 50 µl de lisado en 50 µl de reactivo de ensayo (como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 22H) ya sea con PBI-3939 100 µM, coelenterazina natural 30 µM o coelenterazina-h 22 µM). Se midió la luminiscencia como se ha descrito previamente (FIG. 30A-C). Las FIG. 30A-C muestran la actividad relativa de los mutantes N166. El análisis Western
- 15 confirmó la expresión comparable de todas las variantes (datos no mostrados).
- B. Se evaluaron las sustituciones de aminoácidos individuales específicas L27V, A33N, K43R, M75K, T39T, L72Q y F68D del fondo de OgLuc de tipo silvestre o N166R. Las sustituciones de aminoácidos individuales se generaron mediante mutagénesis dirigida como se ha descrito anteriormente, se expresaron en *E. coli* como se ha descrito
- 20 anteriormente y se midió la luminiscencia usando el reactivo de ensayo (descrito previamente en el Ejemplo 22H) con coelenterazina natural 22 µM (FIG. 30D). El análisis Western confirmó la expresión comparable de todas las variantes (datos no mostrados).

Ejemplo 24-Variantes de eliminación

- 25 Las eliminaciones en la variante L27V se realizaron de la siguiente manera:

Tabla 16

Eliminación n.º	Eliminación realizada
27	Restos 1-27 y Val-1
52	Restos 1-52 y Val-1
64	Restos 1-64 y Val-1
84	Restos 1-84 y Val-1
19	Restos 65-83
23	Restos 65-87
23A1	Restos 65-87 + G64D

- 30 El extremo N-terminal de la variante de OgLuc L27V es metionina, valina y fenilalanina, es decir, MVF. Con fines de numeración, la fenilalanina se consideró el primer aminoácido. "Val-1" indica que la valina de "MVF" se eliminó. La metionina de "MVF" se incluyó en estas eliminaciones. Se clonaron las variantes de eliminación L27 en el vector pF4Ag y se expresaron en células KRX de *E. coli* como se ha descrito anteriormente. Se realizaron inducciones y preparaciones de lisado como se ha descrito. Los lisados se analizaron usando el reactivo de ensayo (descrito con anterioridad; PBI-3939 100 µM) y la luminiscencia se midió como se ha descrito anteriormente (FIG. 31). Los datos
- 35 demuestran que los fragmentos más pequeños de las variantes de OgLuc también pueden generar luminiscencia.

Ejemplo 25-Optimización de codones de las variantes de OgLuc

- 40 A. IV y 9B8

Se usaron las variantes de OgLuc IV y 9B8 como moldes para la optimización de codones. Los objetivos, como se entiende por los expertos en la materia, eran de dos tipos: 1) eliminar los sitios de unión a los factores de transcripción conocidos, u otras secuencias reguladoras, por ejemplo, módulos de promotor, sitios donantes/aceptores de corte y empalme, silenciadores del corte y empalme, secuencias de Kozak y señales de poli-

45 A, que pudieran interferir en la regulación o la expresión de las variantes de OgLuc; y 2) modificar la secuencia de ADN (a través de mutaciones silenciosas que no modificaran la secuencia de proteínas) para eliminar los codones usados raramente y favorecer los codones más usados en células de *E. coli*, organismos humanos, de otros mamíferos u otros organismos eucariotas (Wada *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 18:2367 (1990))

- 50 Se diseñaron dos secuencias optimizadas diferentes para IV y 9B8, denominadas opt (aka optA) y optB, para cada variante. La primera secuencia optimizada, es decir, opt/optA para cada variante, se diseñó mediante la

identificación de los dos mejores, es decir, más comunes codones humanos para cada sitio (véase la Tabla 17) y luego se escogió uno al azar uno de los dos para su incorporación en cada sitio. Para las versiones optB, se usó la versión optimizada de uso de codones anterior, es decir, opt/optA, como molde de partida y se reemplazó cada codón con el otro de los dos mejores codones humanos identificados para esta estrategia de optimización de codones. Como ejemplo, la leucina de la posición 3 ya sea de la secuencia de IV o de 9B8 está codificada por el codón TTG. TTG no es uno de los dos codones más comunes para la leucina en una célula humana y, por lo tanto, el codón se cambió por los codones más comunes, alternativos, para la leucina, CTC (opt/optA) o CTG (optB). Este mismo proceso se repitió para todas las leucinas de la secuencia y, debido a la naturaleza aleatoria de la metodología, un codón CTC pudo terminar en optB y la CTG pudo terminar en optA. Debido a dicha metodología de uso de dos codones para la optimización, las secuencias opt/optA y optB resultaron tener una distinción máxima de los codones.

Tabla 17: Codones usados en la optimización de codones

Aminoácido	Elección n.º 1	Elección n.º 2
Gly	GGC	GGG
Glu	GAG	GAA
Asp	GAC	GAT
Val	GTG	GTC
Ala	GCC	GCT
Ser	AGC	TTC
Lys	AAG	AAA
Asn	AAC	AAT
Met	ATG	
Ile	ATC	ATT
Thr	ACC	ACA
Trp	TGG	
Cys	TGC	TGT
Tyr	TAC	TAT
Phe	TTC	TTT
Arg	CGG	CGC
Gln	CAG	CAA
His	CAC	CAT
Leu	CTG	CTC
Pro	CCC	CCT

A continuación, se analizó cada una de las 4 secuencias (IV opt, IV optB; 9B8 opt, 9B8 optB) (programa informático Genomatix, Alemania) para determinar la presencia de sitios de unión a factores de transcripción u otras secuencias reguladoras como se ha descrito anteriormente, y se interrumpieron estas secuencias no deseadas a través de cambios de nucleótidos silenciosos. En algunos casos, cuando había otros codones no poco frecuentes tanto para seres humanos como para *E. coli*, los sitios de unión a factores de transcripción u otros elementos reguladores se eliminaron cambiándolos a uno de estos codones, a pesar de no ser la elección n.º 1 ni la elección n.º 2 (véase la Tabla 18). En algunos casos, en los que la eliminación de un sitio de unión a factores de transcripción u otro elemento regulador habría implicado la introducción de un codón poco frecuente, el sitio de unión a la transcripción (u otro elemento regulador), por lo general, no se cambió.

Tabla 18: Codones adicionales usados para eliminar sitios de unión a factores de transcripción y otros elementos reguladores

Aminoácido	Elección n.º 3	Elección n.º 4
Gly	GGA	GGT
Val	GTA	GTT
Ala	GCG	GCA
Ser	AGT	TCA
Thr	ACG	ACT
Leu	TTG	CTT
Pro	CCG	CCA

Se generaron versiones de codones optimizados de IV ("IV opt" (SEQ ID NO: 22) y "IV optB" (SEQ ID NO: 23)) y 9B8 ("9B8 opt" (SEQ ID NO: 24) y "9B8 optB" (SEQ ID NO: 25)), y se clonaron en pF4Ag mediante métodos conocidos en la técnica. Se sembraron células HEK293 en placas de 96 pocillos a 15.000 células/pocillo y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, las células se transfectaron transitoriamente en 6 duplicados de pocillos usando reactivo de transfección TRANSIT®-LT1 (Minis Bio) con 100 ng de ADN de plásmido codificante de

las versiones de codones optimizados en pF4Ag y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Las células HEK293 también se transfectaron bien con pGL4.13 (Luc2/SV40) (Paguio *et al.*, "pGL4 Vectors: A New Generation of Luciferase Reporter Vectors" Promega Notes, 89:7-10 (2005)) o pGL4.73 (hRL/SV40) (*Id.*) para normalizar las diferencias en la eficacia de la transfección. Se usaron diez ng/transfección o 10 % del ADN total transfectado. Se eliminó el medio, y las células se lisaron con 100 µl de tampón de lisis que contenía CDTA 10 mM, KCl 150 mM, DTT 10 mM, HEPES 100 mM, pH 7,0, tiourea 35 mM y TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v) para crear una muestra de lisado. Se midió la luminiscencia de la muestra de lisado en un luminómetro TECAN® INFINITE® F500 de la siguiente manera: para hRL y las variantes de OgLuc, se ensayaron 10 µl de la muestra de lisado para determinar la luminiscencia con 50 µl de tampón de lisis que contenía 20 µM de sustrato (coelenterazina natural para hRL y PBI-3939 para las variantes de OgLuc). Para Luc2 (SEQ ID NO: 28 y 29), una luciferasa de luciérnaga, se ensayaron 10 µl de muestra de lisado para determinar la luminiscencia con 50 µl de reactivo de ensayo de la luciferasa BRIGHT-GLO™ (Promega Corp.).

La FIG. 32 muestra una comparación de la luminiscencia medida para los lisados que contienen las versiones de codones optimizados de las variantes de OgLuc en comparación con hRL y Luc2. hRL y la variantes de OgLuc se normalizaron con respecto a pGL4.13 y Luc2 se normalizó con respecto a pGL4.73 usando métodos conocidos en la técnica. Como se muestra en la FIG. 32, Luc2 resultó tener aproximadamente 14 veces más luminiscencia que hRL. Las variantes de OgLuc tuvieron mayor luminiscencia en comparación con Luc2 y hRL. Las versiones de codones optimizados de IV ("opt IV" y "IV optB") y 9B8 ("9B8 opt") mostraron un aumento de la luminiscencia en comparación con las versiones no optimizadas.

Como resultado de esta optimización, las versiones "opt/optA" se expresaron mejor en células HEK293 humanas que su secuencia parental, mientras que las versiones "optB" no se expresaron así en células HEK293 en comparación con la secuencia parental.

B. L27V

Se optimizó la variante L27V (SEQ ID NO: 88) para minimizar la aparición de elementos de respuesta de vertebrados comunes (cualquier sitio de unión a factor de transcripción (TFBS) en la base de datos Genomatix). Se crearon tres versiones optimizadas diferentes de la variante L27V:

1. L27V01 - versión 1 (SEQ ID NO: 319) - se eliminaron los módulos de promotor y el resto de elementos de secuencia no deseados (datos adicionales a continuación) mediante sustituciones de nucleótidos a excepción de los TFBS individuales.

2. L27V02 - versión 2 - se usó L27V01 como punto de partida, es decir, se eliminaron la secuencia parental y la mayor cantidad de TFBS posible usando criterios de coincidencia de alta rigurosidad (una rigurosidad mayor implica una mayor coincidencia con el sitio de unión y, por lo tanto, se encontrará un menor número de coincidencias que a una rigurosidad inferior). Hubo dos versiones, A (SEQ ID NO: 322) y B ((SEQ ID NO: 318)), creadas para L27V02. Estas dos versiones se crearon mediante la selección de diferentes codones para cada versión con el fin de eliminar los elementos de secuencia no deseados. Ambas versiones se analizaron mediante la búsqueda de TFBS con rigurosidad inferior.

3. L27V03 - versión 3 (SEQ ID NO: 325) - se usó L27V02B (SEQ ID NO: 318) como secuencia de partida. Se retiraron las coincidencias de TFBS a rigurosidad inferior dentro de lo posible. Se creó L27V03 para que tuviera codones muy distintos de L27V02A.

Se usaron los siguientes criterios para crear las variantes L27V optimizadas:
 1. Uso de codones: preferentemente, se usaron los dos mejores codones humanos para cada aminoácido (como se hizo para la variante de IV), y se evitó el uso de los codones humanos poco frecuentes (HS; codificación para < 10 % de los aminoácidos) (Tabla 19). Se empleó el uso de codones de *E. coli* poco frecuentes (EC), cuando fue necesario, para eliminar los elementos de secuencia no deseados.

Tabla 19

Aminoácido	Mejores codones	Codones evitados	Aminoácido	Mejores codones	Codones evitados
A	GCT		N	AAT	
A	GCC		N	AAC	
C	TGT		P	CCT	
C	TGC		P	CCC	
D	GAT		Q	CAG	
D	GAC		Q	CAA	
E	GAG		R	CGG	
E	GAA		R	CGC	CGT [HS]

F	TTT		S	AGC	TCG [HS]
F	TTC		S	TCC	
G	GGG		T	ACA	
G	GGG		T	ACC	
H	CAT		V	GTG	
H	CAC		V	GTC	
I	ATT		w	TGG	
I	ATC		Y	TAT	
K	AAG		Y	TAC	
K	AAA				
L	CTG	TTA [HS]			
L	CTC	CTA [HS,EC]			
M	ATG				

2. Los elementos de secuencia no deseados que se eliminaron en lo posible:

5 A. Sitios de enzimas de restricción (RE): se eliminaron sitios RE que serían útiles para la clonación y que, en cambio, no deberían estar presentes en el marco de lectura abierto (ORF).

B. Elementos de secuencia eucariótica: se eliminaron los sitios donantes y aceptores de corte y empalme, silenciadores de corte y empalme, secuencia de Kozak y secuencias de PolyA en la cadena de ARNm (+).

10 C. Se eliminaron los módulos promotores de vertebrados (PM) (en la categoría Genomatix: Vertebrados).

D. En lo posible, se eliminaron los TFBS de vertebrados (en categorías de Genomatix: vertebrado, elementos promotores del núcleo generales y otras diversas secuencias). Esto solo se aplica a las versiones optimizadas 2 y 3 de L27V, pero no a la versión 1.

15

E. Elementos de secuencia de *E. coli*: se eliminaron los promotores de *E. coli*.

F. Estructura secundaria de ARNm: se eliminaron estructuras secundarias potentes (alta energía de plegamiento de ARNm) cercanas al extremo 5' (Zuker, *Nucleic Acid Res.* 31(13): 3406-3415 (2003)) y otras estructuras de horquilla potentes.

20

En la Tabla 20, se proporciona una comparación de secuencias, el porcentaje de identidad de pares de secuencias ("()") indica el número de diferencias de nucleótidos).

25

Tabla 20

	L27V01	L27V02A	L27V02B	L27V03
L27V00	99 % (3)	97 %	97 %	94 %
L27V01		98 % (12)	98 %	94 % (32)
L27V02A			99 % (4)	95 % (26)
L27V02B				96 %

Ejemplo 26 - Estabilidad de la señal de variantes de OgLuc

A. 15C1, 9B e IV

30

Se midió la estabilidad de la señal de 15C1 con PBI-3945 y de 9B8 con PBI-3889, y se compararon con IV. Se cultivaron *E. coli* que contenía ADN de plásmido codificante de 15C1, 9B8 o IV, y se indujeron como se ha descrito anteriormente en duplicados de 8 pocillos. Las células se lisaron usando un tampón de lisis que contenía HEPES 300 mM, pH 8,0, 0,3 x tampón de lisis pasiva ("PLB"; Promega Corp. n.º de catálogo E194A), 0,3 mg/ml de lisozima y 0,003 U/µl de RQ1 DNasa. Los lisados se diluyeron 1:1.000 en tampón de lisis y se midieron para determinar la luminiscencia usando un luminómetro TECAN® INFINITE® F500. Las mediciones se tomaron inmediatamente después de la adición de 10 µl de la muestra de lisado diluida de 50 µl de tampón de ensayo TERGITOL "Glo" al 0,5 % ("TERGITOL al 0,5 %"), que contenía KCl 150 mM, CDTA 1 mM, DTT 10 mM, tiourea 100 mM, TERGITOL® NP-9 (v/v) al 0,5 % y 20 µM de cualquiera de nuevas coelenterazinas PBI-3945 o PBI 3889.

35

40

La estabilidad de la señal de las variantes se determinó volviendo a realizar la lectura de la placa cada 30 segundos durante un periodo de tiempo posterior a la adición del tampón de ensayo a la muestra. La semivida de la señal se determinó a partir de estas mediciones usando métodos conocidos en la técnica. Se comparó la semivida de la señal entre las variantes y entre IV. Tanto 15C1 como 9B8 resultaron tener una semivida de la señal de al menos 30 min (FIG. 33). Aunque 15C1, ensayada con PBI-3945, resultó tener una luminiscencia más alta en t = 0, la señal se

45

desintegró más rápidamente que la variante 9B8 ensayada con PBI-3889. En $t = 10$ min, la luminiscencia de 15C1 con PBI-3945 y la de 9B8 con PBI-3889 fueron equivalentes.

B. 9B8 opt+K33N

5 Se examinó la estabilidad de la señal de las variantes 9B8 opt+K33N. Se prepararon lisados de *E. coli* que contenían las variantes y se analizaron como se ha descrito previamente, a excepción de que el tampón de ensayo contenía TERGITOL® NP-9 al 0,25 % (v/v), MES 100 mM, pH 6,0, CDTA 1 mM, KCl 150 mM, tiourea 35 mM, DTT 2 mM y PBI-3939 20 μ M. La Tabla 22 muestra la semivida de la señal en min de las variantes, e indica que la sustitución de aminoácidos L27V mejora la estabilidad de la señal.

Tabla 22: Estabilidad de la señal de variantes de Ogluc en lisados bacterianos.

Muestra	Semivida de la señal (min)
9B8	74
K33N	55
T39T, Y68D	87
T39T, L27V, K43R	139
L27V, T39T, K43R, Y68D	114
T39T, K43R, Y68D	61
L27V, T39T, K43R, S66N	124
L27V, K43R, Y68D	122
L27V, Y68D	139
L27V, K43R, S66N	124

15 Se midieron la actividad de la señal y la estabilidad de la variante L27V (9B8+K33N+L27V+T39T+K43R+Y68D; SEQ ID NO: 88 y 89) y compararon con la de las luciferasas de luciérnaga (Luc2) y de *Renilla*. Se fusionaron la variante L27V, las luciferasas de Luc2 y *Renilla* a HALOTAG®, y se expresaron en *E. coli*. Las luciferasas se purificaron usando HALOTAG® como marcador de la purificación de acuerdo con el protocolo del fabricante (pFN18A; Sistema de purificación de proteínas HALOTAG®). Se mezclaron 10 pM de cada luciferasa purificada (diluidos en DMEM sin rojo de fenol que contenía PRIONEX® al 0,01 %) con un volumen equivalente de un reactivo de ensayo (MES 100 mM, pH 6, tiourea 35 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v), CDTA 1 mM, DTT 2 mM, KCl 150 mM y PBI-3939 100 μ M para la variante L27V; Sistema de ensayo de luciferasa ONE-GLO™ (Promega Corp.) para la luciferasa de luciérnaga; y Sistema de ensayo de luciferasa RENILLA-GLO™ (Promega Corp.) para la luciferasa de *Renilla*), y se controló la luminiscencia a lo largo del tiempo (3, 10, 20, 30, 45 y 60 min). Las FIG. 34A-B demuestran la alta actividad específica (FIG. 34A) y la estabilidad de la señal (FIG. 34B) de la variante L27V si se compara con la luciferasa de luciérnaga y de *Renilla*.

Ejemplo 27 - Cinética enzimática de las variantes de Ogluc

30 A. IV, 15C1, 9B8, 9F6 y 9A3

Usando los métodos conocidos en la técnica, se realizaron ensayos de cinética enzimática para medir la luminiscencia con los lisados de *E. coli* que contenían IV y las variantes de IV 15C1, 9B8, 9F6 y 9A3. Se indujeron las células, se lisaron y se diluyeron como se describe en el Ejemplo 26, excepto que el tampón de lisis tenía un pH de 7,5. Se ensayaron dos diluciones en serie de PBI-3939 en el tampón de ensayo descrito anteriormente en el Ejemplo 26 con los lisados diluidos. La FIG. 35 muestra los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ calculados usando un ajuste hiperbólico de IV y las variantes 15C1, 9B8, 9F6 y 9A3. Las variantes 9B8 y 9F6 tuvieron mayores valores de K_m en comparación con IV, mientras que los valores de K_m para las otras variantes se mantuvieron sin cambios. Todas las variantes 15C1, 9B8 y 9F6 tuvieron valores más altos de $V_{m\acute{a}x}$, mientras que 9A3 tuvo un valor de $V_{m\acute{a}x}$ inferior en comparación con IV.

15C1, que tuvo la luminiscencia más alta con PBI-3945 contenía la sustitución de aminoácidos K33N, lo que indica que K33N proporcionó un aumento de la luminiscencia. Se generó una variante 9B8 que tuviera esta sustitución adicional para proporcionar una mejora de la luminiscencia para esta variante. Se generaron variantes adicionales de 9B8 y 9F6 para tener al menos una de las sustituciones de aminoácidos K33N o V38I ("9B8+K33N+V38I" y "9F6+K33N"). La variante 1D6 se usó para resaltar la importancia de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 68, 72 y 75 para aumentar la producción de luz y la estabilidad. La FIG. 36 muestra los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ calculados usando un ajuste hiperbólico de IV y el variantes 9B8, 9B8+K33N+V38I, 9F6, 9F6+K33N y 1D6. Aunque los valores de K_m reales fueron diferentes entre las FIG. 35 y 36 para 9B8 y 9F6, la tendencia general entre las variantes fue uniforme.

La cinética enzimática, es decir, los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m , se determinaron y se compararon para las variantes 9B8 opt y 9B8 opt+K33N como se ha descrito anteriormente, excepto que los lisados de *E. coli* se ensayaron con un

tampón que contenía CTDA 1 mM, KCl 150 mM, DTT 2 mM, MES 100 mM, pH 6,0, tiourea 35 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,25 % (v/v), 10 mg/ml de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina y PBI-3939 20 μ M. La luminiscencia se midió en un luminómetro TECAN® INFINITE® F500. Como se muestra en la FIG. 37, los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m para 9B8 opt+K33N fueron más altos que 9B8 opt, lo que indica que este clon es más brillante y tiene una menor afinidad por el sustrato.

B. VARIANTES 9B8 OPT+K33N

Se determinaron los valores de la cinética enzimática para las variantes de OgLuc como se ha descrito anteriormente, excepto que la luminiscencia se midió usando un luminómetro GLOMAX®. Se usaron tres duplicados para cada variante. La Tabla 23 muestra los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ medios con la desviación estándar (" $K_m (+/-)$ " y " $V_{m\acute{a}x} (+/-)$ ", respectivamente) calculados usando FIYPER.EXE, Versión 1.0.

Tabla 23: Valores de $V_{m\acute{a}x}$ (URL/0,5 s) y K_m (μ M) para las variantes de OgLuc

Muestra	K_m	$K_m (+/-)$	$V_{m\acute{a}x}$	$V_{m\acute{a}x} (+/-)$
9B8	7,7	2,0	86.000.000	14.000.000
K33N	12,5	3,0	110.000.000	17.000.000
T39T, Y68D	7,9	1,8	74.000.000	10.000.000
T39T, L27V, K43R	21,4	5,4	150.000.000	28.000.000
L27V, T39T, K43R, Y68D	13,9	2,9	190.000.000	28.000.000
T39T, K43R, Y68D	10,5	2,8	140.000.000	25.000.000
L27V, T39T, K43R, S66N	16,3	4,8	130.000.000	28.000.000
L27V, K43R, Y68D	13,7	4,3	130.000.000	28.000.000
L27V, Y68D	10,2	3,0	97.000.000	19.000.000
L27V K43R, S66N	20,0	6,2	130.000.000	30.000.000

Ejemplo 28-Protein Estabilidad de variantes de OgLuc

Como la estabilidad de la proteína luciferasa es otro factor que afecta a la luminiscencia, se determinó la estabilidad de la proteína, es decir, la estabilidad térmica, de las variantes.

A. 15C1, 9B8, 9F6, 8A3 e IV

Se prepararon lisados de *E. coli* que contenían 15C1, 9B8, 9F6, 8A3 o IV y *E. coli* que expresaba hRL (SEQ ID NO: 30 y 31) a partir de cultivos inducidos como se ha descrito anteriormente. Las muestras de lisados se diluyeron 1:1.000 con un tampón que contenía HEPES 10 Mm, pH 7,5 con gelatina al 0,1 %. Se incubaron muestras de lisado diluidas (100 μ l), en placas de 96 pocillos por duplicado, a 50 °C. En diferentes puntos temporales, las placas se colocaron a -70 °C (menos setenta grados centígrados). Antes de la medición de la luminiscencia como se ha descrito anteriormente, se descongeló cada placa a temperatura ambiente, es decir, a 22 °C, durante 10 min. Las muestras (10 μ l de cada muestra descongelada) se analizaron usando coelenterazina natural como sustrato. La luminiscencia se midió inmediatamente después de la adición del tampón de ensayo para cada placa de punto temporal. La semivida de la proteína, lo que indica la estabilidad de la proteína, se calculó a partir de los datos de luminiscencia para cada punto temporal usando métodos conocidos en la técnica.

La Tabla 24 muestra la estabilidad de las proteínas de variantes 15C1, 9B8, 9F6 y 8A3 que tienen semividas en min (horas) de 630,1 (10,5), 346,6 (5,8), 770,2 (12,8) y 65,4 (1,1), respectivamente. En comparación, hRL resultó tener una semivida de 9,6 min, mientras que IV tuvo una semivida de 27,2 min. La Tabla 24 muestra también que a las 4 horas, el 79 %, 61 % y 80 % de 15C1, 9B8 y 9F6, respectivamente, permanecieron activos.

Tabla 24: Estabilidad de proteínas de variantes de OgLuc a 50 °C

Muestra	Semivida (min)	Semivida (horas)	% restante en t = 4 h
Renilla	9,6		
IV	27,2		
15C1	630,1	10,5	79 %
9B8	346,6	5,8	61 %
9F6	770,2	12,8	80 %
8A3	65,4	1,1	

B. 1D6, 9B8, 9B8+K33N+V38I, 9F6, 9F6+K33N e IV

Se prepararon lisados de *E. coli* que contenían 1D6, 9B8, 9B8+K33N+V38I, 9F6, 9F6+K33N o IV a partir de cultivos inducidos y se ensayaron para determinar la luminiscencia como se ha descrito anteriormente. Se ensayó la

estabilidad de la proteína, es decir, la estabilidad térmica de los lisados, como se ha descrito anteriormente en este Ejemplo. La FIG. 38 muestra la semivida en minutos (min) de las variantes a 50 °C y la luminiscencia de la muestra medida al iniciarse el período de incubación, es decir, $t = 0$, usando coelenterazina natural como sustrato. La diferencia entre la variante 9B8+33+38 y 9F6 era una sustitución de aminoácido, L27V, lo que indica que esta sustitución de aminoácido aumentó la estabilidad. La adición de sustituciones de "actividad/expresión" en las posiciones 68, 72 y 75 aumentó la estabilidad. La FIG. 38 muestra que K33N proporcionó una mayor estabilidad térmica que la variante 9F6 y que la variante 9B8 tuvo una mayor producción de luz y estabilidad de la variante 1D6. La diferencia entre estas dos variantes, es decir, 9B8 contiene sustituciones de aminoácidos adicionales F68Y, L72Q y M75K, indica la importancia de estas tres sustituciones.

Además de la estabilidad térmica, la integridad estructural determinada por la expresión, la estabilidad y la solubilidad también puede afectar a la luminiscencia. Como una forma de probar mejor la integridad estructural de las variantes potenciadas, se cultivaron KRX de *E. coli* que portaban las variantes de OgLuc basadas en pF4Ag (es decir, no HT7) N166R (previamente descrita en la solicitud de EE.UU. con nº de serie 12/773.002 (solicitud publicada de EE.UU. n.º 2010/0281552)), C1+A4E, IV, 9B8, 9F6 a 37 °C en caldo de Luria (LB) a un $DO_{600} = 0,6$ y después se indujeron a la sobreexpresión mediante la adición de ramnosa (concentración final del 0,2 %). A continuación, se cultivaron cultivos inducidos por duplicado bien a 25 o 37 °C durante 17 horas, momento en el que se prepararon fracciones totales (T) y solubles (S), y se analizaron por SDS-PAGE usando SIMPLYBLUE™ SafeStain (Invitrogen) para teñir los geles (FIG. 39A-B). hRL y Luc2 se usaron como controles.

Las variantes de OgLuc, hRL y Luc2 se expresaron bien y resultaron ser solubles cuando la inducción se produjo a 25 °C (FIG. 39A; caben destacar la banda oscura de aproximadamente 19 kDa de la fracción "soluble" para las variantes de OgLuc, excluyendo la variante N166R y las bandas de aproximadamente 36 y 64 kDa de la fracción "soluble" para hRL y Luc2, respectivamente). En cambio, aunque C1+A4E, IV, 9B8 y 9F6 expresado bien a 37 °C (significativamente mejor que hRL o Luc2, como se muestra en la fracción "total"), solo las variantes 9B8 y 9F6 fueron solubles cuando se empleó la inducción a alta temperatura (véase la FIG. 39B; cabe destacar la banda oscura de aproximadamente 19 kDa de la fracción "soluble" para 9B8 y 9F6). Estos resultados rastreados con los datos de estabilidad térmica se muestran en la Tabla 24 y en la FIG. 38.

C. 9B8 OPT Y 9B8 OPT+K33N

Se comparó la estabilidad térmica de las variantes 9B8 opt y 9B8 opt+K33N. Se prepararon lisados de *E. coli* que contenían la variante 9B8 opt o 9B8 opt+K33N y se analizaron como se ha descrito anteriormente, con las siguientes excepciones: los lisados se diluyeron 1:100 en tampón de lisis descrito anteriormente y los lisados diluidos por duplicado se incubaron a 60 °C en una termociclador. Se retiraron alícuotas en diferentes puntos temporales y se colocaron en hielo seco para congelar las muestras. Se descongelaron los lisados congelados a 22 °C y se ensayaron con un tampón que contenía CDTA 20 mM, KCl 150 mM, DTT 10 mM, PBI-3939 20 µM, HEPES 100 mM, pH 7,0, tiourea 35 mM y TERGITOL® NP-9 al 0,1 % (v/v). La luminiscencia se midió en un luminómetro GLOMAX® (Promega Corp.). La FIG. 40A muestra la evolución en el tiempo de la producción de la luz del valor del logaritmo natural (ln) de la luminiscencia medida en URL a lo largo del tiempo en minutos. Como se muestra en la FIG. 40B, 9B8 opt+K33N tuvo una semivida a 60 °C de 6,8 horas, que resultó ser más larga que la semivida de 5,7 horas de 9B8 opt.

La Tabla 25 muestra los datos de estabilidad térmica a 60 °C (" $T_{1/2}$ (60 °C)") de 9B8 opt y 9B8 opt+K33N, y de luminiscencia ("URL") al inicio del período de incubación (es decir, $t = 0$). 9B8 opt+K33N resultó ser más estable y aproximadamente 1,8 veces más brillante que 9B8 opt, lo que indica que la sustitución de aminoácidos K33N proporcionó tanto una mayor producción de luz como una mayor estabilidad térmica.

Tabla 25: Datos de estabilidad térmica y de luminiscencia para 9B8 opt y 9B8 opt +K33N

Variante	$T_{1/2}$ (60 °C)	URL
9B8 opt	5,7 h	23.283.252.000
9B8 opt+K33N	6,8 h	42.278.732.000

D. Variantes 9B8+K33N

Se examinó la estabilidad térmica de las variantes a 60 °C como se ha descrito anteriormente, excepto que el tampón de ensayo contenía MES 100 mM, pH 6,0 en lugar de HEPES. La Tabla 26 y la FIG. 41 muestran la semivida en horas de las variantes a 60 °C. Los datos indican que la sustitución de aminoácidos L27V mejora la estabilidad térmica.

Tabla 26: Estabilidad térmica de variantes de OgLuc a 60 °C

Muestra	Semivida en horas
9B8	5,1
K33N	6,7
T39T, Y68D	16,3

T39T, L27V, K43R	11,8
L27V, T39T, K43R, Y68D	21,7
T39T, K43R, Y68D	15,2
L27V, T39T, K43R, S66N	11,8
L27V, K43R, Y68D	23,2
L27V, Y68D	28,5
L27V, K43R, S66N	10,7

También se exploraron las variantes 9B8 y V2 (9B8+K33N+T39T+K43R+Y68D) en las células HEK293 para determinar su estabilidad. Las variantes se clonaron en pF4Ag y se transfectaron en células HEK293 (15.000 células/pocillo) como se ha descrito anteriormente. Después de la transfección, las células se lisaron en reactivo de ensayo (como se ha descrito previamente; no PBI-3939) y se midió la luminiscencia medidos el reactivo de ensayo con PBI-3939 20 μ M. 9B8 tuvo una semivida de 5,2 horas, mientras que V2 tuvo una semivida de 16,8 h. Esto coincide con la semivida observada para estas variantes en *E. coli* (Tabla 26).

E. Variante L27V

Se ensayó la actividad de la variante L27V (9B8+K33N+L27V+T39T+K43R+Y68D) en diversos valores de pH y diferentes condiciones de sal. 9B8 y 9B8+K33N mostraron previamente tener una estabilidad similar a pH 6 y pH 7 (datos no mostrados). Para evaluar la actividad en diferentes condiciones de sal, se mezclaron 50 μ l de tampón de ensayo con PBI-3939 20 μ M y cantidades variables de KCl o NaCl con 50 μ l de células HEK293 transfectadas transitoriamente con L27V (pF4Ag). Se midió la luminiscencia y se determinó el porcentaje de actividad (la proporción de la luminiscencia con respecto a la ausencia de sal) (FIG. 42B). Para evaluar la actividad a diversos pH, se preparó un reactivo que contenía citrato 100 mM, MES 100 mM, PIPES 100 mM, HEPES 100 Mm, TAPS 100 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v), MAZU® DF 204 al 0,05 %, CDTA 1 mM y DTT 1 mM valorado a diversos valores de pH. Se mezcló L27V 362 μ M en reactivo de ensayo con sustrato PBI-3939 100 μ M y se midió la luminiscencia (FIG. 42A).

Ejemplo 29-Gel filtración análisis cromatográfico de variantes de OgLuc

A. C1+A4E y 9B8

Se usó el análisis de filtración en gel para verificar el peso molecular esperado de las proteínas OgLuc purificadas basándose en los valores teóricos y, por consiguiente, para determinar su estado oligomérico. Se realizó una comparación entre el volumen hidrodinámico relativo de las variantes de OgLuc C1+A4E y 9B8 mediante cromatografía de filtración en gel. Para este análisis, se clonaron la secuencia de nucleótidos para las variantes de OgLuc C1+A4E y 9B8 en un Vector FLEXI® marcado con HQ (Promega Corp.) para crear una proteína marcada terminalmente con HQHQHQ se sobreexpresara en células KRX de *E. coli*. Las proteínas sobreexpresadas se purificaron usando el Sistema de purificación de proteínas HISLINK™ (Promega Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de cada patrón individual y proteína de muestra se analizaron por cromatografía de filtración en gel, que se realizó a 24 °C en un HPLC Agilent 1200, usando una columna de Superdex 200 5/150 GL (GE Healthcare) con un caudal de 0,25 ml/min (FIG. 43A-B). La fase móvil (es decir, tampón de ejecución) consistió en Tris 50 mM y NaCl 150 mM, pH 7,5. Se controló la elución de la proteína a 214 y 280 nm. Se generó una curva de patrón de calibración usando: 1) ovoalbúmina, 43 kDa (GE Healthcare), 2) anhidrasa carbónica, 29 kDa (Sigma) y 3) mioglobina, 17 kDa (Horse Heart, Sigma). Los pesos moleculares de las proteínas purificadas se calcularon directamente a partir de la curva de calibración.

La elución relativa de las proteínas observadas con esta columna fue ovoalbúmina a los 7,98 min, anhidrasa carbónica a los 8,65 min, 9B8 a los 8,97 min y mioglobina a los 9,06 min (FIG. 43A-B). Como se muestra en la FIG. 43B, 9B8 se eluye como una proteína de 21 kDa (PM predicho de aproximadamente 19 kDa) lo que indica que la variante 9B8 existía como un monómero, mientras que C1+A4E se eluyó en aproximadamente 4,3 min (FIG. 43A), lo que indica que C1+A4E se expresó y existe como un multímero, por ejemplo, posiblemente como un complejo tetramérico o algo mayor.

B. Variante L27V

Para demostrar que la variante de OgLuc L27V existe en un estado monomérico, se usó el análisis de filtración en gel para verificar el peso molecular esperado de la proteína L27V purificada en función del valor teórico y, por consiguiente, para determinar su estado oligomérico. Se preparó el volumen hidrodinámico relativo de la variante L27V mediante cromatografía de filtración en gel. Para este análisis, se clonó la secuencia de nucleótidos para la variante L27V en un vector pFN18A HaloTag® (Promega Corp.) para crear una proteína marcada terminalmente con HaloTag® que se sobreexpresa en células KRX de *E. coli* (Promega Corp.). La proteína sobreexpresada se purificó usando el Sistema de purificación de proteínas HaloTag® (Promega Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de cada patrón individual y proteína de muestra se analizaron por cromatografía de filtración en gel, que se realizó a 24 °C en un HPLC Agilent 1200, usando una columna de Superdex 200 5/150 GL

(GE Healthcare) con un caudal de 0,25 ml/min (FIG.56). La fase móvil (es decir, tampón de ejecución) consistió en Tris 50 mM y NaCl 150 mM, pH 7,5. Se controló la elución de la proteína a 214 y 280 nm. Se generó una curva de patrón de calibración usando: 1) ovoalbúmina, 43 kDa (GE Healthcare), 2) mioglobina, 17 kDa (Horse Heart, Sigma) y 3) ribonucleasa, 14 kDa (páncreas bovino, GE Healthcare). Como se muestra en la FIG. 44, la variante L27V se eluyó como una proteína de 24 kDa (el PM predicho es de aproximadamente 19 kDa) lo que indica que existía como un monómero.

Ejemplo 30 - Niveles de expresión de proteínas de variantes de OgLuc

10 A. IV, 8A3, 8F2, 9B8, 9F6 y 15C1

La normalización de la expresión de proteínas proporciona información acerca de las posibles diferencias en la actividad específica. Para proporcionar un medio para la cuantificación de la expresión de proteínas, las variantes de OgLuc se clonaron en un vector pF4Ag que contenía HT7 C-terminal para generar proteínas de fusión de variante de OgLuc-HT7 como se ha descrito anteriormente. Se generaron las siguientes proteínas de fusión: IV-HT7 (SEQ ID NO: 48 y 49), 8A3-HT7 (SEQ ID NO: 34 y 35), 8F2-HT7 (SEQ ID NO: 50 y 51), 9B8-HT7 (SEQ ID NO: 36 y 37), 9F6-HT7 (SEQ ID NO: 38 y 39) y 15C1-HT7 (SEQ ID NO: 52 y 53). Se cultivaron *E. coli* que contenía las fusiones de variante de OgLuc-HT7 y se indujeron como se ha descrito anteriormente. Se lisaron 900 µl de cultivo celular con 100 µl de 10 x reactivo de lisis celular FASTBREAK™ (Promega Corp.). Se añadió ligando de TMR HALOTAG® (Promega Corp.) a cada muestra de lisado bacteriano para obtenerse una concentración final de 0,5 µM. Se incubaron los lisados bacterianos con el ligando de TMR HALOTAG® durante 30 min a temperatura ambiente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se diluyeron 10 µl de cada muestra 1:1 con 1 x FASTBREAK™, es decir, 10 µl de muestra por 10 µl de 1 x FASTBREAK™. Se analizaron 15 µl del lisado y 15 µl de la dilución 1:1 para cada muestra por SDS PAGE. Las proteínas de fusión marcadas se resolvieron mediante SDS-PAGE, se tiñeron con SIMPLYBLUE™ SafeStain (FIG. 45A) y fluorimaged (GE Healthcare Typhoon). Las bandas se cuantificaron usando el programa informático ImageQuant (GE Healthcare). La FIG. 45B muestra el volumen de la banda medido a partir de la FIG. 45A para IV-HT7 ("IV"), 15C1-HT7 ("15C1"), 9B8-HT7 ("9B8"), 9F6-HT7 ("9F6") y 8F2-HT7 ("8F2"), normalizado con respecto a IV-HT7. Los datos muestran que las variantes de IV se expresaron bien en comparación con IV.

30 B. 9B8 opt, V2 y L27V

Se compararon los niveles de expresión y solubilidad de 9B8 opt, V2 y L27V. Se usaron estas tres variantes, en el contexto de un fondo de pF4Ag, para transformar células KRX de *E. coli*. Los clones resultantes se usaron para un experimento de expresión en el que se cultivaron colonias individuales durante la noche a 30 °C, se diluyeron 1:100 en LB, se cultivaron a una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5 y después se indujeron con ramnosa al 0,2 % durante 18 horas a 25 °C. A continuación, se incubaron las células durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de 0,5 x reactivo de lisis FASTBREAK™ (Promega Corp.) y los lisados resultantes se almacenaron a -20 °C. Después de una lenta descongelación en hielo, se prepararon fracciones solubles por centrifugación a alta velocidad durante 10 min a 4 °C. A continuación, se analizaron las fracciones totales (T) y solubles (S) en bruto para los niveles de expresión usando SDS-PAGE + tinción con Simply Blue (FIG. 46A), así como mediante la medición de la luminiscencia (FIG. 46B). Para la medición de la luminiscencia, se mezclaron 50 µl de lisados solubles en placas de microtitulación de 96 pocillos con 50 µl de reactivo de ensayo (descrito anteriormente; PBI-3939 40 µM) y se midió la luminiscencia usando un lector de placas de múltiple detección TECAN® INFINITE® F500. Estos resultados indican que la clasificación de estas tres variantes, en función de sus niveles de expresión y solubilidad, es L27V > V2 > 9B8opt.

Ejemplo 31 - Brillo de las variantes de OgLuc expresadas en células de mamífero

50 A. IV y 9B8

Se las variantes IV y 9B8 en el vector pF4Ag (es decir, sin HT7) para determinar el brillo en las células HEK293. Se usó hRL como control. En resumen, las células HEK293, sembradas a 15.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, se transfectaron transitoriamente usando TRANSIT®-LT1 con ADN de plásmido que codificaban las diversas variantes y/o secuencias de control. Las células se cultivaron, se lisaron y se trataron como se ha descrito en el Ejemplo 25. Las células se transfectaron junto con pGL4.13 (Promega Corp.) como un control de transfección (se usaron 10 ng/transfección o 10 % del ADN total transfectado). La luminiscencia se midió como se ha descrito anteriormente usando coelenterazina natural como sustrato para hRL o PBI-3939 como sustrato para las variantes de OgLuc. Los datos de las variantes de OgLuc se corrigieron para la eficacia de transfección usando la luminiscencia de Luc2 (es decir, midiendo la luminiscencia después de la adición de sustrato de luciferina). Las variantes de OgLuc IV y 9B8 tuvieron mayor luminiscencia en comparación con hRL ("*Renilla*") (FIG. 47).

Para la comparación del brillo en una base por mol en células de mamífero, se analizó la proteína de fusión HT7 C-terminal de la variante 9B8 ("pF4Ag-OgLuc-9B8-HT7") descrita en el Ejemplo 30, y se comparó con la proteína de fusión HT7 C-terminal-hRL ("pF4Ag-*Renilla*-HT7") y la proteína de fusión HT7 C-terminal-Luc2 ("pF4Ag-Luc2-HT7"). Se sembraron las células HEK293 (15.000) y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Estas células se transfectaron

con 100 ng de ADN de pF4Ag-*Renilla*-HT7, pF4Ag-Luc2-HT7 o pF4Ag-OgLuc-9B8-HT7, y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Se eliminó el medio y se lisaron las células como se ha descrito anteriormente. Se ensayaron 10 µl de cada muestra para determinar la luminiscencia (URL) con 50 µl de BRIGHT-GLO™ para Luc2, 50 µl de coelenterazina natural 20 µM para hRL y 50 µl de PBI-3939 20 µM para la variante 9B8.

5 Se combinaron los lisados de 6 pocillos y se marcaron con ligando de TMR HALOTAG® como se describe en el Ejemplo 30. Las proteínas de fusión marcadas se resolvieron mediante SDS-PAGE y fluorimaged (GE Healthcare Typhoon). Se determinaron las densidades de las bandas para cuantificar el número relativo de moles presentes para cada enzima luciferasa, y el valor de URL para cada muestra se normalizó entre la densidad de bandas calculada para normalizar los niveles de expresión de cada proteína, es decir, las URL normalizadas usando
10 cuantificación con marcador TMR (FIG. 48). De mol a mol, la variante 9B8 fue aproximadamente 15 veces más brillante que Luc2 y > 100 veces más brillante que hRL. Estos datos representaron diferencias en la actividad específica.

15 *B. 9B8 opt y 9B8 opt+K33N*

Se midió el brillo de las variantes 9B8 opt y 9B8 opt+K33N expresadas en células HEK293 y se comparó como se describe para las variantes sin HT7 en el Ejemplo 31. Se usaron 30 y se 100 ng de ADN de plásmido que contenía el ADN de variante para transfectar células HEK293. Las células se cultivaron y se indujeron como se describe en el
20 Ejemplo 31, excepto que las células se lisaron con un tampón de lisis que contenía CTDA 1 mM, KCl 150 mM, DTT 2 mM, MES 100 mM, pH 6,0, tiourea 35 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,25 % (v/v) y 10 mg/ml de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina. Los lisados se ensayaron con tampón de lisis que contenía PBI-3939 20 µM, y la luminiscencia se midió en un luminómetro TECAN® GENIOS™ Pro. Como se muestra en la FIG. 49, 9B8 opt+K33N resultó tener una mayor luminiscencia en comparación con 9B8 opt en células HEK293, que se rastrea con los datos de expresión
25 bacteriana de la Tabla 25 y FIG. 29.

C. Variantes 9B8+K33N

Se midió el brillo de las variantes expresadas en las células HEK293 y NIH3T3 como se ha descrito anteriormente.
30 La luminiscencia de las variantes se normalizó con respecto a la luminiscencia generada por 9B8 opt (Tabla 27).

Tabla 27: Aumento de la luminiscencia generada por la combinación de variantes de OgLuc en células NIH3T3 y HEK293

Muestra	HEK293	NIH3T3
9B8	1,0	1,0
K33N	1,8	1,5
T39T, Y68D	1,9	1,5
T39T, L27V, K43R	1,3	0,9
L27V, T39T, K43R, Y68D	1,6	1,6
T39T, K43R, Y68D	1,9	1,9
L27V, T39T, K43R, S66N	1,3	1,2
L27V, K43R, Y68D	1,6	1,5
L27V, Y68D	1,7	1,4
L27V, K43R, S66N	1,2	1,0

35 *D. L27V*

Se realizó una comparación de la luminiscencia de la variante L27V con la luciferasa de luciérnaga sola y como una fusión. Se sembraron células HEK293 y HeLa en placas a 15.000 y 10.000 células/pocillo, respectivamente, en los pocillos de placas de 12 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células se transfectaron luego con diluciones en serie de pF4Ag que contenía L27V o Luc2. Se transfectaron 20 ng de pGL4.13 (Promega Corp.) junto con L27V, y se transfectaron 20 ng de pGL4.73 (Promega Corp.) junto con Luc2 para actuar como ADN portador para diluciones inferiores del ADN de plásmido de L27V o Luc2. A continuación, se transfectó el ADN de plásmido en las células (6 duplicados para cada dilución por cada tipo de célula) usando reactivo de transfección TRANSIT®-LTI de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron entonces durante 24 horas
45 a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Tras de la transfección, se retiró el medio de las células, y se añadieron 100 µl de PBS con TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v) y se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. Se ensayaron 10 µl de cada lisado celular usando el sistema de ensayo de luciferasas ONE-GLO™ (Promega Corp.; Luc2) o reactivo de ensayo (Ejemplo 22H con PBI-3939 20 µM; OgLuc). La luminiscencia se midió como se ha descrito anteriormente para las células HEK293 (FIG. 50A) y HeLa (FIG. 50B).

La comparación de L27V y Luc2 como parejas de fusión se realizó como se ha descrito anteriormente. Se fusionaron

L27V y Luc2 a proteína HALOTAG® en pF4Ag. Las FIG. 50C-D muestran la luminiscencia medida con las diferentes fusiones en células HEK293 (FIG. 50C) y HeLa (FIG. 50D).

Además de medir la luminiscencia, también se analizó la expresión de proteínas. La transfección se realizó como se ha descrito anteriormente. Después de la transfección, se retiró el medio de las células, y las células se lavaron en 1 x PBS. Se añadieron 100 µl de 0,1 x tampón de lisis de mamífero (Promega Corp.) que contenía ligando de TMR HALOTAG® 1 µM (Promega Corp.) y 20 U de DNasa I, y las células se incubaron con agitación lenta durante 45 min a temperatura ambiente. A continuación, se congelaron las muestras de células a -20 °C. Para el análisis de proteínas, se añadieron 32,5 µl de 4 x colorante de carga SDS a cada muestra, y las muestras se calentaron a 95 °C durante 2 min. A continuación, se cargaron 10 µl de muestra en un gel de SDS-PAGE y se generaron imágenes con un escáner Typhoon como se ha descrito anteriormente (FIG. 50E).

Ejemplo 32 - Brillo de la variante de OgLuc purificada en comparación con la luciferasa de luciérnaga

Se sobreexpresó la variante de OgLuc 9B8 y se purificó como se describe en el Ejemplo 33. Las reacciones entre la enzima diluida y el sustrato se realizaron usando el siguiente tampón/reactivo de ensayo dos veces: MES 100 mM, pH 6,0, CDTA 1 mM, KCl 150 mM, tiourea 35 mM, DTT 2 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,25 % (v/v), MAZU® DF 204 al 0,025 %, 10 mg/ml de 2-hidroxi-β-ciclodextrina y PBI-3939 20 µM. Las concentraciones de ensayo final de enzima purificada y el sustrato fueron de 0,5 pM y 10 µM, respectivamente. En paralelo, se analizaron las reacciones entre luciferasa de luciérnaga purificada (es decir, luciferasa recombinante QUANTILUM® (Promega Corp.)) y luciferina. El tampón/reactivo de ensayo para la reacción de la luciferasa de luciérnaga fue BRIGHT-GLO™, y las concentraciones de ensayo finales fueron enzima 0,5 pM y luciferina 500 µM. Como los tampones/reactivos para cada reacción se sabía que proporcionaban cinética de "resplandor", se usó un punto temporal de 15 min para recoger los datos de luminiscencia. Los resultados de este experimento demostraron que 9B8 opt usando PBI-3939 (19.200 URL) fue aproximadamente 8 veces más brillante que la luciferasa recombinante QUANTILUM® con BRIGHT-GLO™ (2300 URL).

Ejemplo 33 - Análisis de la inhibición

Para determinar la susceptibilidad de las variantes de OgLuc a las interacciones no diana, se exploró la actividad de las variantes 9B8 y L27V frente a una biblioteca LOPAC (biblioteca de compuestos farmacológicamente activos). Se preparó una biblioteca LOPAC 1280 (Sigma) diluyendo los compuestos a 1 mM en DMSO. El día del ensayo, los compuestos se diluyeron a 20 µM en 1 x PBS y se transfirieron 10 µl a una placa blanca de 96 pocillos. A cada pocillo, se añadieron 10 µl de 9B8, L27V o enzima luciferasa de luciérnaga (Luc2) purificadas diluidas a 10⁻⁴ en tampón de lisis Glo (Promega Corp.) y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 min. A las muestras, se añadieron 20 µl de reactivo de ensayo (CDTA 1 mM, KCl 150 mM, DTT 2 mM, MES 100 mM, pH 6,0, tiourea 35 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v) y PBI-3939 60 µM), se incubaron durante 3 min, y se midió la luminiscencia en un luminómetro TECAN® GENIOS™ Pro. Para el ensayo de la luciferasa de luciérnaga, se usó el reactivo de ensayo BRIGHT-GLO™ (Promega Corp.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Como control negativo, 8 pocillos de cada placa contenían 1 x PBS + glicerol al 2 %. Como control positivo, 8 pocillos de cada placa contenían suramina 2 mM en DMSO al 2 % o inhibidor de luciferasa 1 2 mM en DMSO al 2 % (Calbiochem). La suramina se identificó en la exploración preliminar de la biblioteca LOPAC (es decir, la biblioteca LOPAC se exploró usando la variante 9B8 con una concentración de sustrato inferior de 20 µM) como inhibidor de OgLuc.

Los resultados de la FIG. 51 indican una baja frecuencia general de las interacciones no diana entre los compuestos de la biblioteca LOPAC y L27V. Esto sugiere un posible uso de L27V como una herramienta de exploración para grandes bibliotecas de diversos productos químicos y candidatos terapéuticos, incluyendo los formatos basados en células vivas (por ejemplo, la exploración de alto rendimiento).

Para examinar aún más la resistencia a la inhibición, se exploraron 9B8 y L27V purificadas frente a diversas concentraciones de suramina (Sigma S-2671) y tirfostina AG 835 ("Tyr ag 835") (Sigma T-5568) (FIG. 52A-C). Las FIG. 52E-D muestran las estructuras químicas para la suramina y Tyr AG 835, respectivamente. Se prepararon 9B8 y L27V purificadas como se ha descrito anteriormente. Se prepararon diluciones en serie (0, 2 µM, 6 µM, 20 µM, 60 µM, 200 µM y 2 mM) de los inhibidores en 1 x PBS con DMSO al 2 %. A los pocillos de una placa de ensayo blanca, de 96 pocillos, se añadieron 10 µl de enzima diluida y 10 µl de inhibidor diluido, y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 min. Se añadieron 20 µl de reactivo de ensayo (descrito anteriormente) y se midió la luminiscencia en un luminómetro GLOMAX®-96 (FIG. 52A-C). Las FIG. 52A-B muestran las curvas de respuesta a la dosis de 9B8 y L27V frente a la suramina (FIG. 52A) y Tyr AG 835 (FIG. 52B). La FIG. 52C muestra la concentración inhibitoria máxima media (CI₅₀) de la suramina y Tyr ag 835 para 9B8 y L27V. Los datos indican que L27V es un indicador potente que se podría usar como una herramienta de exploración de grandes bibliotecas de diversos productos químicos y/o candidatos terapéuticos.

Ejemplo 34 - Resistencia a las interacciones de proteínas inespecíficas

1. Se diluyeron en serie enzimas 9B8 y L27V purificadas en 1:10 en tampón (1 x PBS, DTT 1 mM e IGEPAL® CA-630 al 0,005 %) con o sin 0,5 mg/ml de BSA (4 series de cada dilución) hasta 200 µl en tubos de separación

de PCR. Las muestras se incubaron a 60 °C, y a las 0, 2, 4 y 6 horas, se transfirió una serie de diluciones para cada variante a -70 °C. Para analizar la actividad, se descongelaron las muestras hasta la temperatura ambiente en un baño de agua. Se añadieron 50 µl de reactivo de ensayo (como se ha descrito anteriormente con PBI-3939 100 µM), y se midió la luminiscencia para cada minuto durante 30 minutos en un lector de placas TECAN® INFINITE® F500. La actividad se calculó usando la luminiscencia media de las diluciones de 1×10^6 y 1×10^7 (FIG. 53).

2. Para demostrar la reactividad de las variantes de OgLuc al plástico, se expusieron 9B8 y L27V purificadas a placas de poliestireno y se midió su actividad. Se dispusieron 50 µl de 9B8 (45,3 pM) y L27V (85,9 pM) purificadas en DMEM sin rojo de fenol con PRIONEX® al 0,1 % en pocillos de una placa de microvaloración de poliestireno, de 96 pocillos, a los 60, 40, 20 y 0 min. A las muestras, se añadieron 50 µl de reactivo de ensayo (descrito anteriormente) que contenía PBI-3939 20 µM y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. La luminiscencia se midió como se ha descrito anteriormente, y se determinó el porcentaje de actividad (FIG. 54; proporción de luminiscencia con respecto al tiempo 0).

15 Ejemplo 35 - Modificación posterior a la traducción

Para determinar si las variantes de OgLuc sufren cualquier modificación posterior a la traducción cuando se expresan en células de mamífero, se expresaron las variantes 9B8 y L27V tanto en células de mamíferos como *E. coli*, y se analizaron mediante espectrometría de masas (MS).

Las variantes 9B8 y L27V se expresaron como fusiones de HALOTAG® N-terminal (pFNI 8K para *E. coli*; pFN21K para células HEK293) en células HEK293 y KRX de *E. coli* (Promega Corp.), y se purificaron usando el sistema de purificación de proteínas HALOTAG® (Promega Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analizaron aproximadamente 5 pmol de enzima purificada mediante LC/MS usando una columna C4 (Waters XBridge BEH300, 3,5 µm) en interfaz con un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Los datos se adquirieron de 600-2000 *m/z* usando el LTQ para la detección, y se procesaron usando el programa informático MagTran v1.03 (Zhang *et al.*, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 9: 225-233 (1998)). Ambas enzimas purificadas tenían una masa determinada experimentalmente de 19.666 Da, en comparación con una masa calculada de una variante de OgLuc no modificada, es decir, ausente de cualquier modificación posterior a la traducción, de 19.665 Da.

30 Ejemplo 36 - Evaluación de variantes de OgLuc como indicador de la transcripción

A. IV

Se examinó el uso de las variantes de OgLuc como indicadores de la transcripción. Para generar un indicador de la transcripción de cAMP, se subclonaron hRL e IV usando métodos conocidos en la técnica en un vector pGL4 modificado (Promega Corp.) que contenía una secuencia de barnasa, que se reemplazó por el fragmento de ADN de interés. La secuencia líder de pGL4 modificado contenía un promotor mínimo y un elemento de respuesta a cAMP (CRE; SEQ ID NO: 96), de modo que tras la estimulación con un agonista de cAMP tal como forskolina (FSK), las células se acumulaban cAMP activaron el indicador y generaron luminiscencia. En este experimento, se usaron 2 ng de ADN de cualquiera de las construcciones de indicadores de la transcripción con hRL o IV para transfectar células HEK293 como se describe en Ejemplo 25. A las 24 horas de la transfección, se trataron las células con FSK 100 µM. Las células que no fueron tratados con FSK se usaron como control. Después de 6 horas, se añadió un reactivo indicador a las células tratadas y de control. Para hRL, el reactivo indicador fue reactivo *Renilla-Glo*™ (Promega Corp.). Para IV, el reactivo indicador contenía CDTA 1 mM, pH 5,5, KCl 150 mM, DTT 10 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,5 % (v/v), coelenterazina-h 20 µM y tiourea 150 mM. Después de 10 minutos, se leyó la luminiscencia en un Varioskan® ultrarrápido (Thermo Scientific).

La FIG. 55 muestra la luminiscencia normalizada de las células HEK293 que contenían el indicador de la transcripción de hRL ("*Renilla*") o IV tratadas ("+ FSK") o no tratadas ("-FSK") con FSK. La respuesta, es decir, las veces de inducción o las veces de aumento ("VECES") en la luminiscencia se determinó dividiendo la luminiscencia de las células tratadas (+ FSK) con la luminiscencia de las células de control (-FSK). Como se muestra en la FIG. 55, la respuesta para hRL resultó ser < 50, mientras que para IV fue > 300, lo que demostró el uso de IV como indicador de la transcripción.

55 B. 9B8 y 9B8 opt

También se examinó el uso de las variantes 9B8 y 9B8 opt como indicadores de la transcripción y se comparó con los indicadores de la transcripción hRL y Luc2 como se ha descrito anteriormente para el indicador de la transcripción IV con las siguientes modificaciones. Los indicadores de la transcripción de cAMP que contenían bien la variante 9B8 o la variante 9B8 opt se generaron como se ha descrito anteriormente. Después de 6 horas de inducción con FSK, se retiró el medio de las células y se reemplazó con 100 µl de tampón de lisis descrito en el Ejemplo 25, creando un lisado. Se ensayó el lisado de las células transfectadas tratadas con o sin FSK para determinar la luminiscencia como se describe en el Ejemplo 25. Se ensayaron 10 µl del lisado de Luc2 con 50 µl de reactivo de ensayo de luciferasas BRIGHT-GLO™. Se ensayaron 10 µl del lisado de hRL con 50 µl de tampón de lisis que contenía coelenterazina natural 20 µM. Se ensayaron 10 µl de los lisados de las variantes 9B8 y 9B8 opt

con 50 µl de tampón de lisis que contenía PBI-3939 20 µM.

La FIG. 56 muestra la luminiscencia normalizada de las células HEK293 que contenían el indicador de la transcripción 9B8, 9B8 opt, hRL o Luc2 tratadas ("inducidas") o no tratadas ("basal") con FSK. La respuesta, es decir, las veces de inducción o las veces de aumento ("veces") en la luminiscencia se determinó dividiendo la luminiscencia inducida entre la luminiscencia basal (FIG. 56). Aunque los valores de veces de inducción son similares para cada uno de los indicadores a excepción de Luc2, la luminiscencia generada por el indicador de la transcripción 9B8 opt fue aproximadamente 2,5 registros superior al indicador de la transcripción *Renilla* inducido y aproximadamente 1,5 registros superior al indicador de la transcripción Luc2. La FIG. 56 demostró el uso de 9B8 y 9B8 opt como indicadores de la transcripción.

C. 9B8 y 9B8 opt+K33N

Se compararon las variantes 9B8 opt y 9B8 opt+K33N en un ensayo de indicadores de la transcripción líticos. Se clonó la variante 9B8 opt+K33N usando métodos conocidos en la técnica en un vector pGL4.29 (Promega Corp.), que contenía un elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE). Se ensayó el indicador de la transcripción 9B8 opt+K33N y se comparó con el indicador de la transcripción 9B8 opt como se ha descrito anteriormente en células HEK293. Se usaron 30 y 100 ng de ADN de plásmido que contenía las versiones de indicador de la transcripción de las variantes para transfectar células HEK293. Las células fueron inducidas con FSK durante 5 horas antes de la medición de la luminiscencia. Las células se lisaron con un tampón de lisis que contenía CTDA 1 mM, KCl 150 mM, DTT 2 mM, MES 100 mM, pH 6,0, tiourea 35 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,25 % (v/v) y 10 mg/ml de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina. La luminiscencia se midió en un luminómetro TECAN® GENIOS™ Pro. El lisado se ensayó con el tampón de lisis que contenía PBI-3939 20 µM. La FIG. 57 muestra la luminiscencia normalizada (transfección corregida) de las células HEK293 que expresaban la construcción de indicador de la transcripción opt 9B8 o 9B8 opt+K33N tratadas ("inducidas") o no tratadas ("basales") con FSK. Como se muestra en la FIG. 57, las veces de inducción de 9B8 opt fueron 360 cuando se usaron 30 ng de ADN para la transfección, y 109 cuando se usaron 100 ng para la transfección, mientras que las veces de inducción de 9B8 opt+K33N fueron de 275 y 147, respectivamente. Cuando se usaron cantidades superiores de ADN para la transfección, K33N proporcionó una respuesta mayor.

D. L27V

1. Se clonó L27V en un vector indicador como se describe en C de este Ejemplo que contenía un elemento de respuesta de CRE, NFκB o HSE (elemento de choque térmico). A continuación, se transfectaron construcciones indicadoras a células HEK293 o células HeLa como se ha descrito anteriormente. Después, las células se indujeron usando FSK para CRE, TNFα para NFκB o 17-AAG de HSE. La luminiscencia se midió como se ha descrito anteriormente usando el reactivo de ensayo con PBI-3939 20 µM (FIG. 58A-C). Todas las construcciones indicadoras se validaron en líneas de células HEK293, HeLa, NIH3T3, U2OS y Jurkat (datos no mostrados).

2. Se clonaron L27V02 y L27V02P (que contenían una secuencia PEST; SEQ ID NO: 323) en un vector indicador (basado en pGL4.32) como se describe en C de este Ejemplo. Otros variantes de OgLuc que contenían una secuencia PEST incluyen L27V01-PEST00 y L27V03-PEST02 (SEC ID NO: 320 y 326, respectivamente). A continuación, se transfectó la construcción indicadora a células HEK293 como se ha descrito anteriormente. Después, las células se indujeron usando FSK, y se midió la luminiscencia como se ha descrito anteriormente usando el reactivo de ensayo con PBI-3939 20 µM (FIG. 59A-B). También se crearon otras diversas construcciones indicadoras y se ensayaron en diversas líneas celulares (FIG. 59C). La FIG. 59A muestra la respuesta a la dosis completa para el sistema de CRE en las células HEK293. La FIG. 59B resume la FIG. 59A. La FIG. 59C resume los datos en las FIG. 59A-B, y muestra el mismo tipo de datos para el elemento de respuesta de NFκB. Ambas construcciones indicadoras de CRE y NFκB se examinaron en líneas celulares HEK293, HeLa, HepG2, Jurkat, ME180, HCT116 y U2OS.

3. Se transfectaron células HEK293 (0,9 x 10⁶ células en un matraz T25) con construcción de secreción pNFκB-L27V (SEQ ID NO: 463 y 464; en la que se sustituyó la secuencia de secreción de IL-6 (SEQ ID NO: 461 y 462) con la secuencia de secreción de OgLuc natural (SEQ ID NO: 54), *Metridia longa* (Clontech), pNFκB-L27V (secuencia de secreción natural; SEQ ID NO: 465 y 466) o ADN de plásmido de luciferasa de luciérnaga (Luc2; basada en pGL4.32) usando FUGENE® HD (Promega Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 8 horas, luego se trataron con tripsina en 0,5 ml de TrypLE (Invitrogen). Se volvieron a suspender los lisados en 8 ml de DMEM con FBS al 10 %, 1 x NEAA y 1 x piruvato de sodio. A continuación, se añadieron 100 µl de la muestra resuspendida a los pocillos de una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 16 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Tras la incubación, se retiró el medio de las células y se reemplazó por 100 µl de medio recién preparado con o sin TNFα (diluido en serie). Para ensayar para la secreción, a las 3 y 6 horas, se retiraron 5 µl de medio (por triplicado) de las células, se llevaron a 50 µl con PBS y se mezclaron con 50 µl de reactivo de ensayo (como se ha descrito anteriormente con PBI-3939 100 µM). La luminiscencia se midió a los 0 y 10 min como se ha descrito anteriormente

(FIG. 60).

Para medir la actividad de la luciferasa de *Metridia longa*, se usó el sistema de luciferasa secretada Ready-to-Glow™ (Clontech) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, se añadieron 5 µl de reactivo Ready-to-Glow™ a 5 µl de la muestra y 45 µl de PBS. La luminiscencia se midió inmediatamente después de la adición del reactivo (FIG. 60).

E. Variantes L27V optimizadas

Se prepararon ADN de plásmido (pGL4.32-L27V00, pGL4.32-L27V01, pGL4.32-L27V02, pGL4.32-L27V03 y pGL4.13) para la transfección usando FUGENE® HD de acuerdo con el protocolo del fabricante. El vector pGL4.32 (Promega Corp.) contiene el elemento de respuesta a NF-κB. Las secuencias de codones optimizados de L27V sustituyen la secuencia de Luc2P en el vector. El vector pGL4.13 (Promega Corp.) contiene el gen Luc2 dirigido por el promotor SV40.

A continuación, se mezclaron 300 µl de la mezcla de transfección de ADN con 6 ml de suspensión de células HeLa (2×10^5 células/ml), se homogeneizó y se sembraron 100 µl en pocillos de una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron, a continuación, durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 10 µl de 10 x rhTNFα en DPBS con BSA a los pocillos y se incubaron durante 4,5 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Seis pocillos recibieron solo vehículo. Luego se dejaron las células equilibrar a temperatura ambiente durante 20 min y, a continuación, se añadieron 100 µl de reactivo de ensayo (como se ha descrito anteriormente con PBI-3939 100 µM). A las células que expresaban Luc2 o que recibieron tratamiento de solo vehículo, se añadieron 100 µl del reactivo de ensayo de luciferasa ONE-GLO™. La luminiscencia se midió 12 minutos después de la adición del reactivo de ensayo como se ha descrito anteriormente. Las FIG. 61A-B muestra la luminiscencia absoluta, las FIG. 61C-D muestran la luminiscencia normalizada y las FIG. 61E-F muestran las veces de respuesta.

Ejemplo 37 - Variantes de OgLuc en un ensayo de indicador de la transcripción

Para demostrar la capacidad de las variantes de OgLuc desveladas en el presente documento para su uso como indicadores de la transcripción, se usó la variante de OgLuc 9B8 opt como un indicador de la transcripción en una transfección directa, inversa y a granel. Se escogieron estos métodos de transfección porque son representativos de los métodos comúnmente usados para la expresión transitoria de indicadores genéticos de la transcripción.

Transfección directa

Se prepararon indicadores de la transcripción que contenían el elemento de respuesta a AMPc (CRE) y 9B8 opt o 9B8 opt que comprendía además la secuencia de degradación de proteínas PEST (9B8 opt-P) en la cadena principal de pGL4.29 (Promega Corp.), es decir, el gen luc2P del vector pGL4.29 se reemplazó por 9B9 opt (SEQ ID NO: 24) o 9B8 opt-P (SEQ ID NO: 65). pGL4.29 se usó como control/punto de referencia.

Se sembraron células HEK293 a 15.000 células/pocillo en seis placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Las células se cultivaron en 100 µl de DMEM + FBS al 10 % + 1 x aminoácidos no esenciales (NEAA), y se incubaron durante la noche a 37 °C. Las células se transfectaron transitoriamente bien con 10 ng o 100 ng de ADN de plásmido/pocillo de pGL4.29 9B8 opt, pGL4.29 9B8 opt-P o pGL4.29. El ADN de plásmido se mezcló con 850 µl de OPTI-MEM® (Invitrogen) y 32,4 µl de reactivo de transfección FUGENE® HD (Promega Corp.), y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadieron ocho µl de la mezcla de DNA de transfección/indicador a los pocillos apropiados (2 construcciones/placa). Las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C. El medio se reemplazó con OPTI-MEM® + FBS al 0,5 % dializado + 1 x NEAA + 1 x piruvato de sodio + 1 X Penn-Strep, y se incubó durante la noche a 37 °C.

Tras la incubación, se añadió FSK 10 nM o 10 µM (de una reserva de 10 veces) en OPTI-MEM® a las células y se incubó durante 3 horas a 37 °C. Se añadió un reactivo lítico que contenía MES 100 mM, pH 6,1, CDTA 1 mM, KCl 150 mM, tiourea 35 mM, DTT 2 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,25 % (v/v), MAZU® DF 204 al 0,025 % y PBI-3939 20 µM a las células que contenían pGL4.29 9B8 opt o pGL4.29 9B8 opt-P, y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (se añadieron 100 µl de reactivo lítico a 100 µl de células). Se añadió reactivo de ensayo ONE-GLO™ (Promega Corp.) a las células que contenían pGL4.29 y se usó de acuerdo con el protocolo del fabricante (100 µl de reactivo añadidos a 100 µl de células). La luminiscencia se midió en un luminómetro GLOMAX®. La Tabla 26 muestra la luminiscencia de las células HEK293 que expresan los indicadores de la transcripción que contienen CRE tratados con FSK 10 nM ("momento basal") o FSK 10 mM, y la respuesta a FSK (es decir, la luminiscencia generada por las células tratadas con FSK 10 mM dividida entre la luminiscencia generada de las células tratadas con FSK 10 nM).

Los resultados que se muestran en la Tabla 28 indican que 9B8 opt y 9B8 opt-P fueron más brillantes que luc2P y que todos los indicadores de luciferasa respondieron a FSK cuando se usaron 100 ng de ADN para la transfección. Sin embargo, cuando solo se usaron 10 ng de ADN para la transfección, la luminiscencia para el indicador de luc2P fue inferior al nivel de detección del luminómetro.

Tabla 28: Indicadores de la transcripción que contienen CRE en células HEK293 (punto temporal de 3 h)

Construcción indicadora	100 ng de ADN para la transfección			10 ng de ADN para la transfección		
	Momento basal	URL (FSK 10 mM)	Respuesta	Momento basal	URL (FSK 10 mM)	Respuesta
9B8 opt	3.078.418	104.687.723	34	192810	12.926.465	67
9B8 opt-P	122.071	20.544.753	168	11179	1.353.459	121
luc2P	356	5.293	15	0	0	-

Transfección inversa

- 5 Se prepararon indicadores de la transcripción que contenían el elemento de respuesta antioxidante (ARE) y 9B8 opt o 9B8 opt-P en la cadena principal de pGL4.29 (Promega Corp.), es decir, el gen luc2P del vector pGL4.29 se reemplazó con 9B9 optar o 9B8 opt-P y CRE se reemplazó con 2 x ARE (SEQ ID NO: 66) usando métodos conocidos en el técnica.
- 10 Se trataron con tripsina células HEK293 (matraz T75, 3 ml de tripsina) y se volvieron a suspender en 1×10^5 células/ml (aproximadamente $8,9 \times 10^6$ células totales) en medio que contenía DMEM + FBS al 10 % + 1 x AANE. Cada indicador de la transcripción se preparó para la transfección mezclando 1,2 ml de OPTI-MEM[®], 12 µl de ADN de indicador de la transcripción (100 ng) y 36 µl de reactivo de transfección FUGENE[®] HD y se incubaron a temperatura ambiente durante 35 min. Después de la incubación, se añadieron 624 µl de la mezcla de ADN de transfección/indicador a 12 ml de suspensión celular, y se mezcló por inversión. Después de mezclar, se añadieron 100 µl de la mezcla de células/ADN a los pocillos de una placa de 96 pocillos (2 construcciones/placa). Las células se incubaron a 37 °C durante 22 horas. Se añadió *tert*-butilhidroquinona (una estabilizador de Nrf2; tBHQ; 1 µM ("momento basal") o 20 µM) o sulforafano (un antioxidante organosulfuroso conocido por activar Nrf2; 1 µM ("momento basal") o 20 µM) en OPTI-MEM[®] a cada pocillo, y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las células se lisaron con 100 µl de reactivo lítico como se ha descrito anteriormente para la transfección directa. La luminiscencia se midió en un Luminómetro GLOMAX[®].

- La Tabla 29 muestra la luminiscencia de las células HEK293 que expresan los indicadores de la transcripción que contienen ARE tratados con sulforafano 1 µM ("momento basal") o 20 µM, y la respuesta al sulforafano (es decir, la luminiscencia generada por las células tratadas con sulforafano 1 µM dividida entre la luminiscencia generada por las células tratadas con sulforafano 20 µM). La Tabla 30 muestra la luminiscencia de las células HEK293 que expresan los indicadores de la transcripción contienen ARE tratados con tBHQ 1 µM ("momento basal") o 20 µM, y la respuesta a tBHQ (es decir, la luminiscencia generada por las células tratadas con tBHQ 1 µM dividida entre la luminiscencia generada por las células tratadas con tBHQ 20 µM). Las Tablas 29 y 30 muestran que 9B8 opt y 9B8 opt-P podrían indicar las presencias de dos estímulos diferentes conocidos para ARE.

Tabla 29: Indicadores de la transcripción que contienen ARE en células HEK293 (punto temporal de 24 h)

Construcción indicadora	100 ng de ADN de transfección		
	Momento basal	URL (sulforafano 20 mM)	Respuesta
9B8 opt	15.600.000	89.600.000	5.8
9B8 opt-P	258.406	3.940.000	15

Tabla 30: Indicadores de la transcripción que contienen ARE en células HEK293 (punto temporal de 24 h)

Construcción indicadora	100 ng de ADN de transfección		
	Momento basal	URL (tBHQ 20 mM)	Respuesta
9B8 opt	15.100.000	120.000.000	8
9B8 opt-P	317.238	8.460.000	27

35

Transfección a granel

- En la transfección a granel de las células HEK293 y NIH3T3, se usaron los indicadores de la transcripción que contenían CRE y 9B8 opt o 9B8 opt-P descritos en la transfección directa. Se prepararon los indicadores de la transcripción que contenían el elemento de respuesta de choque térmico (HRE; SEQ ID NO: 67) y 9B8 opt o 9B8 opt-P en la cadena principal de pGL4.29 (Promega Corp.), es decir, el gen luc2P del vector pGL4.29 se reemplazó por 9B9 opt o 9B8 opt-P y CRE se reemplazó por la HRE. El indicador de la transcripción que contenía HRE y 9B8 opt-P se usó en la transfección a granel de células HeLa.

- 45 Las células HEK293, NIH3T3 o HeLa se sembraron en un solo pocillo de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos el día antes de la transfección a una densidad de $4,5 \times 10^5$ células/pocillo en 3 ml de medio completo (DMEM+FBS al 10 % + 1 x NEAA + 1 x piruvato de sodio) para células HEK293, 3×10^5 células/pocillo en 3 ml de medio completo (DMEM + suero de ternera fetal al 10 % (FCS) + 1 x NEAA + 1 x piruvato de sodio) para las células NIH3T3 o $9,9 \times 10^5$ células/pocillo en 3 ml de medio completo (DMEM + FBS al 10 % + 1 x NEAA) para las células HeLa. Las células se cultivaron durante la noche a 37 °C.

50

Se mezclaron 3.300 ng de ADN de plásmido indicador en 155 µl de OPTI-MEM® con 9,9 µl de reactivo de transfección FUGENE® HD, se agitaron con formación de vórtice y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Los indicadores de transcripción con CRE se usaron para transfectar células HEK293 y NIH3T3. Los indicadores de la transcripción con HRE se usaron para transfectar células HeLa. La mezcla de indicadores se añadió a las células, y se mezcló por agitación suave seguida de incubación a 37 °C durante 6 horas (HEK293 y NIH3T3) o 3 horas (HeLa). Las células se trataron luego con tripsina y se volvieron a suspender en medio (DMEM + FBS al 10 % + 1 x NEAA + 1 x piruvato de sodio para las células HEK293, DMEM + FCS al 10 % + 1 x NEAA + 1 x piruvato de sodio para las células NIH3T3, o DMEM + FBS al 10 % + 1 x NEAA para las células HeLa), seguido de la siembra en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos (20.000 células/100 µl para HEK293, 10.000 células/100 µl para NIH3T3 o 13.000 células/µl para HeLa) y se incubaron a 37 °C durante la noche .

Se añadió FSK (estimulador de CRE) o 17-AAG (estimulador de HRE; 17-alilamino-desmetoxi-geldanamicina) en OPTI-MEM® a las células (concentración final de 10 nM o 10 µM de FSK; concentración final de 1 nM o 1 µM de 17-AAG) y se incubaron a 37 °C durante 4 horas (FSK) o 6 horas (17-AAG). Se retiraron las placas de la incubadora y se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante 25 min. Las células se lisaron con 100 µl de reactivo lítico como se ha descrito anteriormente para la transfección directa. La luminiscencia se midió en un luminómetro GLOMAX®.

La Tabla 31 muestra la luminiscencia de las células HEK293 que expresan los indicadores de la transcripción que contienen CRE tratado con 10 nM ("momento basal") o FSK 10 mM, y la respuesta a FSK. La Tabla 32 muestra la luminiscencia de las células NIH3T3 que expresan los indicadores de la transcripción que contienen CRE tratadas con 10 nM ("momento basal") o FSK 10 mM, y la respuesta a FSK. La Tabla 33 muestra la luminiscencia de las células HeLa que expresan los indicadores de la transcripción que contienen HRE tratadas con 10 nM ("momento basal") o 17-AAG 10 mM, y la respuesta a 17-AAG.

Las Tablas 29-31 muestran que 1) las dos versiones de la variante de OgLuc 9B8opt pueden indicar la presencia y los efectos estimulantes de FSK en CRE en el contexto de dos líneas celulares diferentes, HEK293 y NIH3T3; y 2) 9B8 optP pueden indicar la presencia y los efectos estimulantes de 17-AAG en HRE en el contexto de las células HeLa.

Tabla 31: Indicadores de la transcripción que contienen CRE en células HEK293 (punto temporal de 4 h)

Construcción indicadora	100 ng de ADN de transfección		
	Momento basal	URL (FSK 10 mM)	Respuesta
9B8 opt	39.700.000	654.000.000	16
9B8 opt-P	3.960.000	460.000.000	116

Tabla 32: Indicadores de la transcripción que contienen CRE en células NIH3T3 (punto temporal de 4 h)

Construcción indicadora	100 ng de ADN de transfección		Construcción indicadora
	Momento basal	URL (FSK 10 mM)	Respuesta
9B8 opt	9.187.000	23.600.000	2,6
9B8 opt-P	410.461	3.720.000	9

Tabla 33: Indicadores de la transcripción que contienen EDH en células HeLa (punto temporal de 6 h)

Construcción indicadora	100 ng de ADN de transfección		
	Momento basal	URL (17-AAG 1 mM)	Respuesta
9B8 opt-P	278.118	3.204.000	12

Ejemplo 38 - Indicador lítico y secretable en células difíciles de expresar

Se sometieron a transfección inversa células HepG2, 1x 10⁵ células/ml en una suspensión de células, con el ADN de plásmido (cadena principal de pGL4.32; Promega Corp.) que contenía L27V02, luc2P (Promega Corp.), luc2 (Promega Corp.) o L27V02-IL6 (L27V02 con la secuencia de secreción natural sustituida con la secuencia de secreción de IL-6; ("IL601-L27V02A"; SEQ ID NO: 324) usando FUGENE® HD de acuerdo con las instrucciones del fabricante (mezcla de ADN de transfección con respecto a las células 1:20). A continuación, se sembraron 100 µl suspensión celular en pocillos de una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 22 horas a 37 °C, CO₂ al 5%. Otras construcciones de OgLuc que tienen la secuencia de secreción natural reemplazada por la secuencia de secreción de IL-6 incluyen IL601-L27V01 e IL602-L27V03 (SEQ ID NO: 321 y 327, respectivamente).

Para el análisis de la secreción, se retiró el medio de las células y se lavaron las células en 100 µl de DPBS. Se añadieron 100 µl de medio completo (DMEM + FBS al 10 % + 1 x AANE) junto con dosis variables (1 pg/ml -100 ng/µl) de rhTNFα ("TNFα") durante 4,5 h. Después, se separaron 10 µl de medio, se añadieron a 90 µl de medio completo y se añadieron 100 µl de reactivo de ensayo (como se ha descrito anteriormente; PBI-3939 100 µM). La luminiscencia se midió como se ha descrito anteriormente (FIG. 62A).

Para el análisis lítico, tras la siembra, se incubaron las células durante 4,5 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células luego se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante 20 min. Se añadió a las células reactivo de ensayo (como se ha descrito anteriormente, PBI-3939 100 µM), y se midió la luminiscencia como se ha descrito anteriormente (FIG. 62B.).

5

Ejemplo 39 - Características adicionales del indicador lítico

Las variantes de OgLuc de la presente divulgación en el contexto de un indicador de la transcripción lítico, basado en células, deben ofrecer una señal luminiscente de una magnitud tal que la señal aparezca más pronto de lo que podría con otras luciferasas. La luminiscencia brillante también debería permitir el examen de los promotores débiles.

10

Ejemplo 40 - Transfecciones de células de mamífero

Las variantes de OgLuc de la presente divulgación se usaron como indicadores en líneas celulares difíciles de transfectar, por ejemplo, Jurkat, HepG2, células primarias, células primarias que no se dividen o células madre. (Véase, por ejemplo, la FIG. 59C). Debido a su alta intensidad de señal, las variantes de OgLuc permiten detectar la luminiscencia cuando la eficacia de transfección es baja. Las variantes de OgLuc también se pueden usar como indicadores en células que sean especialmente sensibles a las condiciones asociadas con la transfección, es decir, la concentración de ADN, la adición del reactivo de transfección. Debido a la luminosidad de las variantes de OgLuc, se puede lograr un nivel adecuado de luminiscencia usando concentraciones de ADN más bajas, menos reactivo de transfección y, quizás, tiempos más cortos después de la transfección antes de comenzar un ensayo. Esto colocará una carga de menor toxicidad en las que, de otra manera, serían células sensibles. La luminiscencia brillante de las variantes de OgLuc también debería permitir la detección de una señal en puntos temporales muy prolongados en el caso de desearse dicha producción. Como otro ejemplo, las variantes de OgLuc se podrían usar como indicadores de los promotores naturales de una sola copia, por ejemplo, el promotor de HSB timidilato quinasa (TK), genes HOX o LIN28.

15

20

25

Ejemplo 41 - Líneas celulares estables

La identificación de líneas celulares estables, sólidas, que expresen una variante de OgLuc desvelada en el presente documento, bien en el citoplasma o como una forma secretada, se puede facilitar por la señal brillante de la luciferasa y el pequeño tamaño del gen OgLuc. La secuencia del gen relativamente pequeña debería reducir la probabilidad de la inestabilidad genética producida como consecuencia de la integración del ADN foráneo.

30

35

Para generar líneas celulares estables usando una variante de OgLuc descrita en el presente documento, se usa ADN de plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos de una variante de OgLuc y un gen marcador seleccionable, por ejemplo, neomicina, higromicina o puromicina, para transfectar una línea celular de interés, por ejemplo, células HEK293. Se siembran células de un número de pases inicial, por ejemplo, menos de 10 pases, en matraces de cultivo de tisular T25 (1 x 10⁶) o T75 (3 x 10⁶), y se dejan crecer durante la noche hasta aproximadamente el 75 % de confluencia. A continuación, las células se transfectan usando el ADN de plásmido anterior y un reactivo de transfección apropiado, por ejemplo, TRANSIT[®]-LT1 o FUGENE[®] HD. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se reemplazan los medios en las células por medio de selección que contiene el fármaco de selección, por ejemplo, G418, higromicina o puromicina, a una concentración determinada previamente para eliminar las células no transfectadas. La selección de células que contienen el ADN de plásmido se produce durante 2-4 semanas. Durante este tiempo, las células se vuelven a sembrar en medio de selección a varias concentraciones en matraces de cultivo tisular bien T25 o T75. Los medios de las células que se han vuelto a sembrar se sustituyen cada 3-4 días durante 2-3 semanas con medio de selección nuevo. Los matraces se controlan para determinar la formación de colonias de células vivas. Finalmente, los matraces contendrán muchas colonias de gran tamaño y pocas células muertas.

40

45

50

A partir de la combinación de colonias estables en los matraces, se aíslan colonias individuales y se expanden en una sola placa de cultivo tisular de 24 pocillos. En resumen, las células se recogen usando el método de tripsina/EDTA, es decir, las células se recogen mediante la eliminación del medio, aclarando con PBS exento de Ca²⁺ y Mg²⁺, y se separan mediante tratamiento con tripsina/EDTA. Las células se cuentan usando un hemocitómetro y se diluyen 1 x 10⁵ en medio completo. A continuación, las células se diluyen hasta 100 células/ml, 33 células/ml, 10 células/ml y 3,3 células/ml en medio completo. Se siembran 100 µl de cada dilución en todos los pocillos de la placa de cultivo tisular de 96 pocillos (1 placa para cada dilución) y se dejan crecer 4-5 días, tras lo que se añaden 50 µl de medio de selección a las células. Aproximadamente una semana después de la siembra, las células son examinadas visualmente para determinar el crecimiento de colonias, y se añaden otros 50 µl de medio de selección. Las células se siguen controlando hasta que una sola colonia cubre el 40-60 % de la superficie de los pocillos. Cuando una colonia está lista para la expansión y la exploración, las colonias se recogen usando el método de tripsina/EDTA. Cada colonia se transfiere a medio de selección de la siguiente manera: 1) Se diluye 1:10 en 6 pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos para el ensayo funcional, por ejemplo, la detección de la luminiscencia; 2) se diluye 1:10 en 3 pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos de fondo transparente para el ensayo de la viabilidad celular, por ejemplo, ensayo de viabilidad de células luminiscentes CELLTITER-GLO[®]

55

60

65

(Promega Corp.); y 3) se diluye 1:10 en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos para determinar la expansión. Las células de las placas para el ensayo funcional y de viabilidad celular se cultivan entonces 2-3 días, y se realizan el ensayo funcional y de viabilidad celular. Los clones positivos de la placa de 24 pocillos se ensayan posteriormente con el ensayo funcional y de viabilidad celular, así como para determinar la estabilidad de la expresión y la respuesta durante al menos 20 pases, la morfología a la tasa de crecimiento normal, y se congelan para usarlas en el futuro en el primer pase que sea posible.

Ejemplo 42 - Análisis de secreción de señales de OgLuc

10 A. *IV opt*

Se procesa OgLuc de tipo silvestre tras la síntesis en una proteína madura con la secuencia de señal de secreción escindida. Para determinar si la secuencia de señal de secreción facilitaría la secreción de la variante de OgLuc, se clonaron la variante *IV opt* del Ejemplo 25 y hRL en pF4Ag que contenía una señal de secreción de OgLuc N-terminal (SEQ ID NO: 54). Se transfectaron células HEK293 (15.000) en 100 µl de medio de Eagle modificado por Dulbecco ("DMEM") con suero bovino fetal al 10 % (FBS) como se describe en el Ejemplo 25 con 100 ng de ADN de plásmido, es decir, hRL o *opt IV* con o sin la secreción señal y cultivadas durante la noche a 37 °C. Se retiraron 50 µl de medio a una nueva placa y se reservaron para un ensayo posterior, generando una muestra de "medio". El resto del medio se retiró, y las células se lisaron con 100 µl de tampón de lisis descrito en el Ejemplo 25 para generar una muestra de "lisado". Se ensayaron 10 µl de la muestra de medio y 10 µl de la muestra de lisado para determinar la luminiscencia (FIG. 63). En las muestras para hRL con ("*Renilla sig*") o sin ("*Renilla*") la secuencia de señal de secreción de OgLuc se midieron usando 50 µl de tampón de lisis que contenía coelenterazina natural 20 µM. Las muestras para *IV opt* con ("*IV opt sig*") o sin ("*IV opt*") la secuencia señal de secreción de OgLuc se midieron usando 50 µl de tampón de lisis que contenía PBI-3939 20 µM.

En la FIG. 63, las barras coloreadas representan la cantidad de luz que se detectó a partir de los medios en ausencia de cualquier reactivo lítico. Las barras en blanco representan la luz total (secretada+no secretada) que se detectó después de la adición de un reactivo lítico. La FIG. 63 muestra que *IV opt* se secretó a partir de células HEK293 en el medio de crecimiento y que la secuencia de señal de secreción era funcional en células de mamífero. "*IV opt sig*" representa la única situación en la que se detectó una cantidad significativa de luciferasa en el medio. Los resultados también indican que este péptido señal en particular no facilitó la secreción de hRL.

B. *9B8, V2 y L27V*

Para determinar si la secuencia de señal de secreción de OgLuc facilita su secreción, se clonaron la variantes de OgLuc de *9B8, V2 y L27V* en pF4Ag que contenía una secuencia de señal de secreción de OgLuc N-terminal. Las variantes también se clonaron en vectores sin la secuencia de señal de secreción. A continuación, se sembraron células CHO o HeLa a 100.000 células/pocillo en 1 ml de medio F12 con FBS al 10 % y 1 x piruvato de sodio (células CHO) o DMEM con FBS al 10 % y 1 x piruvato de sodio (células HeLa) en placas de 12 pocillos, y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Tras la incubación durante la noche, las células se transfectaron con 1 µg de ADN de plásmido que contenía *9B8, V2 o L27V* con o sin la secuencia de señal de secreción usando el reactivo de transfección Transit[®]-LT1 (Minis Bio) y medio OPTI-MEM[®] (Invitrogen). Las células se incubaron de nuevo durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Tras la segunda incubación durante la noche, se retiró el medio y se guardó para su análisis. A las células, se añadió 1 ml de tampón de ensayo (CDTA 1 mM, KCl 150 mM, DTT 2 mM, MES 100 mM pH 6,0, tiourea 35 mM y TERGITOL[®] NP-9 al 0,5 % (v/v)) para crear un lisado celular. A 10 µl de lisado celular o medio reservado de cada muestra, se añadieron 50 µl de tampón de ensayo con PBI-3939 40 µM, y se midió la luminiscencia como se ha descrito anteriormente. Las FIG. 64A-D demuestran que las variantes *9B8, V2 y L27V* se pueden usar en un sistema secretable.

Para determinar la estabilidad de las variantes secretadas, se colocaron alícuotas de 150 µl del medio reservado de cada muestra a 37 °C o 50 °C. A continuación, se retiraron las alícuotas en diferentes puntos temporales (0, 1, 2, 3, 5, 6 y 7 min), se congelaron en hielo seco y se mantuvieron a -20 °C hasta el ensayo. Para el ensayo de estabilidad, las alícuotas de medio se descongelaron a temperatura ambiente y se mezclaron 10 µl de cada alícuota con tampón de ensayo con PBI-3939 (pH 6,0) como se ha descrito anteriormente. La luminiscencia se midió como se ha explicado anteriormente, y se determinó la semivida (t₅₀) (Tabla 34).

Tabla 34

Muestra	Semivida a 37 °C (días)
9B8	8
V2	10
L27V	17

Muestra	Semivida a 50 °C (horas)
9B8	3
V2	7
L27V	11

C. Comparación de 9B8 y V2 con la luciferasa secretada de *Metridia longa*

Se comparó la secreción de las variantes de OgLuc 9B8 y V2 con la de la luciferasa secretada de *Metridia longa*. Se sembraron células CHO a 300.000 células/pocillo en 3 ml de medio F12 con FBS al 10 % en los pocillos de placas de 6 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. A continuación, se transfectaron las células bien con 10 o 100 ng de cada variante o ADN de plásmido de luciferasa de *Metridia* (Clontech) usando Transit®-LT1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se incubaron durante 20 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después de la transfección, se retiró el medio de las células y se ensayó. Para las variantes de OgLuc, se ensayaron 50 µl de medio con 50 µl de reactivo de ensayo (descrito anteriormente; PBI-3939 40 µM). Para la luciferasa de *Metridia*, el medio se ensayó usando el Sistema de de indicador de luciferasa secretado Ready-to-Glo™ (Clontech) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, se añadieron 5 µl de 1 x tampón de sustrato/reacción a 50 µl de la muestra de medio. A continuación, se midió la luminiscencia como se ha descrito anteriormente (FIG. 65A-B).

15 Ejemplo 43 - Evaluación de variantes de OgLuc y nueva coelenterazina en células vivas

A. Se examinó el uso de variantes de OgLuc y PBI-3939 en células vivas. Se sembraron células HEK293 en placas de 96 pocillos a 15.000 células/pocillo y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, las células fueron transfectadas transitoriamente usando Transit®-LT1 en 3 duplicados con 100 ng de hRL o 9B8 opt en pF4Ag, y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se retiró el medio de crecimiento y se reemplazó por medio que contenía sustrato de células vivas VIVIREN™ 60 µM (Promega Corp.), sustrato de células vivas ENDUREN™ 60 µM (Promega Corp.) o PBI-3939 60 µM para células transfectadas tanto con hRL como 9B8 opt. Se usaron células no transfectadas como control de fondo. La placa se incubó a 37 °C en el transcurso de un día y se midió periódicamente en un luminómetro TECAN® GENIOS™ Pro, es decir, 11 veces en el transcurso de 24 horas. Las FIG. 66A-B muestran la luminiscencia de las células transfectadas dividida entre la luminiscencia de las células no transfectadas para cada uno de los sustratos, es decir, la proporción de la señal con respecto al fondo. Los datos muestran que 9B8 opt generó luminiscencia en un entorno de células vivas (es decir, no de lisis) mediante la incubación de las células con VIVIREN™, ENDUREN™ o PBI-3939. Los datos también demostraron que PBI-3939 puede penetrar en las células en cultivo, reaccionar con la variante de OgLuc y generar luminiscencia, por lo que es compatible con el uso en un ensayo de células vivas.

B. Para demostrar el análisis de células vivas usando las variantes de OgLuc, se fusionó L27V a HALOTAG®, y se expresó y controló en células vivas. Se sembraron células U2OS a 40.000 células/ml en los pocillos de la cámara fotográfica y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células se transfectaron usando FUGENE® HD de acuerdo con el protocolo del fabricante con los plásmidos pFC14K, pFN21K o pF4Ag (todos de Promega Corp.) que contenían L27V o pF4Ag que contenía L27V con la secuencia de secreción de IL-6 o natural. Las células se incubaron luego durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Tras la incubación, las células se expusieron a ligando de TMR HALOTAG® (Promega Corp.), se fotografiaron y se fijaron. A continuación, se realizó la inmunocitoquímica (ICC) de acuerdo con el protocolo de ICC de la tecnología HALOTAG®: "Focus on Imaging technical manual" (Promega Corp.; TM260). El anticuerpo principal usado fue un anticuerpo policlonal de conejo anti-OgLuc 9B8 (1:1.000). El anticuerpo secundario usado fue un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde) (FIG. 67A). La FIG. 67A muestra el canal verde fluorescente y la FIG. 67B muestra el contraste de interferencia diferencial (DIC). Las imágenes se adquirieron usando un microscopio confocal FV500 Fluoview Olympus (Olympus, EE.UU.) dotado de cámara ambiental a 37 °C + CO₂ (Solent Scientific Ltd., RU).

La FIG. 67B-D muestran las imágenes de CCI con secuencia de secreción natural o de IL-6. Ambas secuencias señal disminuyen drásticamente la cantidad de enzima en el núcleo. La naturaleza puntiforme del marcaje en el citoplasma es indicativa de la formación de vesículas que se espera que ocurra durante el proceso de secreción. Los datos demuestran que la presencia de un péptido señal reduce la cantidad de luciferasa en el núcleo.

C. Como se muestra anteriormente, las variantes de OgLuc y los nuevos sustratos de la presente divulgación son biocompatibles. Se prevé un sistema indicador en el que la variante de OgLuc se clona en un vector de expresión con un promotor de interés y se expresa en las células como una proteína indicadora. Las células se tratan luego con PBI-3939 que penetrará en las células en cultivo, reaccionando con la variante de OgLuc y generando luminiscencia.

Además de penetrar en las células, PBI-3939 muestra biocompatibilidad comparable a la coelenterazina natural en términos de viabilidad celular. Es posible sintetizar una versión del compuesto 3939 que contenga modificaciones químicas conocidas para aumentar la estabilidad de la coelenterazina natural en el medio y usarse para ensayos

más fiables de indicadores basados en variantes de OgLuc en células vivas. Otro ejemplo de indicadores en células vivas incluye el uso de una variante de OgLuc secretable como indicador. Se puede fusionar péptido señal de secreción natural (u otros péptidos señal de secreción conocidos) en el extremo N-terminal de una variante de OgLuc de modo que cuando la fusión se exprese en células de mamífero, una parte de ella será secretada a través de la membrana celular al medio de cultivo. Tras la adición de sustrato, se genera luminiscencia.

Ejemplo 44 - Indicadores de fusión de proteínas

Las variantes de OgLuc descritas en el presente documento se pueden usar como marcadores de fusión para una proteína diana de interés como una forma de controlar los niveles intracelulares de dicha proteína diana. Las proteínas específicas que participan en las vías de respuesta al estrés, por ejemplo, daño en el ADN, estrés oxidativo, inflamación, se pueden controlar en las células como una forma de probar el papel que diversos tipos de estímulos pueden desempeñar en estas vías. Las variantes también pueden usarse como un medio para controlar el tráfico celular de una proteína diana. Las variantes también pueden fusionarse con genomas virales (por ejemplo, VIH, VHC), de modo que se puedan controlar los niveles de títulos, es decir, la infectividad, en las células después del tratamiento con posibles agentes antivirales. Las variantes también se pueden fusionar a la proteína verde fluorescente (GFP) o HALOTAG® (además de una proteína diana) de forma que se podría usar la FACS para identificar clones de alta expresión y proporcionar información de localización.

Ejemplo 45 - Evaluación de la variante de OgLuc en proteína de fusión de tres componentes ("sándwich")

Las proteínas de fusión de 3 componentes, o de tipo "sándwich", se pueden usar para acercar proteínas bioluminiscentes y fluorescentes entre sí con el fin de optimizar un biosensor basado en BRET.

A. C1+4AE, IV, 9B8 y 9F6

Se clonaron las variantes de OgLuc C1+4AE (SEQ ID NO: 55 y 56), IV (SEQ ID NO: 57 y 58), 9B8 (SEQ ID NO: 61 y 62) y 9F6 (SEQ ID NO: 63 y 64) y hRL (SEQ ID NO: 32 y 33) en un vector de fusión pF4Ag con un Id N-terminal (Benezra *et al*, *Cell*, 61(1): 49-59 (1990)), conocido por ser un mal compañero de fusión, y HT7 C-terminal, que se usó para la normalización. El gen de interés se colocó como en un "sándwich" entre Id y HT7, es decir, Id-luciferasa-HT7. Se prepararon lisados de *E. coli*, que contenían las construcciones de variantes en pF4Ag o fondo tipo sándwich de pF4Ag, como se describe en el Ejemplo 26, y luego se ensayaron con coelenterazina natural 20 µM en el tampón descrito en el Ejemplo 25.

La FIG. 68 muestra la luminiscencia para cada variante bien en pF4Ag o en el fondo de sándwich de pF4Ag ("Sand"). La FIG. 69 muestra las veces de reducción de la luminiscencia debidas a la presencia de Id y HT7, y determinadas dividiendo la luminiscencia de la variante en pF4Ag entre la luminiscencia de la variante en el sándwich de pF4Ag. Las muestras con los valores mayores mostraron la mayor sensibilidad al mal compañero de fusión Id. La variante 9B8 fue la más brillante en el contexto del sándwich.

B. 9B8 OPT Y 9B8 OPT+K33N

Las variantes 9B8 opt y 9B8 opt+K33N se analizaron en un fondo de sándwich como se ha descrito anteriormente. Se generaron, como se ha descrito anteriormente, construcciones DE sándwich para 9B8 opt (SEQ ID NO: 40 y 41) y 9B8 opt+K33N (SEQ ID NO: 59 y 60). Se ensayaron lisados de *E. coli* y se midieron usando el mismo tampón de ensayo y luminómetro que se usaron para la generación de la FIG. 40. La FIG. 70 muestra las veces de reducción en presencia de un fondo de sándwich que indica que 9B8 opt+K33N es menos sensible a la mala pareja de fusión Id que 9B8 opt.

C. 23D2 y 24C2

Se subclonaron las variantes 23D4 (NF) y 24C2 (NF) en el fondo de sándwich de Id-OgLuc-HT7 y se ensayaron en *E. coli*. Se compararon las variantes de sándwich, 23D4 (F) (SEQ ID NO: 76 y 77) y 24C2 (F) (SEQ ID NO: 78 y 79) con 9B8 opt+K33N en el fondo de sándwich (SEQ ID NO: 59 y 60). La Tabla 35 muestra que las variantes tenían al menos la misma luminiscencia que 9B8 opt+K33N en el contexto del fondo de sándwich.

Tabla 35: Aumento de la luminiscencia generada por variantes de OgLuc en comparación con 9B8 opt+K33N+170G en el fondo de sándwich

Muestra	Secuencia	Veces frente al sándwich de 9B8 opt+K33N (<i>E. coli</i>)
23D4 (F)	G26G, M106L, R112R, 170G	1,0
24C2 (F)	R11Q, T39T, 170G	1,0

D. 1F7 y 15H1

Se exploró la biblioteca de PCR en el fondo de sándwich de Id-OgLuc-HT7 en busca de variantes adicionales con

aumento de la luminiscencia en comparación con 9B8 opt+K33N en el fondo de sándwich. Las variantes seleccionadas se ensayaron luego en células HEK293 y NIH3T3. La Tabla 36 muestra las veces de aumento de la luminiscencia de las variantes de sándwich en células de *E. coli*, HEK293 y NIH3T3, y las sustituciones de aminoácidos que se encuentran en las variantes. 1F7 (F) (SEQ ID NO: 84 y 85) y 15H1 (F) (SEQ ID NO: 86 y 87) resultaron tener al menos un aumento de 1,3 veces de la luminiscencia en *E. coli*. 1F7 (F) fue más brillante que 9B8 opt+K33N en el fondo de sándwich en células HEK293 y NIH3T3.

Tabla 36: Aumento de la luminiscencia generada por variantes de Ogluc en comparación con 9B8 opt+K33N en fondo de sándwich

Muestra	Secuencia	Veces frente a sándwich de 9B8 opt+K33N		
		<i>E. coli</i>	HEK293	NIH3T3
1F7 (F)	K43R, Y68D	1,9	2,4	1,4
15H1 (F)	D19D, S66N	1,5	0,9	1,2

Se subclonaron las variantes de sándwich en el vector de fondo de no fusión basado en pF4Ag para generar 1F7 (NF) (SEQ ID NO: 80 y 81) y 15H1 (NF) (SEQ ID NO: 82 y 83), y se analizaron como se ha descrito anteriormente y en comparación con 9B8 opt+K33N. La Tabla 37 muestra las veces de aumento de la luminiscencia de las variantes en células de *E. coli*, HEK293 y NIH3T3. 1F7 (NF) y 15H1 (F) resultaron tener un aumento de al menos 1,3 veces de la luminiscencia en células de *E. coli* y HEK293.

Tabla 37: Aumento de la luminiscencia generada por variantes de Ogluc en comparación con 9B8 opt+K33N+170G

Muestra	Secuencia	Veces frente a 9B8 opt+K33N + 170G		
		<i>E. coli</i>	HEK293	NIH3T3
1F7 (NF)	K43R, Y68D	1,5	1,5	1,1
15H1 (NF)	D19D, S66N	1,7	1,7	1,2

E. V2, 9B8 opt+K33N+L27V+K43R+Y68D, 9B8 opt+K33N+L27V+T39T+K43R+S66N y L27V

Se subclonaron las variantes 9B8 opt+K33N+T39T+K43R+Y68D ("V2"; SEQ ID NO: 92 y 93), 9B8 opt+K33N+L27V+K43R+Y68D (SEQ ID NO: 339 y 340), 9B8 opt+K33N+L27V+T39T+K43R+S66N (SEQ ID NO: 341 y 342) y 9B8 opt+K33N+L27V+T39T+K43R+Y68D ("L27V"; SEQ ID NO: 88 y 89) en el fondo de sándwich de Id-Ogluc-HT7 como se ha descrito anteriormente, y se ensayaron en células HEK293 y NIH3T3 como se ha descrito anteriormente. La luminiscencia generada por las variantes tipo sándwich se comparó con la luminiscencia generada por el sándwich de 9B9 opt+K33N (SEQ ID NO: 59 y 60) (Tabla 38). El sándwich de L27V (SEQ ID NO: 90 y 91) y el sándwich de V2 (SEQ ID NO: 94 y 95) resultaron tener un aumento de al menos 1,3 veces de la luminiscencia en células HEK293 y NIH3T3.

Tabla 38: Aumento de la luminiscencia generada por variantes de Ogluc en el fondo de sándwich en comparación con 9B8 opt+K33N en el fondo de sándwich

Muestra	Células NIH 3T3	HEK 293
K33N Sand	1,0	1,0
T39T, K43R, Y68D Sand	1,6	2,3
L27V, K43R, Y68D Sand	1,4	1,7
L27V, T39T, K43R, S66N Sand	0,7	0,7
L27V, T39T, K43R, Y68D Sand	1,4	1,7

Se ensayaron las versiones de sándwich y no sándwich de las variantes V2, 9B8 opt+K33N+L27V+K43R+Y68D, 9B8 opt +K33N+L27V+T39T+K43R+S66N y L27V en células HEK293 y NIH3T3 como se describe en el Ejemplo 37. Se comparó la luminiscencia generada por las variantes no intercaladas con la luminiscencia generada por las variantes intercaladas (Tabla 39). Los datos mostrados en la Tabla 39 indican que las veces de reducción de la luminiscencia para el sándwich de 9B8 opt+K33N fueron menores en las células de mamíferos que en las células de *E. coli* como se muestra en la FIG. 70.

Tabla 39: Veces de reducción de la luminiscencia de las variantes de Ogluc en presencia de fondo de sándwich

Muestra	Células NIH 3T3	HEK 293
K33N	29	15
T39T, K43R, Y68D	20	6
L27V, K43R, Y68D	22	8
L27V, T39T, K43R, S66N	25	12

L27V, T39T, K43R, Y68D	18	6
------------------------	----	---

Ejemplo 46-Multiplexación

5 A. Se prepararon lisados de *E. coli* que expresaban la variante 9B8 opt como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 27 y se diluyeron 1.000 veces en DMEM sin rojo fenol + PRIONEX® al 0,1 %. La luminiscencia de una muestra que contenía 6,3 µg/ml de luciferasa de escarabajo de resorte rojo purificada y lisado de *E. coli* que expresaba la variante 9B8 opt se detectó mediante un sistema de ensayo de luciferasa DUAL-GLO® modificado (Promega Corp.). Se usaron reactivo DUAL-GLO® STOP&GLO® que contenía coelenterazina-h 20 µM y reactivo DUAL-GLO® STOP&GLO® que contenía PBI 3939 20 µM, de acuerdo con el protocolo del fabricante, para detectar la luciferasa de escarabajo de resorte rojo y la variante de Ogluc luciferasa 9B8 a partir de una sola muestra. Se realizaron tres repeticiones.

15 La luminiscencia se detectó en un luminómetro TurnerMODULUS™. La Tabla 40 muestra la luminiscencia media generada por la luciferasa de escarabajo de resorte rojo ("escarabajo de resorte") y la luminiscencia generada por 9B8 opt ("Ogluc") con coelenterazina-h ("coel h") o PBI-3939 ("3939"). También se muestran la desviación estándar ("+-") y el coeficiente de variación ("CV"). Se realizó un control de "sin coelenterazina" para ilustrar la cantidad de inactivación de la señal del escarabajo rojo de resorte por el reactivo DUAL-GLO® STOP & GLO® del sistema de ensayo de luciferasa DUAL-GLO® en ausencia de coelenterazina. El control "sin coelenterazina" produjo una inactivación de 349 veces. La Tabla 40 muestra que las grandes señales luminiscentes, tanto del escarabajo rojo de resorte como de la variante de Ogluc 9B8 se detectaron en una sola muestra. Esto demuestra que cada señal se puede leer secuencialmente en un ensayo de dos etapas, y que la señal de la primera enzima se puede inactivar lo suficiente como para no contribuir significativamente a la señal de la segunda enzima.

Tabla 40: Luminiscencia media generada por las luciferasas de escarabajo rojo de resorte y de 9B8 opt usando un ensayo de indicador DUAL-LUCIFERASE™ modificado

	Escarabajo de resorte	+/-	CV	Ogluc	+/-	CV	Veces de inactivación	+/- coel
sin coel	5.061.163	147.145	2,9 %	14,504	214	1,5 %	349	
coel h	5.032.100	152.254	3,0 %	921,440	47,623	6,2 %		64
3339	5.078.647	41.753	0,8 %	2.996.940	187.300	6,2 %		207

30 B. Para demostrar que el ensayo de indicador de multiplexación descrito anteriormente se podría hacer a la inversa, es decir, detectarse primero la luminiscencia de Ogluc, inactivarse y detectarse una segunda luminiscencia, por ejemplo, luciferasa de escarabajo rojo de resorte o de luciérnaga, se exploraron diversos inhibidores de la luciferasa de *Renilla* (véase el documento la solicitud publicada de EE.UU. n.º 2008/0248511) para determinar su capacidad para inhibir también a Ogluc. Se añadieron dos inhibidores de *Renilla* diferentes, previamente identificados, PBI-3077 y 1424, a diversas concentraciones (véase la Tabla 41) a las muestras de lisado de *E. coli* que expresaban la variante 9B8 (diluida como antes) y un tampón que contenía MES 100 mM, pH 6,0, CDTA 1 mM, KCl 150 mM, tiourea 35 mM, DTT 2 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,25 % (v/v), MAZU® DF 204 al 0,025 % y PBI-3939 20 µM. Se midió la luminiscencia como se ha descrito anteriormente, a excepción de que la luminiscencia se midió usando el luminómetro de microplacas GLOMAX®-Multi (Promega Corp.; también conocido como Turner MODULUS™). Como se muestra en la Tabla 41, ambos compuestos fueron capaces de inhibir la luminiscencia de Ogluc. Esto demuestra que se puede multiplexar una variante de Ogluc en un ensayo de indicador con otra luciferasa, en el que la luminiscencia de una variante de Ogluc se detecta primero en el ensayo de indicador.

Tabla 41: Efecto de PBI-3077 y PBI-1424 sobre la luminiscencia generada por lisados bacterianos que expresan 9B8 opt usando PBI-3939 como sustrato

	(mM o %)	URL	+/-	%
	Control	27.794.600	626.862	100 %
AI(3077)	3	15.473.100	209.567	56 %
mM	0,3	22.210.433	102.888	80 %
	0,03	22.484.933	927.459	81 %
AC(1424)	0,4	176.868	9.579	0.64 %
%	0,04	24.267.533	363.861	87 %
	0,004	25.126.900	1.569.453	90 %

45 C. Se analizó la resolución espectral entre la variante de Ogluc L27V y la luciferasa de luciérnaga (Flue). Se mezcló L27V purificada (descrita anteriormente; 9,54 pM) en DMEM sin rojo fenol + PRIONEX® al 0,1 % con reactivo de ensayo (descrito anteriormente) que contenía PBI-3939 20 µM. Se mezcló la enzima luciferasa de luciérnaga purificada (luciferasa recombinante QUANTILUM®, Promega Corp.; 271 ng/ml) en el mismo medio con un reactivo de ensayo (HEPES 100 mM, pH 7,4, CDTA 1 mM, MgSO₄ 16 mM, TERGITOL® NP-9 al 1 % (v/v), MAZU® DF 204 al 0,1 %, ATP 5 mM, DTT 50 mM, luciferina 333 µM). La luciferasa de *Renilla* purificada (5 ng/ml de GST-*Renilla*) en 1 x tampón de lisis de ensayo de luciferasa de *Renilla* (Promega Corp.) se mezcló con coelenterazina natural 10,5 µM

en tampón de ensayo de luciferasa de *Renilla*. La luminiscencia se midió después de 3 min para L27V y Flue, y después de 10 min para la luciferasa de *Renilla* (FIG. 71)

5 D. Como otro ejemplo, se podría usar una variante de OgLuc de la presente divulgación como indicador de la transcripción y emparejarlo bien con aequorina o con un biosensor de luciferasa de luciérnaga permutada circularmente con cAMP (o ambos al mismo tiempo) para detectar múltiples vías en una sola muestra, por ejemplo, aequorina para la detección y/o medición del calcio, el biosensor para la detección y/o medición de AMPc, y una variante de OgLuc para el control de la expresión génica cadena abajo.

10 E. Otros ejemplos de multiplexación con las variantes de OgLuc desveladas en el presente documento incluyen:

15 i) Transfectar células con construcciones que contengan una variante de OgLuc de la presente divulgación y luciferasa de luciérnaga. Tras la transfección, se podría añadir un primer reactivo para lisar las células, así como proporcionar el sustrato para generar luminiscencia para la primera luciferasa. Entonces, se mediría la luminiscencia de la primera luciferasa. A continuación, se añadiría un segundo reactivo para apagar la luminiscencia de la primera luciferasa, así como para proporcionar el sustrato para generar luminiscencia para la segunda luciferasa. Entonces, se mediría la luminiscencia de la segunda luciferasa. La elección de qué luciferasa medir primero solo dependería de la capacidad para apagar la luminiscencia de la primera luciferasa con el segundo reactivo. Para este ejemplo, la luminiscencia de la variante de OgLuc se podría medir primero, pues se ha observado que las altas concentraciones de luciferina (sustrato para la luciferasa de luciérnaga) inhiben la actividad de la variante de OgLuc.

25 ii) Transfectar células con construcciones que contengan una variante de OgLuc descrita en el presente documento y luciferasa de luciérnaga. Tras la transfección, se podría añadir un primer reactivo que contuviera un sustrato de células vivas para generar luminiscencia para la primera luciferasa. Entonces, se mediría la luminiscencia de la primera luciferasa. A continuación, se añadiría un segundo reactivo para lisar las células, apagar la luminiscencia de la primera luciferasa y proporcionar el sustrato para generar luminiscencia para la segunda luciferasa. Entonces, se mediría la luminiscencia de la segunda luciferasa. Esto es similar a i), a excepción de que la lisis celular limitará aún más el uso del sustrato de células vivas y contribuirá a apagar la luminiscencia de la primera luciferasa.

35 iii) Transfectar células con construcciones que contengan una variante de OgLuc de la presente divulgación y luciferasa de luciérnaga. Tras la transfección, se podría añadir un reactivo que contuviera sustratos para generar luminiscencia de ambas luciferasas, pero la luminiscencia de cada luciferasa es espectralmente diferente. El máximo de emisión de la variantes de OgLuc es de aproximadamente 460 nm, y ciertos sustratos para la luciferasa de luciérnaga, por ejemplo, 5'-cloro-luciferina y 5'-metil-luciferina, pueden producir un máximo de emisión de aproximadamente 610 nm. Por lo tanto, aunque puede haber cierto solapamiento de la emisión de color azul en la emisión de color rojo, no habría solapamiento de la emisión de color rojo en la emisión de color azul, lo que sugiere que habría poca o ninguna corrección matemática.

40 iv) Transfectar células con construcciones que contengan una variante de OgLuc descrita en el presente documento y luciferasa de luciérnaga. Tras la transfección, se podría añadir un reactivo que contuviera sustratos de células vivas para generar luminiscencia de ambas luciferasas. La característica única de este ejemplo es que la luminiscencia de luciérnaga tiende a cambiar al color rojo a las temperaturas de ensayo de células vivas, por ejemplo, 37 °C, por lo tanto, se podría seleccionar una serie de diferentes derivados de luciferina como un sustrato de células vivas para la luciferasa de luciérnaga para generar luminiscencia que fuera espectralmente distinta de la de la variante de OgLuc.

50 v) Transfectar células con construcciones que contengan una variante de OgLuc descrita en el presente documento y luciferasa de *Renilla*. Tras la transfección, se podría añadir un primer reactivo para lisar las células, así como proporcionar el sustrato para generar luminiscencia para la primera luciferasa. Entonces, se mediría la luminiscencia de la primera luciferasa. A continuación, se añadiría un segundo reactivo para apagar la luminiscencia de la primera luciferasa, así como para proporcionar el sustrato para generar luminiscencia para la segunda luciferasa. Entonces, se mediría la luminiscencia de la segunda luciferasa. La elección de qué luciferasa medir primero solo dependería de la capacidad para apagar la luminiscencia de la primera luciferasa con el segundo reactivo. Para este ejemplo, habría que usar inhibidores para apagar la luminiscencia bien de la variante de OgLuc o de la luciferasa de *Renilla*.

60 vi) Transfectar células con construcciones que contengan una variante de OgLuc de la presente divulgación y luciferasa de escarabajo de resorte. Tras la transfección, se podría añadir un primer reactivo que contuviera sustratos para generar luminiscencia de ambas luciferasas, pero la luminiscencia de cada luciferasa es espectralmente diferente, pues la luciferasa de escarabajo de resorte genera luminiscencia virada al rojo con la luciferina natural.

65 **Ejemplo 47 - Permutación circular**

Se prepararon dos versiones permutadas circularmente (CP) de la variante L27V: CP84 y CP95. La designación numérica se refiere al resto N-terminal (por ejemplo, "84" indica el nuevo extremo N-terminal de la versión CP).

Para crear las permutaciones circulares, se fusionan entre sí los anteriores extremos N- y C-terminales sin enlazador ("CP84 sin enlazador" (SEQ ID NO: 97 y 98) y "CP95 sin enlazador" (SEQ ID NO: 105 y 106)) o con un enlazador de 5 aminoácidos ("CP84 con enlazador de 5 aa" (SEQ ID NO: 99 y 100) y "CP95 con enlazador de 5 aa" (SEQ ID NO: 107 y 108), de 10 aminoácidos ("CP84 con enlazador de 10 aa" (SEQ ID NO: 101 y 102) y "CP95 con enlazador de 10 aa" (SEQ ID NO: 109 y 110) o de 20 aminoácidos ("CP84 con enlazador de 20 aa" (SEQ ID NO: 103 y 104) y "CP95 con enlazador de 20 aa" (SEQ ID NO: 111 y 112)), (GSSGG)_n (SEQ ID NO: 113) entre los extremos N- y C-terminales. (Nota: L27V comienza con la fenilalanina en el extremo N-terminal, es decir, MVF. "MV" está presente en la construcción "sin enlazador", pero no en las construcciones "con enlazador"). Una vez permutadas circularmente, las variantes L27V CP se clonaron en el vector pFIK. Se transformaron células de *E. coli* con los vectores de CP y se cultivaron en medio mínimo usando el protocolo de inducción guiada convencional descrito anteriormente. Para cada construcción de CP, las células se cultivaron en 8 pocillos de una placa de 96 pocillos. Después de la inducción, se agruparon los 8 pocillos de cada muestra y se lisaron 10 µl en 40 µl de tampón de lisis (MES 100 mM, pH 6,0, 0,3 x PLB, 0,3 mg/ml de lisozima, 0,003 u/µl de DNasa I y TERGITOL® NP-9 al 0,25 % (v/v)). Los lisados se diluyeron después a 1:100 (versiones CP con enlazador) o 1:1.000 (versiones no CP) en tampón de lisis. La versión CP sin enlazador no se diluyó. Los lisados o diluciones de lisado se ensayaron por triplicado en 50 µl de reactivo de ensayo (descrito anteriormente). La luminiscencia se midió como se ha descrito anteriormente (FIG. 72).

Ejemplo 48 - Identificación de sitios adicionales para la permutación circular

Para identificar sitios de CP adicionales, determinar el impacto de los sitios CP sobre la actividad de la luciferasa e investigar el uso de un "anclaje" entre los fragmentos, se crearon construcciones de CP con una permutación circular realizada aproximadamente cada tercer sitio (es decir, aminoácido) de la variante L27V (véase la FIG. 73E). Un experto en la materia entendería que otros sitios, por ejemplo, el primer y segundo sitio, también se podrían ensayar y usar de las variantes de OgLuc con permutación circular descritas en el presente documento usando los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la variante L27V ha resultado ser particularmente tolerante a la permutación circular, en particular, en situaciones en las que se coloca en un dominio de unión relativamente grande entre los fragmentos permutados (por ejemplo, sensores basados en cAMP/RilbB). En cada sitio, se añadió el enlazador GSSGG-GSSGG-EPTT-ENLYFQS-DN-GSSGG-GSSGG (SEQ ID NO: 328). La secuencia subrayada se refiere a un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV. El propósito del enlazador es proporcionar un anclaje lo suficientemente largo entre los dos fragmentos de variantes, para que se puedan asociar de una manera que produzca una enzima luciferasa funcional. El sitio de reconocimiento de proteasa TEV se usó para proporcionar un medio para interrumpir el anclaje (en presencia de la proteasa TEV) de modo que se podría estudiar su importancia para el mantenimiento de la actividad. El uso del sitio de reconocimiento de la proteasa TEV creó un modo de predecir qué sitios CP serían útiles para los ensayos de complementación de proteínas (PCA) o para aplicaciones de biosensores (por ejemplo, la inserción de un elemento de respuesta entre los sitios CP).

La actividad que se observa antes de la escisión de TEV representa cómo se comportan las dos mitades de la variante enzimática en un estado de anclaje. La unión de TEV al sitio de reconocimiento provoca la escisión, separando de este modo las dos mitades de la variante enzimática. Las muestras que se han escindido con TEV representarían el estado no inducido, y proporcionan una indicación de cuánto fondo se podría esperar. La menor actividad tras la escisión de TEV indica que las dos mitades no pueden unirse sin inducción. Las muestras que presentan una gran pérdida de actividad tras la escisión de TEV indican sitios que podrían funcionar en aplicaciones de PCA y biosensores. En el caso de PCA, las dos mitades de la variante enzimática se fusionarían con parejas de unión que fueran capaces de unirse (anclarse) tras la unión inducida. En el caso de un biosensor, las dos mitades se "anclarían" después de un cambio de configuración inducido por la unión. Un ejemplo de PCA sería fusionar una mitad de L27V con FRB y la otra mitad, con FKBP. Las dos mitades se aproximarían con la exposición a la rapamicina (Banaszynski *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **127(13)**: 4715-4721 (2005)). Un ejemplo de una aplicación de biosensor sería insertar un dominio de unión de AMP cíclico (por ejemplo, RilbB) entre los sitios de CP e inducir un cambio de configuración mediante la unión de AMP cíclico al dominio de unión.

Una vez creada cada construcción de L27V CP, la enzima CP se expresó en germen de trigo, células de *E. coli* y de mamífero, y se digirió con proteasa TEV para investigar la actividad de la luciferasa.

1. Para el análisis en germen de trigo, se expresaron las construcciones de CP usando el sistema de extracto de germen de trigo acoplado a T7 TNT® (Promega Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de TNT® se diluyeron a 1:100 en 1 x PBS + gelatina al 0,1 %, y se añadieron 20 µl a 25 µl de reactivo reacción de TEV (5 µl de 20 x tampón ProTEV (Promega Corp.), 1 µl de DTT 100 mM y 2 µl de 10 U de ProTEV Plus (Promega Corp.)). Se llevó el volumen de las reacciones de digestión hasta 100 µl con agua y se incubó a 30 °C durante 60 min. También se prepararon muestras de control sin la proteasa TEV. Entonces, se añadieron 10 µl de las muestras digeridas a 40 µl de DMEM hasta un volumen final de 50 µl, y se ensayaron en 50 µl de reactivo de ensayo (como se ha descrito anteriormente; PBI-3939 100 µM). La luminiscencia se midió como se ha descrito previamente (FIG. 73A-D).

2. Para el análisis en células de mamífero, se transfectaron células HEK293 con las variantes L27V CP usando un protocolo de transfección inversa. En resumen, 1 ng de ADN de plásmido de L27V CP se mezcló con ADN portador 1 mg y se añade a las células en un pocillo de una placa de 12 pocillos. Las células se incubaron entonces durante 16 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Los lisados celulares se prepararon a continuación, eliminando el medio de las células, lavando en 1 x PBS y la adición de 1 ml de 1 x PLB. Los lisados se diluyeron 1:10 en 1 x PBS con 0,1 % de gelatina. A continuación, se usaron 40 µl del lisado diluido en una digestión de la proteasa TEV como se ha descrito anteriormente. 10 µl de la digestión se mezcló con 40 µl de DMEM sin rojo de fenol y 50 µl de reactivo de ensayo (descrito con anterioridad; 100 µM PBI-3939) añadió. La luminiscencia se midió como se ha descrito anteriormente (FIG. 73H).

3. Para el análisis en *E. coli*, se cultivaron cultivos de *E. coli* que expresaban las variantes L27V CP durante la noche a 30 °C. Estos cultivos se usaron (diluidos a 1:100 en LB + antibiótico) para preparar nuevos cultivos iniciadores para la inducción final. Los cultivos iniciadores se incubaron a 37 °C con agitación durante 2,5 horas (la DO₆₀₀ es de aproximadamente 0,5). Se añadió ramnosa (concentración final del 0,2 %), los cultivos se trasladaron a 25 °C y se incubaron con agitación durante 18 h.

Para crear lisados, se añadieron 50 µl de 0,5 x reactivo de lisis celular FASTBREAK™ (Promega Corp.) a 950 µl de cultivos inducidos y las mezclas se incubaron durante 30 min a 22 °C. A continuación, se digirieron 50 µl del cultivo lisado con proteasa TEV como se ha descrito anteriormente y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas.

Para el análisis, los lisados se diluyeron a 1:10.000 en tampón de purificación de mamífero HaloTag® (Promega Corp.) y se ensayaron 50 µl en 50 µl de reactivo de ensayo (como se ha descrito anteriormente; PBI-3939 100 µM). Se midieron la luminiscencia basal y la inducida por TEV en 5 puntos temporales min (FIG. 73 F) y la respuesta (FIG. 73G) se determinó como se ha descrito anteriormente.

Las FIG. 73A-D muestran la luminiscencia basal de varias construcciones de L27V CP-proteasa TEV expresadas en extracto de germen de trigo. La FIG. 73E resume las variantes CP derivadas que respondieron a la proteasa TEV (la respuesta es las veces de reducción), lo que indica que las variantes de PC se pueden usar como sensores de TEV, es decir, que son indicativas de la "dependencia del anclaje". Se validaron además variantes que mostraban un cambio de al menos 1,2 veces como la significación usando la prueba de Student (valores de *p* desapareados; nivel de confianza de 0,03). Estos resultados indican que cada variante CP es capaz de generar luminiscencia.

Se expresaron varias construcciones de L27V CP-proteasa TEV en células HEK293. Se usó el protocolo de transfección inversa, descrito anteriormente, para transfectar 1 ng de ADN/pocillo con 1 µg de ADN portador. Cada muestra de células se cultivó en 1 ml de medio en una placa de 12 pocillos. Los lisados celulares se prepararon retirando el medio y añadiendo 1 ml de 1 x PLB. Las muestras se diluyeron a 1:10 en 1 x PBS + gelatina al 0,1 %. Se prepararon 40 µl de la muestra de dilución para la digestión con TEV. Se añadieron 10 µl de la reacción de digestión a 40 µl de DMEM sin rojo de fenol y 50 µl de PBI-3939 como se ha descrito previamente. La FIG. 73H muestra la luminiscencia de las diversas construcciones de L27V CP-proteasa TEV expresadas en células HEK293.

Los datos de las FIG. 73A-H demuestran que la variante L27V se puede permutar circularmente en diversos sitios, y diferentes sitios tienen diferentes dependencias respecto a la longitud del anclaje. Los datos de las células de mamíferos y los datos del germen de trigo muestran un número de veces de reducción similar con la escisión de TEV. Las variantes L27V CP que son más dependientes del anclaje, es decir, que son más sensibles a la escisión de la proteasa TEV, son posibles candidatas para el PCA. Las variantes L27V CP que son menos dependientes del anclaje pueden ser posibles candidatas para los ensayos de auto-complementación/dimerización.

Ejemplo 49 - ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DE PROTEÍNAS

Los ensayos de complementación de proteínas (PCA) proporcionan un medio para detectar la interacción de dos biomoléculas, por ejemplo, polipéptidos. El PCA utiliza dos fragmentos de la misma proteína, por ejemplo, una enzima, que cuando se aproximan mucho entre sí pueden reconstituirse en una proteína funcional, activa. Una variante de OgLuc desvelada en el presente documento se puede separar en dos fragmentos por uno o varios sitios tolerantes a la separación. A continuación, cada fragmento de la variante de OgLuc separada puede fusionarse a uno de un par de polipéptidos de interés que se crea que interactúen, por ejemplo, FKBP y FRB. Si los dos polipéptidos de interés realmente interactúan, entonces, los fragmentos de OgLuc se aproximan mucho entre sí para reconstituir la variante de OgLuc activa, funcional. A continuación, se puede detectar la actividad de la variante de OgLuc reconstituida y medirse usando un coelenterazina natural o conocida, o una nueva coelenterazina de la presente divulgación. En otro ejemplo, la variante de OgLuc dividida se puede usar en un sistema de complementación más general similar a lac-Z (Langley *et al.*, PNAS, 72:1254-1257 (1975)) o ribonucleasa S (Levit y Berger, *J Biol. Chem.*, 251:1333-1339 (1976)). En concreto, un fragmento de variante de OgLuc (designado "A") conocido por complementarse con otro fragmento de variante de OgLuc ("B") se puede fusionar a una proteína diana, y la fusión resultante se puede controlar a través de la luminiscencia en una célula o un lisado celular que contenga el fragmento B. El origen del fragmento B podría ser la misma célula (ya sea en el cromosoma o en otro plásmido) o podría ser un lisado o una proteína purificada derivada de otra célula. Esta misma proteína de fusión (fragmento A) se podría capturar o inmovilizar usando una fusión entre el fragmento B y un polipéptido tal como

HALOTAG® capaz de unirse a un soporte sólido. La luminiscencia se puede usar entonces para demostrar la captura correcta o para cuantificar la cantidad de material capturado. Los métodos para la complementación de proteínas se pueden llevar a cabo de acuerdo con la solicitud publicada de EE.UU. n.º 2005/0153310.

1. Las construcciones 9B8 opt PCA se realizaron de la siguiente manera:

- 5
- p9B8PCA 1/4 = pF5A/Met-[9B8 opt (51-169)]-GGGGSGGGSS-FRB (SEQ ID NO: 331 y 332) y pF5A/FKBP-GGGSSGGGSG-[9B8opt (1-50)] (SEQ ID NO: 337 y 338).
 - 10 - p9B8PCA 1/2 = pF5A/Met-[9B8 opt (51-169)]-GGGGSGGGSS-FRB (SEQ ID NO: 331 y 332) y pF5A/[9B8 opt (1-50)]-GGGGSGGGSS-FRB(SEQ ID NO: 333 y 334).
 - p9B8PCA 2/3 = pF5A/[9B8 opt (1-50)]-GGGGSGGGSS-FRB (SEQ ID NO: 333 y 334) y pF5A/FKBP-GGGSS-GGGSG-[9B8opt (51-169)] (SEQ ID NO: 335 y 336).
 - 15 - p9B8PCA 3/4 = pF5A/FKBP-GGGSSGGGSG-[9B8 opt (51-169)] (SEQ ID NO: 335 y 336) y pF5A/FKBP-GGGSSGGGSG-[9B8opt (1-50)] (SEQ ID NO: 337 y 338).

20 Se transfectaron las construcciones PCA en células HEK293 (15.000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos usando FUGENE® HD de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se incubaron las células durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después de la transfección, se reemplazó el medio sobre las células por medio independiente del CO₂ con FBS al 10 %. Entonces, se añadió reactivo de ensayo con PBI-3939 20 µM, y se midió la luminiscencia en un Varioskan ultrarrápido a 28 °C. A continuación, se añadió rapamicina 100 µM a los pocillos, y se midió la luminiscencia de forma continua durante 1 h. Se calcularon las veces de respuesta dividiendo la luminiscencia de un pocillo dado entre la luminiscencia del tratamiento previo a la rapamicina para el mismo pocillo (FIG. 74).

25 2. Para demostrar el uso de las variantes de OgLuc en PCA, se complementaron los fragmentos de variantes L27V02A con FKBP o FRB, y se midió la interacción entre FKBP y FRB.

La Tabla 42 enumera las diversas construcciones de complementación de proteínas (PCA) preparadas y ensayadas. "2/3" designa los pares de complementación de variantes, en los que 1) el extremo C-terminal "antiguo" de L27V02A ("antiguo" = extremo C-terminal original de L27V02A) es la pareja C-terminal de FKBP; y 2) el extremo N-terminal "antiguo" de L27V02A es la pareja N-terminal de FRB. "1/4" designa los pares de variantes, en los que 1) el extremo N-terminal "antiguo" de L27V02A es la pareja C-terminal de FKBP; y 2) el extremo C-terminal "antiguo" de L27V02A es la pareja N-terminal de FRB. Para todas las construcciones, FKBP se encuentra en el extremo N-terminal del fragmento de L27V02A, y FRB se encuentra en el extremo C-terminal del fragmento de L27V02A. Por ejemplo, se crearon construcciones de PCA con sitios de división en la posición 157 (véase la Tabla 42, "2/3" y "1/4" n.º 9 y 10 (SEQ ID NO: 296-303)) y 84 (véase la Tabla 42, "2/3" y "1/4" n.º 7 y 8 (SEQ ID NO: 304-315)). Se crearon otras construcciones PCA (SEQ ID NO: 343-426 y 428-440) (Véase la Tabla 21).

Tabla 42

	"2/3"		"1/4"
1.	FKBP-L27V 6-169	1.	FKBP-L27V 1-5
2.	L27V 1-5-FRB	2.	L27V 6-169-FRB
3.	FKBP-L27V 12-169	3.	FKBP-L27V 1-11
4.	L27V 1-11-FRF	4.	L27V 12-169-FRB
5.	FKBP-L27V 55-169	5.	FKBP-L27V 1-54
6.	L27V 1-54-FRB	6.	L27V 55-169-FRB
7.	FKBP-L27V 84-169	7.	FKBP-L27V 1-83
8.	L27V 1-83-FRB	8.	L27V 84-169-FRB
9.	FKBP-L27V 103-169	9.	FKBP-L27V 1-102
10.	L27V 1-102-FRB	10.	L27V 103-169-FRB
11.	FKBP-L27V 157-169	11.	FKBP-L27V 1-156
12.	L27V 1-156-FRB	12.	L27V 157-169-FRB
	"2/3"		"1/4"
1.	FKBP-L27V 6-169	1.	FKBP-L27V 1-5
2.	L27V 1-5-FRB	2.	L27V 6-169-FRB
3.	FKBP-L27V 12-169	3.	FKBP-L27V 1-1 1
4.	L27V 1-11-FRB	4.	L27V 12-169-FRB
5.	FKBP-L27V 55-169	5.	FKBP-L27V 1-54
6.	L27V 1-54-FRB	6.	L27V 55-169-FRB
7.	FKBP-L27V 84-169	7.	FKBP-L27V 1-83
8.	L27V 1-83-FRB	8.	L27V 84-169-FRB
9.	FKBP-L27V 103-169	9.	FKBP-L27V 1-102
10.	L27V 1-102-FRB	10.	L27V 103-169-FRB
11.	FKBP-L27V 157-169	11.	FKBP-L27V 1-156
12.	L27V 1-156-FRB	12.	L27V 157-169-FRB

Tabla 21

Construcciones pCA
SEQ ID NO:343 (pCA 31 pCA L27V02A 45-169 FRB)
SEQ ID NO:344 (pCA 31 pCA L27V02A 45-169 FRB)
SEQ ID NO:345 (pCA 32 FKBP L27V02A 1-44)
SEQ ID NO:346 (pCA 32 FKBP L27V02A 1-44)
SEQ ID NO:347 (pCA 33 pCA L27V02A 46-169 FRB)
SEQ ID NO:348 (pCA 33 pCA L27V02A 46-169 FRB)
SEQ ID NO:349 (pCA 34 pCA FKBP 1-45 L27V02A)
SEQ ID NO:350 (pCA 34 pCA FKBP 1-45 L27V02A)
SEQ ID NO:351 (pCA 35 pCAL27V02A 100-169 FRB)
SEQ ID NO:352 (pCA 35 pCAL27V02A 100-169 FRB)
SEQ ID NO:353 (pCA 36 FKBP L27V02A 1-99)
SEQ ID NO:354 (pCA 36 FKBP L27V02A 1-99)
SEQ ID NO:355 (pCA 37 L27V02A 101-169 FRB)
SEQ ID NO:356 (pCA 37 L27V02A 101-169 FRB)
SEQ ID NO:357 (pCA 38 FKBP 1-100 L27V02A)
SEQ ID NO:358 (pCA 38 FKBP 1-100 L27V02A)
SEQ ID NO:359 (pCA 39 L27V02A 102-169 FRB)
SEQ ID NO:360 (pCA 39 L27V02A 102-169 FRB)
SEQ ID NO:361 (pCA 40 FKBP L27V02A 1-101)
SEQ ID NO:362 (pCA 40 FKBP L27V02A 1-101)
SEQ ID NO:363 (pCA 41 L27V02A 143-169 FRB)
SEQ ID NO:364 (pCA 41 L27V02A 143-169 FRB)
SEQ ID NO:365 (pCA 42 FKBP 1-142 L27V02A)
SEQ ID NO:366 (pCA 42 FKBP 1-142 L27V02A)
SEQ ID NO:367 (pCA 43 L27V02A 145-169 FRB)
SEQ ID NO:368 (pCA 43 L27V02A 145-169 FRB)
SEQ ID NO:369 (pCA 44 FKBP 1-144 L27V02A)
SEQ ID NO:370 (pCA 44 FKBP 1-144 L27V02A)
SEQ ID NO:371 (pCA 45 L27V02A 147-169 FRB)
SEQ ID NO:372 (pCA 45 L27V02A 147-169 FRB)
SEQ ID NO:373 (pCA 46 FKBP- L27V02A 1-146)
SEQ ID NO:374 (pCA 46 L27V02A-FKBP 1-146)
SEQ ID NO:375 (pCA 47 L27V02A 148-169 FRB)
SEQ ID NO:376 (pCA 47 L27V02A 148-169 FRB)
SEQ ID NO:377 (pCA 48 FKBP- L27V02A 1-147)
SEQ ID NO:378 (pCA 48 FKBP- L27V02A 1-147)
SEQ ID NO:379 (pCA 49 L27V02A 156-169 FRB)
SEQ ID NO:380 (pCA 49 L27V02A 156-169 FRB)

ES 2 567 410 T3

Construcciones pCA
SEQ ID NO:381 (pCA 50 FKBP-L27V02A 1-155)
SEQ ID NO:382 (pCA 50 FKBP-L27V02A 1-155)
SEQ ID NO:383 (pCA 51 L27V02A 158-169 FRB)
SEQ ID NO:384 (pCA 51 L27V02A 158-169 FRB)
SEQ ID NO:385 (pCA 52 FKBP 1-157 L27V02A)
SEQ ID NO:386 (pCA 52 FKBP 1-157 L27V02A)
SEQ ID NO:387 (pCA 53 L27V02A 166-169 FRB)
SEQ ID NO:388 (pCA 53 L27V02A 166-169 FRB)
SEQ ID NO:389 (pCA 54 FKBP L27V02A 1-165)
SEQ ID NO:390 (pCA 54 FKBP L27V02A 1-165)
SEQ ID NO:391 (pCA 55 FKBP L27V02A 1-47)
SEQ ID NO:392 (pCA 55 FKBP L27V02A 1-47)
SEQ ID NO:393 (pCA 56 L27V02A 48-169-FRB)
SEQ ID NO:394 (pCA 56 L27V02A 48-169-FRB)
SEQ ID NO:395 (pCA 57 FKBP L27V02A 1-49)
SEQ ID NO:396 (pCA 57 FKBP L27V02A 1-49)
SEQ ID NO:397 (pCA 58 pCA L27V02A 50-169 FRB)
SEQ ID NO:398 (pCA 58 pCA L27V02A 50-169 FRB)
SEQ ID NO:399 (pCA 59 FKBP L27V02A 1-82)
SEQ ID NO:400 (pCA 59 FKBP L27V02A 1-82)
SEQ ID NO:401 (pCA 60 L27V02A 83-169-FRB)
SEQ ID NO:402 (pCA 60 L27V02A 83-16-FRB)
SEQ ID NO:403 (pCA 61 FKBP L27V02A 1-84)
SEQ ID NO:404 (pCA 61 FKBP L27V02A 1-84)
SEQ ID NO:405 (pCA 62 L27V02A 85-169-FRB)
SEQ ID NO:406 (pCA 62 L27V02A 85-169-FRB)
SEQ ID NO:407 (pCA 63 FKBP L27V02A 1-122)
SEQ ID NO:408 (pCA 63 FKBP L27V02A 1-122)
SEQ ID NO:409 (pCA 64 L27V02A 123-169-FRB)
SEQ ID NO:410 (pCA 64 L27V02A 123-169-FRB)
SEQ ID NO:411 (pCA 65 FKBP L27V02A 1-123)
SEQ ID NO:412 (pCA 65 FKBP L27V02A 1-123)
SEQ ID NO:413 (pCA 66 L27V02A 124-169 FRB)
SEQ ID NO:414 (pCA 66 L27V02A 124-169 FRB)
SEQ ID NO:415 (pCA 67 L27V02A 1-168)
SEQ ID NO:416 (pCA 67 L27V02A 1-168)
SEQ ID NO:417 (pCA 67 L27V02A 1-168)
SEQ ID NO:418 (*pCA 68 L27V02A 169 FRB)

Construcciones pCA
SEQ ID NO:419 (*pCA 68 L27V02A 169 FRB)
SEQ ID NO:420 (pCA 69 FKBP L27V02A 1-166)
SEQ ID NO:421 (pCA 69 FKBP L27V02A 1-166)
SEQ ID NO:422 (*pCA 70 L27V02A 167-169 FRB)
SEQ ID NO:423 (*pCA 70 L27V02A 167-169 FRB)
SEQ ID NO:424 (pCA 71 FKBP L27V02A 1-164)
SEQ ID NO:425 (pCA 71 FKBP L27V02A 1-164)
SEQ ID NO:426 (pCA 72 L27V02A 165-169 FRB)
SEQ ID NO:428 (pCA 72 L27V02A 165-169 FRB)
SEQ ID NO:429 (pCA 73 FKBP L27V02A 1-162)
SEQ ID NO:430 (pCA 73 FKBP L27V02A 1-162)
SEQ ID NO:431 (pCA 74 L27V02A 163-169 FRB)
SEQ ID NO:432 (pCA 74 L27V02A 163-169 FRB)
SEQ ID NO:433 (pCA 75 FKBP L27V02A 1-160)
SEQ ID NO:434 (pCA 75 FKBP L27V02A 1-160)
SEQ ID NO:435 (pCA 76 L27V02A 161-169 FRB)
SEQ ID NO:436 (pCA 76 L27V02A 161-169 FRB)
SEQ ID NO:437 (pCA 77 FKBP L27V02A 1-158)
SEQ ID NO:438 (pCA 77 FKBP L27V02A 1-158)
SEQ ID NO:439 (pCA 78 L27V02A 159-169 FRB)
SEQ ID NO:440 (pCA 78 L27V02A 159-169 FRB)

Los pares de complementación descritos en la Tabla 42 se clonaron en el vector pF4Ag como se ha descrito anteriormente. Entonces se expresaron las construcciones PCA (900 µl) en lisado de reticulocitos de conejo (RRL; Promega Corp.) o extracto de germen de trigo (Promega Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mezclaron 1,25 µl de las reacciones de expresión para cada par de PCA con 10 µl de 2 x tampón de unión (HEPES 100 mM, NaCl 200 mM, CHAPS al 0,2 %, EDTA 2 mM, glicerol al 20 %, DTT 20 mM, pH 7,5) y 7,5 µl de agua, y se transfirieron 18 µl a pocillos de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 2 µl de rapamicina 5 µM (concentración final de 0,5 µM) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente.

Después de la incubación, 100 µl de PBI-3939 (50 x solución madre diluida a 1 x tampón de ensayo) y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se midió como se ha descrito anteriormente (Figura 76A-B: germen de trigo; FIG. 76C-D: reticulocitos de conejo; FIG. 76E-F: sistema libre de células [¿Qué sistema? ¿WG o RRL?]; FIG. 76G: células HEK293).

Las FIG. 76A-G muestran la luminiscencia de diversos pares de L27V de complementación de proteínas (PCA): un fragmento de L27V de cada par se fusionó bien a FKBP o a FRB usando una configuración de 2/3 (FIG. 76A y 76C) o una configuración de 1/4 (FIG. 76B y 76D) como se describe, y se controló la interacción de FKBP y FRB en el extracto de germen de trigo (FIG. 76A y 76B) y lisado de reticulocitos de conejo (RRL) (FIG. 76C y 76D); y la luminiscencia de los diversos controles negativos de complementación de proteínas (PCA) (FIG. 76E). Se midió la luminiscencia de varias L27V de complementación de proteínas usando una configuración de 1/4 en un sistema libre

de células (RRL) (FIG. 76F) y células HEK293 (FIG. 76G). Los datos de las FIG. 76A-G demuestran que varias eliminaciones diferentes, es decir, pequeños fragmentos de la variante L27V, son funcionales.

3. Para demostrar el uso de las construcciones PCA para la PCA basada en células, se transfectaron las construcciones a células HEK293 y se ensayaron con PBI-4377. Se mezclaron los ADN del plásmido (5 ng) de cada par PCA (6, 12, 55, 84 y 103) con 40 ng de ADN portador (pGEM-3fz) y 5 μ l de OPTI-MEM[®], y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se añadió FUGENE[®] HD (0,15 μ l) y se volvió a incubar a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadieron las mezclas de transfección de ADN a 100 μ l de células HEK293 (1,5 x 10⁵ células/ml) en DMEM con FBS al 10 % (sin antibióticos), se transfirieron a pocillos de una placa de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Tras la transfección, se retiró el medio y se reemplazó por medio independiente del CO₂ con 20 μ M o 50 x PBI-4377, y se incubó a 37 °C sin regulación de CO₂ durante 2 horas. Se midió la luminiscencia, se añadieron 10 μ l de rapamicina y se volvió a medir la luminiscencia cada 2 min durante 2 horas (FIG. 76A-C).

4. Para demostrar el uso de las construcciones PCA en la identificación de inhibidores de las interacciones entre proteínas, se usaron las construcciones descritas en el punto n.º 2 del presente ejemplo.

Se clonaron los pares de complementación, 103 "2/3", 157 "2/3", 103 "1/4" y 157 "1/4" descritos en la Tabla 42 en el vector pF4Ag como se ha descrito anteriormente. A continuación, se expresaron las construcciones PCA (25 μ l) en lisado de reticulocitos de conejo (RRL; Promega Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mezclaron 1,25 μ l de las reacciones de expresión para cada par de PCA con 10 μ l de 2 x tampón de unión (HEPES 100 mM, NaCl 200 mM, CHAPS al 0,2%, EDTA 2 mM, glicerol al 20 %, DTT 20 mM, pH 7,5) y 7,5 μ l de agua, y se transfirieron 16,2 μ l a los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se estudió la rapamicina con diversas cantidades de FK506. A las reacciones, se añadió el inhibidor de la unión de FRB-FKBP, FK506 (x 10), y se incubaron las reacciones a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió rapamicina 15 nM (10 x solución madre) hasta obtenerse una concentración final de 1,5 nM de rapamicina, se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, 100 μ l de PBI-3939 (50 x solución madre diluida a 1 x tampón de ensayo) y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se midió en un luminómetro GLOMAX[®]. La FIG. 77 demuestra que las construcciones PCA desveladas en el presente documento se pueden usar para identificar inhibidores de las interacciones entre proteínas.

5. Para demostrar el uso de las construcciones PCA en un formato lítico, se transfirieron los pares de complementación 103 "2/3", 157 "2/3" y 103 "1/4" a células HEK293 y se ensayaron con PBI-3939. Se mezclaron 0,5 ng de plásmido de cada par PCA con 5 μ l de OPTI-MEM[®] y 49 ng de pGEM-3zf (Promega Corp.). La mezcla de muestra se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se añadieron 0,15 μ l de FUGENE[®] HD a la mezcla de muestra, y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadieron 100 μ l de células HEK293 en DMEM con FBS al 10 % (sin antibióticos) a una concentración de 1,5 x 10⁵ células/ml a cada mezcla de muestra. Entonces, se transfirió la muestra de células a un pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % durante una noche.

Al día siguiente, se añadieron 11,1 μ l de rapamicina 10 μ M (concentración final de 1 μ M) a la mitad de los pocillos y se añadieron 11,1 μ l de agua a la otra mitad de los pocillos. Se incubaron las placas de 96 pocillos a 37 °C durante 1 h. Se añadieron 100 μ l de reactivo de ensayo + PBI-3939 (2 μ l de 50 x PBI-3939 mezclados con 98 μ l de reactivo de ensayo, previamente descrito) a cada pocillo y se incubaron las placas 37 °C durante 4 min. La luminiscencia se midió en un luminómetro GLOMAX[®] a 37 °C con un tiempo de integración de 0,5 s y 1 lectura. (FIG. 76H).

Ejemplo 50 - Biosensor de cAMP de OgLuc

Las variantes de OgLuc de la presente divulgación se pueden asociar con una alta producción no solo a través de la concentración, sino también a través de la modulación de la actividad enzimática. Por ejemplo, se puede desarrollar un biosensor de cAMP mediante la incorporación de un dominio de unión a cAMP de la proteína quinasa A en una variante de OgLuc permutada circularmente. Una variante de OgLuc desvelada en el presente documento se puede permutar circularmente en uno o varios sitios que toleren dicha permutación mediante métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, la solicitud publicada de EE.UU. n.º 2005/0153310). La proteína química variante de OgLuc permutada circularmente resultante puede funcionar como un biosensor intracelular para cAMP cuando se exprese en células de mamífero. Tras la unión de cAMP con el biosensor, el biosensor sufre un cambio de configuración que crea una enzima luciferasa activa. Al tratar las células con forskolina, un activador de la adenilato ciclasa, se debería producir un aumento de la luminiscencia con concentraciones crecientes de forskolina. Se pueden desarrollar biosensores similares para las dianas que incluyen, pero sin limitación, calcio (Ca²⁺), cGMP y proteasas tales como las caspasas y el virus del mosaico del tabaco (TEV) mediante la incorporación del dominio de unión apropiado o del sitio de escisión apropiado para cada una a una variante de OgLuc permutada circularmente.

La utilidad de OgLuc como biosensor se demostró mediante el análisis de la variante 9B8 opt en el contexto de un sensor de cAMP. Se crearon construcciones permutadas circularmente que contenían la subunidad RIIpB de la proteína quinasa A flanqueada por las secuencias de la variante de OgLuc, y se expresaron en un sistema libre de células según lo descrito en la publicación PCT PCT/US2007/008176, a excepción de que los sitios para la permutación circular se seleccionaron según lo descrito más adelante. La nueva proteína se ensayó en presencia y en ausencia de cAMP. La respuesta a cAMP se define como la proporción de actividad (+) cAMP/ (-) cAMP.

Se ha creado un modelo estructural para OgLuc basado en similitudes con ciertas proteínas de unión a ácidos

grasos de estructura conocida, descritas previamente en el documento PCT/US2010/33449. El modelo predice una secuencia ordenada de los motivos estructurales proteicos convencionales; hélice α y lámina β . Se escogieron las regiones de transición entre estos elementos estructurales como sitios de permutación circular (véase la Tabla 43).

5 1. El molde para la expresión de las construcciones de biosensor consistía en: secuencia C-terminal de Ogluc-secuencia de RII β -secuencia N-terminal de Ogluc en el plásmido pF5 (Promega Corp.). Se usó el sistema de extracto de germen de trigo acoplado a T7 TNT[®] (Promega Parte n.º L4140) para traducir la construcción. La reacción de extracto de germen de trigo TNT[®] incluía 25 μ l de extracto de germen de trigo TNT[®] (L411A), 2 μ l de tampón de reacción TNT[®] (L462A), 1 μ l de mezcla de aminoácidos, Complete (L446A), 1 μ l de RNasin[®] (40 U/ μ l) (N2615), 1 μ l de ARN polimerasa de T7 TNT[®] (L516A), 1,0 μ g de molde de ADN y agua exenta de nucleasa hasta
10 alcanzar un volumen total de 50 μ l. Se incubó la mezcla de reacción a 30 °C durante 120 min. Se realizó un ensayo de actividad de Ogluc mediante la adición a los 50 μ l de mezcla de traducción de Ogluc, 50 μ l de reactivo Ogluc Glo (MES 100 mM (pH 6,0), CDTA 1 mM, KCl 150 mM, tiourea 35 mM, DTT 2 mM, TERGITOL[®] NP-9 al 0,25 % (v/v), MAZU[®] DF 204 al 0,025 % y PBI-3939 20 μ M) con o sin cAMP 100 mM, y realizando una lectura cinética durante 30 min (lector de placas F500 TECAN[®] INFINITE[®]). La respuesta se determina mediante la división de la
15 luminiscencia generada por el biosensor con cAMP entre la luminiscencia generada por el biosensor sin cAMP (Tabla 43).

Tabla 43: Respuesta de biosensores de Ogluc permutadas circularmente al cAMP

SITIO CP	RESPUESTA
27	x 2,6
51	x 2,2
84	x 1,5
122	x 4,3
147	x 1,9
157	x 5,6

20 2. Se creó un biosensor de cAMP de 9B8opt permutado circularmente en el sitio CP 51 como se describe en 1. A continuación, se transfectó el biosensor a células HEK293 (15.000 células/pocillo) usando FUGENE[®] HD de acuerdo con las instrucciones del fabricante en una placa de 96 pocillos, y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después de la transfección, se retiró el medio y se sustituyó con medio independiente del CO₂ con FBS al 10 %. A continuación, se incubaron las células durante 2 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %, tras lo que se añadieron
25 cantidades variables de FSK. Se volvieron a incubar las células de nuevo durante 3 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después, se añadió PBI-3939 6 μ M y se midió la luminiscencia después de 13 min (FIG. 78).

3. Se usaron versiones permutadas circularmente ("CP"; por ejemplo, CP6 se refiere a que el antiguo resto 6 es el nuevo resto 1 detrás de Met) y divididas linealmente ("SS"; por ejemplo, el SS6 se refiere a un sensor orientado de la siguiente manera: Ogluc (1-6)-sitio de unión a RII β (SEQ ID NO: 441 y 442)-Ogluc (7-169)) de L27V como biosensores de AMPc (SEQ ID NO: 467-574). Se obtuvieron versiones CP (SEQ ID NO: 467-498 y 555-574) y SS (SEQ ID NO: 499-554) de la variante L27V como se ha descrito anteriormente y se expresaron en lisado de reticulocitos de conejo (RRL; Promega Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia enlazadora entre el extremo C-terminal de la secuencia del sitio de unión a RII β y de luciferasa Ogluc era
30 GGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCT (SEQ ID NO: 575). La secuencia enlazadora entre el extremo N-terminal de la secuencia del sitio de unión a RII β y de luciferasa Ogluc era
35 AGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGA (SEQ ID NO: 576). Se mezclaron 3,75 μ l de las reacciones de expresión con 1,25 μ l de 4 x cAMP (concentración final 1 nM-0,1 mM) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Después de la incubación, 100 μ l de PBI-3939 (50 x solución madre diluida a 1 x en tampón de ensayo) y se incubaron durante 3 min a temperatura ambiente. La luminiscencia se midió en un luminómetro
40 GLOMAX[®] (FIG. 79A-B). También se midió la luminiscencia para las versiones CP y SS de la variante L27V expresada en células HEK293 y tratadas con forskolina como se ha descrito previamente (FIG. 79C-D). Las FIG. 79A-D demuestran que las versiones permutados circularmente y divididas linealmente de las variantes de Ogluc desveladas en el presente documento se pueden usar como biosensores.

45 Ejemplo 51-Distribución y localización subcelular

Para el análisis de la distribución subcelular, se sembraron células U2OS a 2 x 10⁴ células/cm² en placas de cultivo con fondo de vidrio en medio 5A de McCoy (Invitrogen) que contenía SFB al 10 %. Las células se incubaron entonces durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se transfectaron las células con 1/20 del volumen de mezcla de transfección (FUGENE[®] HD y pF5A-CMV-L27V (la variante L27V (SEQ ID NO: 88) se clonó en el vector pF5A con el promotor de CMV (Promega Corp.) o pGEM3Zf (Promega Corp.; control negativo)) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después de la incubación, se sustituyó el medio celular con medio independiente del CO₂ con un FBS al 0,5 % y PBI-4378 100 μ M. Después de una incubación de 30 min a 37 °C, se capturaron imágenes sin filtrar en un microscopio de bioluminiscencia Olympus LV200 usando un objetivo de 60 aumentos (FIG. 80A-B)
55 durante 25, 100, 1.000 y 5.000 ms.

Para el análisis de la localización subcelular, se crearon fusiones de L27V N-terminales con el GPCR AT1R (receptor de la angiotensina de tipo 1 (SEQ ID NO: 459 y 460)) con la secuencia de secreción de IL-6 (SEQ ID NO:

461 y 462) o el factor de transcripción Nrf2 (SEQ ID NO: 317) usando un enlazador GSSG (SEQ ID NO: 457 y 458), y se transfectaron a células U2OS como se ha descrito anteriormente (FIG. 81A-C). La FIG. 81C ("GPRC") muestra la expresión de una construcción en la que la secuencia señal de IL6 está cadena arriba de la secuencia de la variante L27V, y el AT1R está cadena abajo de la secuencia de la variante L27V. La variante L27V sola también se transfectoró ("no fusionada"). Después de una incubación de 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %, se reemplazó el medio de células por medio independiente del CO₂ con FBS al 0,5 %, y se equilibró durante 1 hora a 37 °C en una atmósfera sin regulación de CO₂. A continuación, se añadió un volumen igual de medio + PBI-3939 200 µM y se capturaron imágenes sin filtrar de inmediato en un microscopio de bioluminiscencia Olympus LV200 usando un objetivo de 60 y 150 aumentos (FIG. 81A-C). Para las células que expresaban L27V sola, PBI-3939 se retiró mediante lavado de las células inmediatamente antes de la captura de imágenes.

Ejemplo 52- Control de las vías de señalización intracelular

El presente ejemplo proporciona dos ejemplos de la nueva luciferasa que se está usando como controlar las vías de señalización intracelular a nivel de proteína (en contraposición con los ejemplos de elementos de respuesta que representan la activación de la transcripción). La variante 9B8opt (SEQ ID NO: 24) se fusionó bien con IκB (Gross *et al.*, "Nature Methods" 2(8):607-614 (2005)) (en el extremo C-terminal, es decir, N-IκB-(9B8opt)-C)) o ODD (dominio de degradación dependiente del oxígeno de Hif-1-α (Moroz *et al.*, PLoS One 4(4):e5077 (2009)) (en el extremo N-terminal, es decir, N-(9B8opt)-ODD-C)). Se sabe que IκB se degrada en las células tras la estimulación con TNFα. Por lo tanto, la construcción IκB-(9B8opt) se podría usar como un sensor de TNFα de células vivas. Se sabe que ODD (HIF-1-α) se acumulan dentro de las células tras la estimulación con compuestos que inducen la hipoxia. Por lo tanto, la construcción de ODD-(9B8opt) se podría usar como un sensor de la hipoxia en células vivas.

Se expresaron construcciones que contenían fusiones con IκB u ODD con 9B8opt (pF5A) en células HEK293 mediante transfección inversa (5 ng (IκB) o 0,05 ng de ADN de ODD ((mezclado con el ADN portador, dando un total de 50 ng)) como se ha descrito anteriormente, y se incubaron durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después de la transfección, se reemplazó el medio por medio de independiente del CO₂ nuevo que contenía FBS al 0,5 % y PBI-4377 20 µM, y se dejó equilibrar durante 4 horas a 37 °C, CO₂ atmosférico. Se expusieron las células a un estímulo: TNFα para las células que expresaban la fusión de IκB y fenantrolina para las células que expresaban la fusión de ODD. Se añadió DMSO (vehículo) a las células de control. Para las muestras de TNFα/IκB, se añadieron 100 µg/ml de cicloheximida aproximadamente 15 min antes de añadir el estímulo para prevenir la síntesis de nuevas proteínas. En los puntos temporales indicados después del tratamiento, las células se ensayaron para determinar la luminiscencia. Para la normalización de los datos, se dividieron las URL de cada muestra en un punto temporal dado entre las URL de la misma muestra inmediatamente después de la estimulación. Entonces, se determinaron las veces de respuesta para cada sensor (FIG. 82A-C).

B. Se usó L27V para controlar las vías de señalización del estrés oxidativo a nivel de proteína. Se fusionaron luciferasa L27V o de *Renilla* (Rluc) con Nrf2/NFE2L2 en un vector de expresión pF5K (en el extremo C-terminal; es decir, N-Nrf2-(L27V)-C o N-Nrf2-(Rluc)-C). Keap1 es un regulador negativo de Nrf2 (SEQ ID NO: 217). Con el fin de representar fielmente la regulación de los niveles de proteína Nrf2-L27V02, se expresó conjuntamente Keap1 para mantener niveles bajos Nrf2 (a través de la ubiquitinación).

Se expresaron Nrf2-L27V o Nrf2-Rluc (5 ng, pF5K) y una proteína de fusión de HALOTAG®-Keap1 (pFN21-HT7-Keap1 (SEQ ID NO: 316); 50 ng) en células HEK293 mediante la transfección de la células en el momento de la siembra en placas de 96 pocillos como se ha descrito anteriormente, y se incubaron durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después de la transfección, el medio se reemplazó por medio independiente de CO₂ recién preparado con FBS al 0,5 % y PBI-4377 20 µM para L27V o ENDUREN™ 20 µM (Promega Corp.) para la luciferasa de *Renilla*, y las células se equilibraron durante 4 horas a 37 °C bajo CO₂ atmosférico. Para el análisis cinético, se usaron D,L-sulforafano 20 µM o vehículo (DMSO). En la FIG. 83A, se midió la luminiscencia como se ha descrito anteriormente en los puntos temporales indicados después del tratamiento. Para la normalización de los datos, se dividió la luminiscencia de cada muestra en un punto temporal dado entre la luminiscencia de la misma muestra inmediatamente después de la estimulación (FIG. 83B-C).

C. Se realizó una comparación de la respuesta del sensor de Nrf2 se describe en B y del indicador Nrf2(ARE)-Luc2P (Promega Corp.). Tanto el sensor de Nrf2 como el indicador se exploraron como se describe en el apartado B anterior. Para el ensayo de gen indicador de la luciérnaga (Luc2P), se usó el reactivo de ensayo ONE-GLO™. Las FIG. 84A-B proporcionan la respuesta normalizada de Nrf2-L27V a las 2 horas y de Nrf2(ARE)-Luc2P a las 16 h.

Ejemplo 53 - Evaluación de la variante de OgLuc como indicador bioluminiscente con BRET

La transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) permite controlar las interacciones entre las proteínas. Se examinó la transferencia de energía intramolecular entre IV y una pareja de fusión de HT7 en la que HT7 se había marcado previamente con un fluoróforo, es decir, TMR (longitud de onda de excitación/emisión (ex/em) = 555/585 nm) o rodamina 110 (longitud de onda de excitación/emisión = 502/527 nm). Se incubaron 50 µl de un lisado celular bacteriano que contenía la proteína de fusión IV-HT7 del Ejemplo 34 con o sin ligando fluoróforo 0,001-10 µM durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron 50 µl de RENILLA-

GLO™, que contenía coelenterazina-h 22 μM, a 50 μl de la mezcla de ligando y enzima, y se registró el espectro de emisión a los 5 min. Se muestran los espectros de ejemplo de IV-HT7 con TMR (FIG. 83A) o rodamina 110 ("Rhod110") (FIG. 85B) indicando que la BRET fue mayor cuando la ex/em del ligando estaba más cerca del pico luminescente de 460 nm de OgLuc, es decir, superior a la rodamina 110. Estos datos muestran que se puede producir la transferencia de energía intramolecular entre las variantes de OgLuc y un fluoróforo en una proteína de fusión. Se usaron tres controles diferentes para la comparación (datos no mostrados): 1) una fusión de no HT; 2) una fusión de HT que no estaba marcada con un ligando HT; y 3) una fusión marcada con HT que se escindió proteolíticamente en un sitio de TEV entre OgLuc y HT (lo que indica la implicación de la proximidad/distancia). No se observó BRET en los tres controles diferentes, lo que sugiere que TH participó en la obtención de la BRET. La BRET fue mayor para C1+A4E e IV con HT7 C-terminal en comparación con HT7 N-terminal.

Ejemplo 54 - Ensayos de proximidad de proteínas para células vivas o formatos líticos

En un ejemplo, se aplican proteínas de fusión OgLuc permutadas circularmente (CP) o divididas linealmente (SS) a las mediciones de la proximidad de las proteínas. OgLuc se permuta y se divide a través de la inserción de una secuencia de aminoácidos sustrato de proteasa (por ejemplo, TEV) para generar baja bioluminiscencia. La luciferasa inactiva se ancla (por ejemplo, mediante fusión genética) a una proteína de monitorización. Se ancla una proteína de interacción potencial (por ejemplo, mediante fusión genética) a una proteasa (por ejemplo, TEV). Cuando las dos proteínas de monitorización interactúan o están lo suficientemente próximas entre sí (por ejemplo, a través de una interacción constitutiva, un estímulo farmacológico o una respuesta de vía), la luciferasa se escinde para generar un aumento de la actividad de bioluminiscencia. El ejemplo se puede aplicar a mediciones de la proximidad de proteínas en células o en ensayos bioquímicos. Además, la alta estabilidad térmica de una variante de luciferasa OgLuc podría permitir mediciones de las interacciones anticuerpo-antígeno en células lisadas o ensayos bioquímicos.

Ejemplo 55 - Ensayos bioluminiscentes

1. Para demostrar el uso de una variante de OgLuc en un ensayo bioluminiscente para detectar la enzima caspasa-3, se usó la variante 9B8 opt en un ensayo bioluminiscente usando un sustrato de pro-coelenterazina que comprendía la secuencia de escisión de la caspasa-3 DEVD. Se mezcló la enzima de la caspasa-3 purificada con una muestra de lisado de *E. coli* que expresaba la variante opt 9B8, que se preparó como se describe en el Ejemplo 27 y se diluyó 10 veces en un tampón que contenía MES 100 mM, pH 6,0, CDTA 1 mM, KCl 150 mM, tiourea 35 mM, DTT 2 mM, TERGITOL® NP-9 al 0,25 % (v/v), MAZU® DF 204 al 0,025 % (v/v), con o sin z-DEVD-coelenterazina-h 23,5 μM en HEPES 100 mM, pH 7,5. Se incubó la enzima caspasa-3 con la muestra de lisado durante 3 horas a temperatura ambiente, y se detectó la luminiscencia en un luminómetro Turner Modulus™ en diversos puntos temporales. Como controles, se usaron una muestra que solo contenía lisado bacteriano y una muestra que solo contenía la caspasa-3. Se usaron tres duplicados. La FIG. 86 y la Tabla 44 demuestran que 9B8 opt y, por lo tanto, otras variantes de OgLuc descritas en el presente documento se pueden usar en un ensayo de bioluminiscencia con un sustrato de pro-coelenterazina para detectar una enzima de interés.

Tabla 44: Luminiscencia media en URL generada a partir de lisados bacterianos que expresan la variante 9B8 opt incubados con o sin caspasa-3 purificada usando z-DEVD-coelenterazina-h como sustrato

tiempo (min)	Sin caspasa (URL)	+ caspasa (URL)
5	26.023	25.411
15,3	7.707	36.906
29,9	4.013	41.854
60,9	2.305	43.370
190,3	1.155	42.448

2. Se usó la variante L27V en un ensayo bioluminiscente usando un sustrato de pro-coelenterazina que comprendía la secuencia de escisión de caspasa-3 DEVD. Se mezcló enzima caspasa-3 purificada (1 mg/ml) en MES 100 mM, pH 6 (50 μl) con variante L27V02 227 nM y PBI-3741 47 μM (z-DEVD-coelenterazina-h) en tampón de ensayo (50 μl). Las reacciones se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente, y se detectó la luminiscencia como se ha descrito previamente. El ensayo con la variante L27V se comparó con una versión de la luciferasa de luciérnaga del ensayo, sistema de ensayo 3/7 CASPASA-GLO® (caspasa-Glo; Promega Corp.). La Tabla 45 demuestra que la variante L27V y, por lo tanto, otras variantes de OgLuc de la presente divulgación, se pueden usar en un ensayo de bioluminiscencia con un sustrato pro-coelenterazina para detectar una enzima de interés.

Tabla 45

	(+) caspasa	+/-	(-) caspasa	+/-
L27V	11.532	93	803	25
Caspasa-Glo	15.156.567	793.981	302	5

Ejemplo 56 - Inmunoensayos

Las variantes de OgLuc desveladas en el presente documento se integran en varios conceptos diferentes de inmunoensayo. Por ejemplo, una variante de OgLuc se fusiona genéticamente o se conjuga químicamente con un anticuerpo principal o secundario para proporcionar un método de detección para un determinado analito. Como otro ejemplo, una variante de OgLuc se fusiona genéticamente o se conjuga químicamente con proteína A, proteína G, proteína L, o cualquier otro péptido o proteína conocidos por unirse a fragmentos de Ig, y esto se podría usar para detectar un anticuerpo específico unido a un determinado analito. Como otro ejemplo, una variante de OgLuc se fusiona genéticamente o se conjuga químicamente con estreptavidina, y se usa para detectar un anticuerpo biotinilado específico unido a un determinado analito. Como otro ejemplo, los fragmentos complementarios de una variante de OgLuc se fusionan genéticamente o se conjugan químicamente con anticuerpos primarios y secundarios, de manera que el anticuerpo principal reconoce un analito inmovilizado en particular y el anticuerpo secundario reconoce el anticuerpo principal, todo en un formato de tipo ELISA. La actividad de la variante de OgLuc, es decir, la luminiscencia, se reconstituye en presencia de analito inmovilizado, y se usa como un medio para cuantificar el analito.

Como otro ejemplo, los fragmentos complementarios de una variante de OgLuc pueden fusionarse con dos anticuerpos, de manera que un anticuerpo reconoce un determinado analito en un epítipo y el segundo anticuerpo reconoce el analito a un epítipo separado. La actividad de la variante de OgLuc se reconstituiría en presencia de analito. El método sería susceptible de mediciones de cuantificación de analitos en un medio complejo tal como un lisado celular o medio celular. Como otro ejemplo, los fragmentos complementarios de una variante de OgLuc pueden fusionarse con dos anticuerpos, de manera que un anticuerpo reconozca un determinado analito, independientemente de la modificación, y el segundo anticuerpo reconozca solo el analito modificado (por ejemplo, después de la modificación posterior a la traducción). La actividad de la variante de OgLuc se reconstituiría en presencia del analito solo cuando estuviera modificado. El método sería susceptible de mediciones de analito modificado en un medio complejo tal como un lisado celular. Como otro ejemplo, una variante de OgLuc puede conjugarse con un analito (por ejemplo, prostaglandinas) y usarse en un formato de ELISA de tipo sándwich competitivo.

Ejemplo 57 - Ensayo de dimerización

El presente ejemplo demuestra que las variantes de OgLuc permutadas circularmente de longitud completa pueden fusionarse con respectivas parejas de unión, por ejemplo, FRB y FKBP, y usarse en un ensayo de tipo complementación de proteínas. La diferencia clave entre el método desvelado en el presente documento y la complementación tradicional de proteínas es que no hubo complementación, sino que, más bien, hubo dimerización de dos enzimas de longitud completa, por ejemplo, variantes de OgLuc permutadas circularmente.

En resumen, se fusionaron proteínas indicadoras permutadas circularmente configuradas de forma similar para la actividad baja a ambas parejas de proteína de fusión (véase la FIG. 87A). Por ejemplo, cada pareja de fusión se puede enlazar con indicadores permutados de estructura idéntica. La interacción de las parejas de fusión aproximó mucho a los indicadores permutados, permitiendo de este modo la reconstitución de un indicador híbrido que tenía mayor actividad. El nuevo indicador híbrido incluía porciones de cada uno de los indicadores permutados circularmente de una manera que permitió la reducción de la restricción estructural.

Se clonaron las variantes L27V permutadas circularmente y divididas linealmente CP84 y CP 103 (N-(SS₁)-(1-SS₁)-FRB-C and C-(1-SS₁)-(SS-169)-FKBP) como se ha descrito anteriormente y se expresaron (25 µl) en lisado de reticulocitos de conejo (RRL; Promega Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mezclaron 1,25 µl de las reacciones de expresión para cada par de dimerización con 10 µl de 2 x tampón de unión (HEPES 100 mM, NaCl 200 mM, CHAPS al 0,2 %, EDTA 2 mM, glicerol al 20 %, DTT 20 mM, pH 7,5) y 7,5 µl de agua, y se transfirieron 18 µl a los pocillos de una placa de 96 pocillos. Para las reacciones, se añadieron 2 µl de rapamicina (concentración final de 0 y 0,1 a 1.000 nM), y las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Después de la incubación, 100 µl de PBI-3939 (50 x solución madre diluida a 1 x en tampón de ensayo) y se incubaron durante 3 min a temperatura ambiente. Se midió la luminiscencia en un luminómetro GLOMAX® (FIG. 87B) y se determinó la respuesta (FIG. 87C). Las FIG. 87B-C demuestran que las variantes de OgLuc de la presente divulgación se pueden usar para detectar las interacciones proteína-proteína mediante un ensayo de dimerización de tipo PCA.

Ejemplo 58 - Semivida intercelular

Se determinó la semivida intracelular de las variantes de OgLuc 9B8, 9B8+K33N, V2, L27V y V2+L27M. Se transfectaron células CHO (500.000) en placas de 15-100 mm en medio F12 con FBS al 10 % y 1 x piruvato de sodio con 30 µl, 100 ng/µl de ADN de plásmido que contenía 9B8, 9B8+K33N, V2, L27V ("V2+L27V") o V2+L27M (todas en fondo de vector pF4A) usando TRANSIT®-LT1 (Mirus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron a continuación durante 6 horas. Se sembraron a 10.000 células/pocillo en 6 pocillos de una placa de 96 pocillos (6 pocillos/variante) y se incubaron durante la noche a 37 °C. Se distribuyeron las muestras en 3 placas. Cada placa tenía 6 duplicados para las mediciones en diferentes puntos temporales.

- Después de la incubación durante la noche, se retiró el medio de las células para muestras de $t = 0$, y se añadieron 100 μl de tampón de ensayo (previamente descrito, sin sustrato). La muestra se congeló en hielo seco y se almacenó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Se diluyó cicloheximida (100 mg/ml) a 1:100 hasta una concentración final de 1 mg/ml en OPTI-MEM®. También se diluyó DMSO (100 %) a 1:100 (concentración final al 1 %) en OPTI-MEM®. Se añadió (11 μl) la cicloheximida diluida (1 mg/ml) hasta 3 repeticiones de cada muestra de variante transfectada, y se añadieron 11 μl del DMSO diluido (1 %) a las otras 3 repeticiones. A continuación, se incubaron las células a $37\text{ }^\circ\text{C}$, CO_2 al 5 % y se retiraron en varios puntos temporales (es decir, 0, 0,5, 0,9, 2,5, 4,3 y 6,2 horas) y se procesaron como las muestras de $t = 0$.
- 10 Para el análisis, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, y se ensayaron 10 μl en 50 μl de reactivo de ensayo. La luminiscencia se midió en un luminómetro GLOMAX®. En cada punto temporal, se midió la luminiscencia para las muestras no tratadas y tratadas con cicloheximida. Las URL de las células tratadas con cicloheximida se normalizaron mediante las URL para las células no tratadas.
- 15 Se calculó la semivida intracelular de cada variante midiendo la proporción de la luminiscencia de la muestra tratada con cicloheximida (CHX) con respecto a la de la no tratada en cada punto temporal. A continuación, se representó la proporción \ln (% tratada con respecto a no tratada) con el tiempo, y se calculó la semivida (Tabla 46). Las variantes de OgLuc resultaron tener semividas intracelulares de aproximadamente 6-9 horas con un promotor de CMV completamente potente, pero las semividas se redujeron con una variante de eliminación de CMV (d2). La presencia de una señal de degradación PEST combinada con el promotor de CMV completamente potente reduce significativamente la semivida.

Tabla 46

Muestra	CMV no deg.	d2 de CMV no deg.	PEST de CMV
9B8	6,32	3,87	1,43
K33N	9,24	3,70	1,18
V2	9,63	4,28	1,61
V2+L27V	6,66	4,78	1,63
V2+L27M	8,89	6,98	1,63

- 25 Se completó otro experimento usando el protocolo de transfección inversa descrito en el Ejemplo 52 con células HEK293 (datos no mostrados). Los resultados de este experimento indican que la semivida intracelular para la variante L27V con PEST es de 10 min. La variante L27V sin señal de degradación usada en este experimento no mostró una desintegración en el transcurso de experimento. En este caso, la desintegración se normalizó con respecto a las células no tratadas en $t = 0$.

30 Ejemplo 59 - Exposición de las variantes de OgLuc a la urea

- Dado que se sabe que la luciferasa de luciérnaga es relativamente inestable, es mucho más sensible a la exposición a la urea. Para determinar si éste era también el caso de las variantes de OgLuc, se determinó la sensibilidad de la OgLuc a la urea. Se mezclaron 5 μl de enzima L27V 45,3 μM con 100 μl de una solución de urea (MOPS 100 mM, pH 7,2, NaCl 100 mM, CDTA 1 mM, glicerol al 5 % y diversas concentraciones de urea) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se diluyeron 5 μl de la solución de urea + enzima L27V 10.000 veces en DMEM sin rojo fenol + PRIONEX® al 0,1 %, se mezclaron 50 μl con 50 μl de reactivo de ensayo que contenía PBI-3939 100 μM (descrito anteriormente), y se leyó la luminiscencia a los 10 min. (FIG. 88). La FIG. 88 indica que L27V bien es resistente a la urea o se vuelve a plegar a una enzima funcional muy rápidamente tras retirar la urea. Esto sugiere que L27V se podría usar como una enzima indicadora en condiciones de desnaturalización química, por ejemplo, multiplexación en condiciones en las que se use un desnaturalizante para detener una reacción enzimática antes de la reacción basada en la variante de OgLuc.

- 45 Se diluyó una solución madre de variante L27V purificada a 0,31 mg/ml 100.000 veces en tampón (PBS+DTT 1 mM+IGEPAL al 0,005 %) y se incubó con urea 3 M durante 30 minutos a $25\text{ }^\circ\text{C}$, y luego se mezcló 1:1 (50 μl + 50 μl) con un reactivo de ensayo que contenía PBI-3939 100 μM (descrito anteriormente). Las reacciones se leyeron en un luminómetro TECAN® INFINITE® F500 como se ha descrito anteriormente (para 100 min; intervalos de lectura de 1 min) (FIG. 89). Los resultados indican que la urea 3 M reduce la actividad de la variante L27V en aproximadamente un 50 %, pero que, después de la dilución de la urea 2 veces (hasta una concentración final de 1,5 M) la actividad aumenta, presumiblemente debido a replegamiento.

Ejemplo 60 - Formación de imágenes de proteínas de fusión OgLuc

- 55 El presente ejemplo demuestra el uso de OgLuc y variantes de OgLuc para controlar la translocación de proteínas en células vivas sin la necesidad de la excitación de fluorescencia. Se fusionaron variantes de OgLuc con el receptor de glucocorticoides humano (GR; SEQ ID NO: 451 y 452), la proteína quinasa C alfa humana (PKCa; SEQ ID NO: 449 y 450) o LC3 (SEQ ID NO: 577 y 578). Para analizar la translocación subcelular de proteínas usando imágenes

de bioluminiscencia, se sembraron células HeLa a 2×10^4 células/cm² en placas de cultivo con fondo de vidrio (MatTek) en medio DMEM (Invitrogen) que contenía SFB al 10 %. Las células se incubaron entonces durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. A continuación, se transfectaron las células con 1/20 del volumen de la mezcla de transfección (FUGENE® HD) y ADN codificante de L27V02-GR (SEQ ID NO: 453 y 454) o L27V02-PKC alfa (SEQ ID NO: 455 y 456) clonado en el vector pF5A (Promega Corp.). El ADN de plásmido para L27V02-GR se diluyó 1:20 en pGEM-3ZF (Promega Corp.) para lograr los niveles de expresión apropiados de L27V02-GR. El ADN de plásmido para L27V02-LC3 y L27V02-PKC alfa se usó sin diluir. Las células se incubaron entonces durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células transfectadas con las proteínas de fusión de GR se privaron del agonista de GR durante 20 horas usando medio MEM suplementado con FBS tratado con dextrano/carbón vegetal al 1 % (Invitrogen). Veinticuatro horas después de la transfección (para las mediciones de PKC alfa) o 48 horas después de la transfección (para las mediciones de GR), el medio celular se sustituyó con medio independiente del CO₂ que contenía PBI-3939 100 µM inmediatamente antes de la formación de imágenes. Se capturaron de inmediato imágenes sin filtrar en un microscopio de bioluminiscencia Olympus LV200 usando un objetivo de 150 aumentos.

La translocación del citosol al núcleo de la proteína de fusión L27V02-GR se logró a través de la estimulación con dexametasona 0,5 mM durante 15 min. La translocación del citosol a la membrana plasmática de la proteína de fusión L27V02-PKC alfa se logró a través de la estimulación con PMA 100 nM durante 20 min. Las células transfectadas con proteína de fusión L27V02-LC3 se dejaron sin tratar o se trataron con cloroquina 50 mM en medio DMEM (Invitrogen) que contenía FBS al 10 %.

L27V02-receptor de glucocorticoides

En ausencia de los glucocorticoides, el receptor de glucocorticoides (GR) forma complejos con las proteínas Hsp90 y reside en el citosol. Tras la interacción de GR con glucocorticoides tales como la dexametasona, las proteínas GR se disocian de estos complejos de proteínas y se translocalizan hacia el núcleo para regular la transcripción de genes. La FIG. 90A-B muestran la formación de imágenes de bioluminiscencia de la translocación desde el citosol hacia los receptores nucleares (NR) inducida por la dexametasona de las proteínas de fusión de L27V02-receptor de glucocorticoides (GR) usando el sustrato PBI-3939 en células HeLa.

L27V02-PKCa

Tras el tratamiento con ésteres de forbol, las proteínas PKC alfa son reclutadas a la membrana plasmática y regulan las respuestas celulares, incluyendo la dinámica de la membrana y la transducción de señales. Las FIG. 91A-B muestran imágenes de bioluminiscencia de la translocación desde el citosol hacia la membrana plasmática de la proteína quinasa C alfa (PKC alfa) inducida por el éster de forbol de proteínas de fusión de OgLuc L27V02-PKC alfa usando el sustrato PBI3939 en células U-2OS.

L27V-LC3

La asociación de proteínas LC-3 procesadas con autofagosomas representa una etapa distintiva de la autofagia. El tratamiento con cloroquina detiene el flujo autofágico en esta etapa, lo que produce la acumulación de proteínas LC-3 en los autofagosomas (produciendo una distribución subcelular puntiforme). La FIG. 92A-B muestran la formación de imágenes de bioluminiscencia de la translocación de proteínas autofagosómicas inducida por la cloroquina de proteínas de fusión de OgLuc L27V-LC3 (SEQ ID NO: 592 y 593) usando sustrato PBI-3939 en dos muestras de células HeLa representativas.

Tabla 47 - Lista de condiciones

C1+A4E	Sustituciones adicionales				
C1+A4E	L92G				
C1+A4E	L92Q				
C1+A4E	L92S				
C1+A4E	L92A				
C1+A4E	L72Q				
C1+A4E	I90T				
C1+A4E	Q20R				
C1+A4E	C164S				
C1+A4E	M75K				
C1+A4E	V79I				
C1+A4E	F54I				
C1+A4E	K89E				
C1+A4E	I90V				
C1+A4E	F77W	F68S	I90V		
C1+A4E	F54I	M75K			

C1+A4E	F54I	M75K	I90V			
C1+A4E	F54I	F68S	M75K			
C1+A4E	F54I	I90V				
C1+A4E	F54I					
C1+A4E	F54T	N135K	I167V	P104L	D 139E	
C1+A4E	V45E	L34M	G51V	I99V	I143L	
C1+A4E	S28P	L34M	G51V	I99V	I143L	F54T
C1+A4E	S28P	L34M	G51V	I99V	I143L	F54T
C1+A4E	S28P					

Listado de secuencias

LISTADO DE SECUENCIAS

5

SEQ ID NO: 1 (Proteína OgLuc madura natural) *Oplophorus gracilirostris*

FTLADDFVGDWQQTAGYNQDQVLEQGGLSSLFQALGVSVTPIQKVVLSGENGLKADIHVIIPIYEGLSGFQMGLEMIKVVVYPVDDHHEFKIILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYPGIAVFDGKQITVTGT LWNGNKIYDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCENILA

10

SEQ ID NO: 2 (nucleótido C1A4E)

ATGGTGTTTACATTGGAGGATTTTCGTTGGAGACTGGCGGCAGACAGCTGGATACAACCAAGATCAAGTGTTAGAACAAGGAGGATTGTCTAGTCTGTTCCAAAAGCTGGGAGTGTTCAGTCACCCCAATCCAGAAAATTGTGCTGTCTGGGGAGAATGGGTAAAATTTGATATTCATGTCATCATCCCTTACGAGGGACTCAGTGGTTTTCAAATGGGTCTGATTGAAATGATCTTCAAAGTTGTTTACCAGTGGATGATCATCATTTCAAGATTATTCTCCATTATGGTACACTCGTTATTGACGGTGTGACACCAAACATGATTGACTACTTTGGACGCCCTTACGAGGGAATTGCTGTGTTTACGGCAAGAAGATCACAGTTACTGGAACCTGTGGAACGGCAACAAGATCATTGATGAGCGCCTGATCAACCCAGATGGTTCACCTCCTCCCGCTTACTATCAATGGAGTCACCGGATGGCGCCTTTGCGAGCGTATTCTTGCC

15

SEQ ID NO: 3 (proteína C1A4E)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQGGLSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLKFIDIHVIIPIYEGLSGFQMGLEMIKVVVYPVDDHHEFKIILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 4 (nucleótido QC27)

ATGGTGTTTACATTGGAGGATTTTCGTTGGAGACTGGCGGCAGACAGCTGGATACAACCTAGATCAAGTGTTAGAACAAGGAGGATTGTCTAGTCTGTTCCAAAAGCTGGGAGTGTTCAGTCACCCCAATCCAGAAAATTGTGCTGTCTGGGGAGAATGGGTAAAATTTGATATTCATGTCATCATCCCTTACGAGGGACTCAGTGGTTTTCAAATGGGTCTGATTGAAATGATCTTCAAAGTTGTTTACCAGTGGATGATCATCATTTCAAGATTATTACCATTATGGTACACTCGTTATTGACGGTGTGACACCAAACATGATTGACTTCTTTGGACGCCCTTACGAGGGAATTGCTGTGTTTACGGCAAGAAGATCACAGTTACTGGAACCTGTGGAACGGCAACAAGATCATTGATGAGCGCCTGATCAACCCAGATGGTTCACCTCCTCCCGCTTACTATCAATGGAGTCACCGGATGGCGCCTTTGCGAGCGTATTCTTGCC

20

SEQ ID NO: 5 (proteína QC27)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGLSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIPIYEGLSGFQMGLEMIKVVVYPVDDHHEFKIILHYGTLVIDGVTNMIIDFFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA

25

SEQ ID NO: 6 (nucleótido QC27 9a)

ATGGTGTTTACATTGGAGGATTTTCGTTGGAGACTGGCGGCAGACAGCTGGATAACAACCTAGATCA
 ACTGTTAGAACAAGGAGGATTGTCTAGTCTGTTCCAAAAGCTGGGAGTGTCTAGTCACCCCAATCC
 AGAAAATTGTGCTGTCTGGGGAGAATGGGTAAAAAATTGATATTCATGTCATCATCCCTTACGAG
 GGACTCAGTGGTTATCAAATGGGTCTGATTGAAAAGATCTTCAAAGTTGTTTACCCAGTGGATGA
 TCATCATTTCAAGATTATTCGCCATTATGGTACACTCGTTATTGACGGTGTGACACCAAACATGA
 TTGACTTCTTTGGACGCCCTTACGAGGGAATTGCTGTGTTTACGGCAAGAAGATCACAGTTACT
 GGAECTCTGTGGAACGGCAACAAGATCATTGATGAGCGCCTGATCAACCCAGATGGTTCACTCCT
 CTTCCGCGTTACTATCAATGGAATCACCGGATGGCGCCTTTGCGAGCGTATTCTTGCC

SEQ ID NO: 7 (proteína QC27 9a)

5

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQLLEQGGSSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
 GLSGYQMGQIEKI FKVVYPVDDHFKIIRHYGTLVIDGVTPNMIDFFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVVTINGITGWRLCERILA

SEQ ID NO: 8 (nucleótido IVY)

ATGGTGTTTACATTGGAGGATTTTCGTTGGAGACTGGCGGCAGACAGCTGGATAACAACCAAGATCA
 AGTGTTAGAACAAGGAGGATTGTCTAGTCTGTTCCAAAAGCTGGGAGTGTCTAGTCACCCCAATCC
 AGAAAATTGTGCTGTCTGGGGAGAATGGGTAAAAAATTGATATTCATGTCATCATCCCTTACGAG
 GGACTCAGTGGTTTTCAAATGGGTCTGATTGAAATGATCTACAAAGTTGTTTACCCAGTGGATGA
 TCATCATTTCAAGGTTATTCTCCATTATGGTACACTCGTTATTGACGGTGTGACACCAAACATGA
 TTGACTACTTTGGACGCCCTTACGAGGGAATTGCTGTGTTTACGGCAAGAAGATCACAGTTACT
 GGAECTCTGTGGAACGGCAACAAGATCATTGATGAGCGCCTGATCAACCCAGATGGTTCACTCCT
 CTTCCGCGTTACTATCAATGGAGTCACCGGATGGCGCCTTTGCGAGCGTATTCTTGCC

10

SEQ ID NO: 9 (proteína IVY)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQGGSSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
 GLSGFQMGLEMIYKVVYPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVVTINGVTGWRLCERILA

15

SEQ ID NO: 10 (nucleótido IVY+C1.3)

ATGGTGTTTACATTGGAGGATTACGTTGGAGACTGGCGGCAGACAGCTGGATAACAACCAAGATCA
 AGTGTTAGAACAAGGAGGATTGTCTAGTCTGTTCCAAAATCTGGGAGTGTCTGTCTACCCCAATCC
 AGAAAATTGTGCTGTCTGGGGAGAATGGGTAAAAAATTGATATTCATGTCATCATCCCTTACGAG
 GGACTCAGTGGTTTTCAAATGGGTCTGATTGAAATGATCTACAAAGTTGTTTACCCAGTGGATGA
 TCATCATTTCAAGGTTATTCTCCATTATGGTACACTCGTTATTGACGGTGTGACACCAAACATGA
 TTGACTACTTTGGACGCCCTTACGAGGGAATTGCTGTGTTTACGGCAAGAAGATCACAGTTACT
 GGAECTCTGTGGAACGGCGACAAGATCATTGATGAGCGCCTGATCAACCCAGATGGTTCACTCCT
 CTTCCGCGTTACTACCAATGGAGTCACCGGATGGCGCCTTTGCGAGCGTATTCTTGCC

20

SEQ ID NO: 11 (proteína IVY+C1.3)

MVFTLEDYVGDWRQTAGYNQDQVLEQGGSSSLFQNLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
 GLSGFQMGLEMIYKVVYPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGDKIIDERLINPDGSLFRVVTNGVTGWRLCERILA

25

SEQ ID NO: 12 (nucleótido IVY C5.19)

ATGGTGTTTACATTGGAGGATTTTCGTTGGAGACTGGCGGCAGACAGCTGGATAACAACCAAGATCA
AGTGTTAGAACAAGGAGGAGTGTCTAGTCTGTTCCAAAAGCTGGGAGTGTCAATCACCCCAATCC
AGAAAATTGTGCTGTCTGGGGAGAATGGGTAAAAAATTGATATTCATGTCATCATCCCTTACGAG
GGACTCAGTGGTTTTTCAAATGGGTCTGATTGAAATGATCTACAAAGTTGTTTACCCAGTGGATGA
TCATCATTTCAAGGTTATTCTCCATTATGGTACACTCGTTATTGACGGTGTGACACCAACATGA
TTGACTACTTTGGACGCCCTTACGAGGGAATTGCTGTGTTTACGGCAAGAAGATCACAGTTACT
GGAACCTCTGTGGAACGGCAACAAGATCATTGATGAGCGCCTGATCAACCCAGATGGTTCAATCCT
CTTCCGCGTTACTATCAATGGAGTCACCGGATGGCGCCTTTGCGAGCGTATTCTTGCC

SEQ ID NO: 13 (proteína IVY C5.19)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQGGVSSLFQKLGVSITPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGFQMGLIEMIYKVYYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA

5

SEQ ID NO: 14 (nucleótido IV)

ATGGTGTTTACATTGGAGGATTTTCGTTGGAGACTGGCGGCAGACAGCTGGATAACAACCAAGATCA
AGTGTTAGAACAAGGAGGATTTGTCTAGTCTGTTCCAAAAGCTGGGAGTGTGAGTCACCCCAATCC
AGAAAATTGTGCTGTCTGGGGAGAATGGGTAAAAAATTGATATTCATGTCATCATCCCTTACGAG
GGACTCAGTGGTTTTTCAAATGGGTCTGATTGAAATGATCTTCAAAGTTGTTTACCCAGTGGATGA
TCATCATTTCAAGGTTATTCTCCATTATGGTACACTCGTTATTGACGGTGTGACACCAACATGA
TTGACTACTTTGGACGCCCTTACGAGGGAATTGCTGTGTTTACGGCAAGAAGATCACAGTTACT
GGAACCTCTGTGGAACGGCAACAAGATCATTGATGAGCGCCTGATCAACCCAGATGGTTCACTCCT
CTTCCGCGTTACTATCAATGGAGTCACCGGATGGCGCCTTTGCGAGCGTATTCTTGCC

10

SEQ ID NO: 15 (proteína IV)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQGGVSSLFQKLGVSITPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGFQMGLIEMIFKVYYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA

15

SEQ ID NO: 16 (nucleótido 15C1)

ATGGTGTTTACATTGAAGGATTTTCGTTGGAGACTGGCGGCAGACAGCTGGATAACAACCAAGATCA
AGTGTTAGAACAAGGAGGATTTGTCTAGTCTGTTCCAAAATCTGGGAGTGTGAGTCACCCCAATCC
AGAAAATTGTGCTGTCTGGGGAGAATGGGTAAAAAATTGATATTCATGTCATCATCCCTTACGAG
GGACTCAGTGGTTATCAAATGGGTGAGATTGAAAAGATCTTCAAAGTTGTTTACCCAGTGGATGA
TCATCATTTCAAGGTTATTCTCCATTATGGTACACTCGTTATTGACGGTGTGACACCAACATGA
TTGACTACTTTGGACGCCCTTACGAGGGAATTGCTGTGTTTACGGCAAGAAGATCACAGTTACT
GGAACCTCTGTGGAACGGCAACAAGATCATTGATGAGCGCCTGATCAACCCAGATGGTTCACTCCT
CTTCCGCGTTACTATCAATGGAGTCACCGGATGGCGCCTTTGCGAGCGTATTCTTGCC

20

SEQ ID NO: 17 (proteína 15C1)

MVFTLKDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGYQMGQIEKIFKVYYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 18 (nucleótido 9B8)

atgggtattcacactggaggatTTTgtcgggtgattggcggcCAAaccgctgggtacaaccaggacca
ggttctcgaacaagggggcctcagctccctgTTTcaaaaactgggtgtagcgTTacacctattc
aaaaaatcgtgctctccggggaaaacgggctcaaaaatcgatattcatgtgattatcccttacgaa
gggctctccgggtttcagatggggctgatcgaaatgatctTTaaggctgtctatcccgtagatga
tcaccacttcaaggatgctcctcactacgggaccctcgtaattgatggcgtgacccccaacatga
tcgactatTTTgggcgccttacgaggggattgctgtcttcgatggcaaaaaattacagtgaca

ggcacactctggaacgggaataagatcattgatgagcgctgattaatcccgatgggagcctgct
ctttcgggtgacaattaacggcgtaacaggctggcgcctctgtgaacggattctggcg

SEQ ID NO: 24 (nucleótido 9B8 opt)

atgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggacca
agtccctgagcagggcggctctgtccagTTTgtttcagaaactcgggggtgctccgtaaacccgatcc
aaaagattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtagaa
ggctctgagcggctatcagatggggccagatcgaaaaaattTTTtaagggtgggtgtaacctgtggatga
tcatcactTTAagggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggTTacgccaacatga
tcgactatTTTcggacggcctgatgaaggcatcgccgtgTTcgaacggcaaaaagatcactgtaacc
gggaccctgtggaacggcaaaaaattatcgacgagcgctgatcaaccocgacggctccctgct
gttccgcgtaaccatcaacgggagtgaccggctggcggctgtgagcagcgcattTTTggcg

5

SEQ ID NO: 25 (nucleótido 9B8 optB)

atgggtattcacactggaggatTTTgtcgggtgattggcggcCAAaccgctgggtacaacctcgacca
ggttctcgaacaagggggcctcagctccctgTTTcaaaaactgggtgtagcgTTacacctattc
aaaaaatcgtgctctccggggaaaacgggctcaaaaatcgatattcatgtgattatcccttacgaa
gggctctccgggtatcagatggggcagatcgaaaaaattTTTtaaggctgtctatcccgtagatga
tcaccacttcaaggatgctcctcactacgggaccctcgtaattgatggcgtgacccccaacatga
tcgactatTTTgggcgccttacgaggggattgctgtcttcgatggcaaaaaattacagtgaca
ggcacactctggaacgggaataagatcattgatgagcgctgattaatcccgatgggagcctgct
ctttcgggtgacaattaacggcgtaacaggctggcgcctctgtgaacggattctggcg

10

SEQ ID NO: 26 (nucleótido 8A3)

AtgggtgattacattggaggatTTTcgttgagactggcggcagacagctggatacaaccaagatca
agtgttagaacaaggaggagtgtctagtctgttccaaaagctgggagtgatcaatcaccccaatcc
agaaaattgtgctgtctggggagaatgggttaaaaattgatattcatgtcatcatcccttacgag
ggactcagtggTTTTcaaatgggtctgattgaaatgatcttcaaagttgTTTaccocagtggatga
tcatcatttcaaggTTattctccattatgggtacactcgTTattgacgggtgtgacaccaaacatga
ttgactactTTTggacgccttacgaggggaattgctgtgTTTgacggcaagaagatcacagTTact
ggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatgagcgctgatcaaccagatggTTcactcct
cttccgcgTTactatcaatgggagtcaccggatggcgcctTTTgagcagcgtattcttggc

15

SEQ ID NO: 27 (proteína 8A3)

MVITLEDVFGDWRQTAGYNQDQVLEQGGVSSLFQKLGVSITPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
GLSGFQMGLEIEMIFKVYVYVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCERILA

20

SEQ ID NO: 28 (nucleótido Luc2)

atggaagatgccaaaaacattaagaagggccagcgccattctacccaactcgaagacgggaccgc
 cggcgagcagctgcacaaagccatgaagcgctacgcccctgggtgcccggcaccatcgccctttaccg
 acgcacatatcgaggtggacattacctacgcccagtagtacttcgagatgagcgttcggctggcagaa
 gctatgaagcgctatgggctgaatacaaaaccatcggatcgtgggtgtgcagcagagaatagcttgca
 gttcttcatgcccgtgttgggtgcccctgttcatcgggtgtggctgtggccccagctaaccgacatct
 acaacgagcgcgagctgctgaacagcatgggcatcagccagcccaccgctcgtattcgtgagcaag
 aaagggctgcaaaagatcctcaacgtgcaaaagaagctaccgatcatacaaaagatcatcatcat
 ggatagcaagaccgactaccagggttccaaagcatgtacaccttcgtgacttcccatttgccac
 ccggcttcaacgagtagcacttcgtgcccagagcttcgaccgggacaaaaccatcgccctgatc
 atgaacagtagtggcagtagccgattgcccgaaggcgtagccctaccgcaccgcaccgcttggtgt
 ccgattcagtcatgcccgcgaccccatcttcggcaaccagatcaccocgacaccgctatcctca
 gcgtgggtgccatttcaccacggcttcggcatggtcaccacgctgggctacttgatctgcccgttt
 cgggtcgtgctcatgtaccgcttcgaggaggagctattcttgccgagcttgcaagactataagat
 tcaatctgcccctgctgggtgcccaactatttagcttcttcgctaagagcactctcatcgacaagt

acgacctaaagcaacttgcaacgagatcgccagcggcgggcgccgctcagcaaggaggtaggtgag
 gccgtggccaaacgcttccacctaccaggcatccgccagggctacggcctgacagaaacaaccag
 cgccattctgatcaccocgaaggggacgacaagcctggcgcagtaggcaagggtgggtgcccttct
 tcgaggctaagggtggtagcttggaacaccggtaagacactgggtgtgaaccagcgcggcgagctg
 tgcgtccgtggccccatgatcatgagcggctacggttaacaaccccgaggctacaaacgctctcat
 cgacaaggacggctggctgcacagcggcgacatcgccactgggacgaggacgagcacttcttca
 tcgtggaccggctgaagagcctgatcaaaatacaagggtaccaggtagccccagccgaactggag
 agcatcctgctgcaacacccccaacatcttcgacgcgggggtcgccggcctgcccgaacgacgatgc
 cggcgagctgcccgcgcagctcgtcgtgctggaacacggtaaaaccatgaccgagaaggagatcg
 tggactatgtggccagccaggttacaacccccaagaagctgcgcgggtgggtgttggtcgtggac
 gaggtgcctaaaggactgaccggcaagttggacgcccgaagatccgcgagattctcattaaggc
 caagaagggcggcaagatcgccgctt

SEQ ID NO: 29 (proteína Luc2)

medaknikkppapfypledgtageqlhkamkryalvpgtiaftdahievdiyayefemsvrlae
 amkryglntnhrivvcsenslqffmpvlgalfigvavapandiynerellnsmgisqptvvfvs
 kglqkilnvqkklpiiikiiimdsktdyqgfqsmytftshlppgfneydfvpesfdrdkti
 alimnssgstglpkgvalphrtacvrfshardpifgnqiipdtailsvvpfhhgfgmfttlgylic
 gfrvvlmyrfeeelflrslqdykiqsallvptlfsffakstlidkydlnltheiasggaplske
 vgeavakrfhlpgirqgygttetsailitpegddkpgavgkvvpffeakvvdldtgktlgvnqrg
 elcyrpmmimsyvnpeatnalidkdglhsgdiaywdedehffivdrkkslikykyqvapaele
 sillqhpni fdagvaglpdddagelpaavvvlehgkmttekeivdyvasqvttakklrggvfvd
 evpkgltgkldarkireilikakkggkiav

5

SEQ ID NO: 30 (nucleótido HRL (Renilla humanizada))

Atggcttccaaggtgtacgaccccgagcaacgcaaacgcatgatcactgggcctcagtgggtgggc
tcgctgcaagcaaatgaacgtgctggactccttcatcaactactatgattccgagaagcaacgccc
agaacgccgtgatTTTTTctgcatggtaacgctgcctccagctacctgtggaggcaacgctgctgct
cacatcgagcccgtggctagatgcatcctcctgatctgatcgggaatgggtaagtccggcaagag
cgggaatggctcatatcgctcctggatcactacaagtaacctaccgcttgggttcgagctgctga
accttccaaagaaaatcatcttTgtgggccacgactgggggcttTgtctggcctttcactactcc
tacgagcaccaagacaagatcaaggccatcgtccatgctgagagtgtcgtggacgtgatcgagtc
ctgggacgagtggcctgacatcgaggaggatatcgccctgatcaagagcgaagagggcgagaaaa
tggtgcttgagaataacttcttctgagaccatgctcccaagcaagatcatgcccgaactggag
cctgaggagtctgctgctacctggagccattcaaggagaagggcgaggttagacggcctaccct
ctcctggcctcgagatcctctctgtaagggaggcaagcccgcgctcctcagattgtccgca
actacaacgctaccttcgggccagcagcatctgcctaagatgttcctcagagtcaccctggg
ttcttttccaacgctattgtcagggagctaagaagtccctaaccagagttcgtgaaggtgaa
ggcctccacttcagccaggagcgtccagatgaaatgggtaagtacatcaagagcttctgtgg
agcgcgtgctgaagaacgagcag

SEQ ID NO: 31 (proteína HRL (Renilla humanizada))

MASKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNAASSYLWRHVVP
HIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKIIFVGHWDGACLAFHYS
YEQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEKMLENNFFVETMLPSKIMRKL
PEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVVQIVRNYNAYLRASDDLPMFIESDPG
FFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVGLHFSQEDAPDEMGKYIKSFVERVLKNEQ

5

SEQ ID NO: 32 (nucleótido de fusión tipo sándwich Id-HRL-HT7)

atgcttggctctgctcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggacgcgctgcccgcctt
gctggacgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcacgcctcaagg
agctgggtgcccacctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaate
gactacatcagggacctgcagctggagctgaactcggagctctgaagtcgggaccaccggaggccg

10

gggactgcctgtccgcgccccgctcagcaccctgaacggcgagatcagtgcccttgccggccgagg
 cggcatgtgttccagccgacgatcgcactcttgtgtcgcggttctcttgagaatctttatcttcag
 gcgtctggagggtggtggcggagcgcgatcgccatggcttccaaggtgtacgacccccgagcaacgcaa
 aocgatgatcactgggcctcagtggtgggctcgcctgcaagcaaatgaacgtgctggactccttca
 tcaactactatgattccgagaagcagccgagaacgcctgatttttctgcatggtaacgctgcc
 tccagctaacctgtggaggcagctcgtgcctcacatcgagcccgtggctagatgcatcatccctga
 totgatcggaatgggtaagtcgggcaagagcgggaatggctcatatcgctcctggatcaactaca
 agtacctcaccgcttgggtcagctgctgaaccttccaaagaaaatcatctttgtgggccaacgac
 tggggggcttgtctggccttctactactcctacgagcaccagacaagatcaaggccatcgtcca
 tgctgagagtgctcgtggacgtgatcagctcctgggacgagtgccctgacatcgaggaggatctcg
 cctgatcaagagcgaagaggggcgagaaaatggtgcttgagaataacttctctcgtcgagaccatg
 ctccaagcaagatcatgcggaactggagcctgaggagttcgcctgacctggagccattcaa
 ggagaagggcgagggttagacggcctaccctctcctggcctcgcgagatccctctcgtaagggag
 gcaagcccgcagctcgtccagattgtccgcaactacaacgcctacctcggggccagcgcagatctg
 cctaagatggttcacgcagctcagacctgggttcttttccaacgctattgtcgaggggagctaagaa
 gttccctaacaccgagttcgtgaaggtgaaggccctccactcagccaggaggacgctccagatg
 aaatgggtaagtacatcaagagctcgtggagcgcgctgctgaagaacgagcaggtttctctcgag
 ccaaccactgaggatctgtactttcagagcgataacgatggatccgaaatcgggtactggcttcc
 attcgacccccattatgtggaagtcctgggagcgcgatgcaactacgtcagatggtgggtccgcg
 atggcaccctcgtgctgttctcgcacggtaacccgacctcctcctacgtgtggcgcaacatcctc
 ccgcagtttgaccgacccatcgcctgcatgctccagacctgatcgggatgggcaaatccgacaa
 accagacctgggttatttcttcgacgaccaogtccgcttcatggatgccttcatcgaagccctgg
 gtctggaagaggctcgtcctggctattcagcactggggctccgctctgggtttccactgggccaag
 cgcaatccagagcgcgctcaaaggtattgcatttatggagttcatccgacctatcccgacctggga
 cgaatggccagaatttgcccgcgagaccttccaggccttccgcaccaccgacgtcggcccgcaagc
 tgatcatcgatcagaacggttttatcgagggtacgctgcgatgggtgctcgcgcccgctgact
 gaagtcgagatggaccattaccgcgagcggcttctgaaatcctggttgaccgcgagccactgtggcg
 cttcccaaacgagctgccaatcgcgggtgagccagcgaacatcgtcgcgctgggtcgaagaataca
 tggactggctgaccagtcacctgtcccgaagctgctgttctggggcaccaccaggcgttctgatc
 ccaccggccgaagccgctcgcctggccaaaagcctgcctaactgcaaggctgtggacatcggccc
 gggctggaatctgctgcaagaagacaaccggacctgatcggcagcgcgagatcgcgcgctggctgt
 ctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 33 (proteína de fusión tipo sándwich Id-HRL-HT7)

MLGLSEQSVSISRCACTRLPALLDEQQVNVLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVSKEILQHVI
 DYIRDLQLELNSESEVGTGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLNLYFQ
 ASGGGGGAIAMASKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNA
 SSYLWRHVPHIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELNLPKKIIFVGH
 WGACLAHFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEKGMVLENNFFVETM
 LPSKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVVQIVRNYNAYLRASDDL
 PKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVKGHLHFSQEDAPDEMGKYIKSFVERVLKNEQVSLE
 PTTEDLYFQSDNDGSEIGTGFFDPHYVEVLGERMHYVDVGPDRDGPVLFHGNPTSSYVWRNI
 PHVAPTHRCIAPDLIGMGKSDKPDLDGYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLLVIHDWGSALGFHWAK
 RNPFRVKGIAFMFIRPIPTWDEWPEFARETFOAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVVRPLT
 EVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLI
 PPAEAARLAKSLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 34 (nucleótido de fusión 8A3-HT7)

atggtgattacattggaggatttcggttgagactggcggcagacagctggatacaaccaagatca
agtgttagaacaaggaggagtgtctagctgttccaaaagctgggagtgatcaatcaccccaatcc
agaaaattgtgctgtctggggagaatgggttaaaaattgatattcatgtcatcatcccttacgag
ggactcagtgggttttcaaattgggtctgattgaaatgatcttcaaagtggtttaccagtggtga
tcatcatttcaagggttatctccattatggtacactcgttattgacggtgtgacaccaaacatga

ttgactactttggacgccccttacgaggggaattgctgtggtttgacggcaagaagatcacagttact
ggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatgagcgcctgatcaaccagatggttcaactcct
cttccgcgttactatcaatggagtcaccggatggcgcctttgagagcgtattottgccggatatac
tcgagccaaccactgaggatctgtactttcagagcgataacgatggatccgaaatcggtaactggc
tttccattcagacccccattatgtggaagtcctggggcagcgcactacgtcgtggtggcc
gagcgtggcaaccctgtgctgttccctgcacggtaaccgcacctcctcctacgtgtggcgcaaca
tcatcccgcatgttgcaaccgacctatcgtgcatgctccagacctgatcggatgggcaaatcc
gacaaaccagacctgggttatttcttcagacgaccacgtccgcttcgatggatgccttcacgaagc
cctgggtctggaagaggtcgtcctgggtcattcacgaactggggctccgctctgggtttccactggg
ccaagcgcaatccagagcgcgtcaaaggattgcatttatggagttcaccgcccctatcccgacc
tgggacgaatggccagaatttgcctcgcgagaccttccaggccttccgcaccaccgacgtcggccg
caagctgatcactcagatcagaacgtttttatcgagggtagctgcccgatgggtgtcgtccgcccgc
tgactgaagtcgagatggaccattaccgagcgcgttccctgaatcctggtgaccgagaccactg
tggcgttcccaaacgagctgccaatgcgggtgagccagcgaacatcgtcgcgctggtcgaaga
atacatggactggctgcaccagtcctcctgtcccgaagctgctgttctggggcaccaccagcgttc
tgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaaagcctgcetaactgcaaggctgtggacatc
ggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaaccggacctgatcggcagcagatcgcgcgctg
gctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 35 (proteína de fusión 8A3-HT7)

MVITLEDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQGGVSSLFQKLGVSITPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGFQMGLEMIKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSELLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTG
FPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMKS
DKPDLGYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMFIRPIPT
WDEWPEFARETFQAFRTTQVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPL
WRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIIPAEARLAKSLPNCKAVDI
GPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 36 (nucleótido de fusión 9B8-HT7)

ES 2 567 410 T3

atgggtgtttacattggaggatttcggtgggagactggcggcagacagctggatacaaacctagatca
agtgttagaacaaggaggattgtctagtctgttccaaaagctgggagtgctcagtcaccccattcc
agaaaattgtgctgtctggggagaatgggttaaaaattgatattcatgtcatcatccottacgag
ggactcagtggttatcaaattgggtcagattgaaaagatcttcaaagttgtttaccagtggtatga
tcatcatttcaaggttattctccattatggtacactcgttattgacgggtgtgacaccaaacaatga
ttgactactttggacgoccttacgaggaattgctgtgtttgacggcaagaagatcacagttact
ggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatgagcgcctgatcaaccagatgggttactcct
cttccgcggtactatcaatggagtcaccggatggcgcctttgcgagcgtattcttgcocggatatac
tcgagccaaccactgaggatctgtactttcagagcgataacgatggatccgaaatcggtagctggc
tttccattcagaccccattatgtggaagtcctggggcagcgcgatgcactacgtcagtggtggcc
gcgcgatggcaccctgtgctgttctcgcaggttaaccgacctcctcctacgtgtggcgcaaca
tcatcccgcagtggtgcaaccgacctcgcctgcatgtccagacctgatcgggatgggcaaatcc
gacaaaccagacctgggttatttcttcgacgaccacgtccgcttcatggatgccttcatcgaagc
cctgggtctggaagaggtcgtcctggtcattcaagactggggctccgctctgggtttccactggg
ccaagcgcaatccagagcgcgctcaaaggtattgcatttatggagttcatccgccctatcccgacc
tgggacgaatggccagaatttgcccgcgagacctccagggccttccgcaccaccgacgtcggccg
caagctgatcagatcagaacgtttttatcagaggtacgctgccgatgggtgtcgtccgcccgc
tgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccgttctgaatcctggtgaccgcgagccactg
tggcgttcccaaaccagctgccaatcgccgggtgagccagcgaacatcgtcgcgctgggtcgaaga
atacatggactggctgcaccagtcacctgcccgaagctgctgttctggggcaccaccagggcttc
tgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaaagcctgctaactgcaaggtgtggacatc
ggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaaccggacctgatcggcagcgagatcgcgcgctg
gctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 37 (proteína de fusión 9B8-HT7)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGYQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMI DYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTG
FPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGPVLFHLGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMGKS
DKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNP ERVKGI AFMEFIRPIPT
WDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPL
WRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIIPAEARLAKSLPNCKAVDI
GPGLNLLQEDNPD LIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 38 (nucleótido de fusión 9F6-HT7)

atggtgtttacattggaggatttcggttgagactggcggcagacagctggatacaacctagatca
 agtggttagaacaaggaggagtgtctagctctgttccaaaagctgggagtgtcaatcaccccaatcc
 agaaaattgtgctgtctggggagaatgggttaaaaaattgatattcatgtcatcatcccttacgag
 ggactcagtgggtatcaaattgggtcagattgaaaagatcttcaaagttgtttaccagtggtatga
 tcatcatttcaaggttattctccattatggtacactcgttattgacgggtgtgacaccaaacaatga
 ttgactacttttgacgcecttacgaggggaattgctgtgtttgacggcaagaagatcacagttact
 ggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatgagcgcctgatcaaccagatggttcactcct
 ctcccgcttactatcaatggagtcaccggatggcgcctttgcgagcgtattcttgccggatate
 tcgagccaaccactgaggatctgtactttcagagcgataacgatggatccgaaatcggtagtggc
 tttccattcgaacccccattatgtggaagtcctggggcagcgcgatgcactacgtcgatgttggtcc
 gcgcgatggcaccctgtgctgttctcgcaggtaaccgcacctcctcctacgtgtggcgcaaca
 tcatcccgcatgttgcaaccgaccatcgcctgcatgtccagacctgatcggatgggcaaatcc
 gacaaaccagacctgggttatttcttcgacgaccacgtccgcttcatggatgccttcacgaagc
 cctgggtctggaagaggctcgtcctggtcattcaagactggggctccgctctgggtttccactggg
 ccaagcgcaatccagagcgcgtcaaaggatttgcatttatggagttcatccgcctatcccgacc
 tgggacgaatggccagaatttgcgcgcgagacctccaggccttcgcaccaccgacgtcggccg
 caagctgatcatcgatcagaacgtttttatcgagggtagcctgcccgatgggtgtcgtccgcccgc
 tgaactgaagtcgagatggaccattaccgcgagcgcctcctgaatcctggtgaccgcgagccactg
 tggcgttcccaaacgagctgccaatcgcgcggtgagccagcgaacatcgtcgcgctggtcgaaga
 atacatggaactggctgcaccagtccctgtcccgaaagctgctgttctggggcaccaccaggcgttc
 tgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaaagcctgcctaactgcaaggctgtggacatc
 ggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaaccggacctgatcggcagcgcgagatcgcgcgctg
 gctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 39 (proteína de fusión 9F6-HT7)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQKLGVSITPIQKIVLSGENGLKIDIHVILPYE
 GLSGYQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTG
 FPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPDRDGPVFLFHGNPTSSYVWRNII PHVAPTHRCIAPDLIGMGKS
 DKPDLGYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNP ERVKGIAFM EFIRPIPT
 WDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPL
 WRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLI PPAAEARLAKSLPNCKAVDI
 GPGLNLLQEDNPD LIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 40 (nucleótido de fusión tipo sándwich Id-9B8 opt-HT7)

atgcttggtctgtcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggaacgcgcctgccgcctt
 gctggaacgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcaagcctcaagg
 agctgggtgcccaccctgcccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaatc
 gactacatcagggacctgcagctggagctgaactcggagctctgaagtcgggaccaccggaggccg
 gggactgctgtccgcgcccgcctcagcaccctgaacggcgagatcagtgccctggcgccgagg
 cggcatgtgttccagccgacgatcgcattctgtgtcgcgtttctcttgagaatctttattttcag

10

gcgctctggaggtggtggcggagcgatcgccatggtggttacactcgaagatttcgtaggggactg
 gcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtctgtccagtttgtttc
 agaaactcgggggtgtccgtaacaccgatccaaaagattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaag
 atcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggctatcagatgggcccagatcgaaaa
 aatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacac
 tggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgcc
 gtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacga
 gcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggc
 ggctgtgagcggtattcttgccggatctctcgagccaaccactgaggatctgtactttcagagc
 gataacgatggatccgaaatcgggtactggctttccattcgacccccattatgtggaagtcctggg
 cgagcgcactacgtcgatggtggctccgcgcgatggcaccctgtgctgttctgcacggta
 acccgacctcctcctacgtgtggcgcaacatcatcccgcatggttgaccgacccatcgctgcatt
 gctccagacctgatcggtatgggcaaatccgacaaaccagacctgggttattttctcgacgacca
 cgctccgcttcatggatgcttcatcgaaagccctgggtctggaagaggtcgctcctggctcattcacg
 actggggctccgctctgggtttccactgggccaagcgcaatccagagcgcgtcaaaggtattgca
 tttatggagttcatccgccctatcccgacctgggacgaatggccagaatgtgcccgcgagacctt
 ccaggecttccgcaccaccgacgtcggccgcaagctgatcagatcagaacgtttttatcgagg
 gtacgctgcccgatgggtgtcgtccgcccgtgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
 ttctgaaatcctgttgaccgcgagccactgtggcgttcccaaacgagctgccaatcgccgggtga
 gccagcgaacatcgctcgcgctggctcgaagaatacatggactggctgcaccagtcctctgcccga
 agctgctgttctggggcaccocaggcgttctgatcccaccggccgaagccgctcgccctggccaaa
 agcctgcctaactgcaaggctgtggacatcgggccgggtctgaatctgctgcaagaagacaaccc
 ggacctgatcggcagcgagatcgcgcgctggctgtctactctggagatttccggtt

SEQ ID NO: 41 (proteína de fusión tipo sándwich Id-9B8 opt-HT7)

MLGLSEQSVSISRCACTRLPALLDEQQVNVLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVSKEILQHVI
 DYIRDLQLELNSESEVGTGGRRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLNLYFQ
 ASGGGGGAIAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGLSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLK
 IDIHVIIIPYEGLSGYQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIIDYFGRPYEGIA
 VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQS
 DNDGSEIGTGFPDFPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGPVFLHGNPTSSYVWRNII PHVAPTHRCI
 APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNP ERVKGIA
 FMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREP
 FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLI PPAAEARLAK
 SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 42 (nucleótido 9B8 opt+K33N)

Atggtggttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggacca
 agtccttgagcagggcggtctgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaacaccgatcc
 aaaagattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
 ggtctgagcggctatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatga
 tcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
 tcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacc
 gggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgct
 gttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgagcagcgcatttttgggc

10

SEQ ID NO: 43 (proteína 9B8 opt+K33N)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQQGLSSLFQNLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
 GLSGYQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 44 (nucleótido QC27-HT7)

atgggtgtttacattggaggatttcggttgagactggcggcagacagctggatacaaacctagatca
 agtgtagaacaaggaggattgtctagctctgttccaaaagctgggagtgctcagtcaccccaatcc
 agaaaattgtgctgtctgaggagaatgggttaaaaattgatattcatgtcatcatcccttaagag
 ggactcagtggttttcaaattgggtctgattgaaatgatcttcaaagttggttaccacagtgatga
 tcatcatttcaagattattcaccattatggtacactcgttattgacgggtgtgacaccaaacatga
 ttgacttctttggacgcccttaagaggaattgctgtgtttgacggcaagaagatcacagttact
 ggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatgagcgcctgatcaacceagatggttcaactcct
 cttccgcggttactatcaatggagtcaccggatggcgcctttgagagcgtattcttgcgggatc
 tcgagccaaccactgaggatctgtaacttcagagcgataaacgatggatccgaaatcgggtactggc
 tttccattcgacccccattatgtggaagtcctgggagcgcgcactacgtcgatggttggtcc
 ggcgcatggcaccctgtgctgttctgcaaggtaaccogacctcctcctacgtgtggcgaaca
 tcatcccgcatggtgcaccgacccatcgctgcattgctcagacctgatcgggatgggcaaacc
 gacaaaccagacctgggttatttcttcgacgaccacgtccgcttcatggatgccttcacgaagc
 cctgggtctggaagaggtcgtcctggtcattcaccgactggggctccgctctgggtttccactggg
 ccaagcgcaatccagagcgcgtcaaaggtattgcatttatggagttcatccgccctatcccgacc
 tgggacgaatggccagaatttgcccgagacacctccaggccttcgcaccaccgacgctcggccg
 caagctgatcatcgatcagaacgtttttatcgagggtacgctgcccgatgggtgtcgtccgcccgc
 tgactgaagtcgagatggaccattaccgagcgcgttctgaatcctgttgaccgagccactg
 tggcgttcccaaacgagctgccaatcgccgggtgagccagcgaacatcgctcgcgctggtcgaaga
 atacatggactggctgcaccagtcctcctgtcccgaaagctgctgttctggggcaccaccagcgttc
 tgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaaagcctgcctaactgcaaggctgtggacatc
 ggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaaccgggaactgatcggcagcagatcgcgcgctg
 gctgtctactctggagatttccgggt

5

SEQ ID NO: 45 (proteína QC27-HT7)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQQGLSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
 GLSGFQMGLEIEMIFKVVYPVDDHHFKIIHHYGTLLVIDGVTNPMIDFFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTG
 FPFDPHYVEVLGERMHYVDVGRDGTPLVFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMKS
 DKPDLGYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPFRVKGIAFMFIRPIPT
 WDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPL
 WRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIIPAEARLAKSLPNCKAVDI
 GPGLNLLQEDNPDLLIGSEIARWLSTLEISG

10

SEQ ID NO: 46 (8F2)

atgggtgtttacattggaggatttcggttgagactggcggcagacagctggatacaaccaagatca
 agtgtagaacaaggaggagtgtctagctctgttccaaaagctgggagtgctcagtcaccccaatcc
 agaaaattgtgctgtctgaggagaatgggttaaaaattgatattcatgtcatcatcccttaagag
 ggactcagtggttttcaaattgggtctgattgaaatgatcttcaaagttggttaccacagtgatga
 tcatcatttcaaggttattctccattatggtacactcgttattgacgggtgtgacaccaaacatga
 ttgactactttggacgcccttaagaggaattgctgtgtttgacggcaagaagatcacagttact
 ggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatgagcgcctgatcaacceagatggttcaactcct
 cttccgcggttactatcaatggagtcaccggatggcgcctttgagagcgtattcttgc

15

SEQ ID NO: 47 (proteína 8F2)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQGGVSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
 GLSGFQMGLIEMI FKV VY PVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 48 (nucleótido IV-HT7)

5

atgggtgtttacattggaggatttcgttggagactggcggcagacagctggatacaaccaagatca
 agtggttagaacaaggaggattgtctagctctgttccaaaagctgggagtgctcagtcacccaatcc
 agaaaattgtgctgtctgggggagaatgggttaaaaattgatattcatgtcatcatcccttacgag

ggactcagtggttttcaaattgggtctgattgaaatgatcttcaaagttggtttacccagtggtatga
 tcatcatttcaaggttatttctccattatggtacactogttattgacgggtgtgacaccaaacatga
 ttgactactttggacgcccttacgaggggaattgctgtgtttgacggcaagaagatcacagttact
 ggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatgagcgcctgatcaaccagatggttactcct
 ctcccgcttactatcaatggagtcaccggatggcgcctttgcgagcgtattcttgcggatatac
 tcgagccaaccactgaggatctgtactttcagagcgcataacgatggatccgaaatcggtactggc
 tttccattcgacccccattatgtggaagtctctggggcagcgcacactacgtcgatggttgggtcc
 gcgagatggcaccctgtgctgttctgcacggtaaccgcacctcctcctacgtgtggcgcaaca
 tcatcccgcagtttgcaccgaccatcgctgcattgctccagacctgatcggatggttcaatcc
 gacaaaccagacctgggttatttcttcgacgaccacgtccgcttcatggatgcttcatcgaagc
 cctgggtctggaagaggtcgtcctggctcattcacgactggggctccgctctgggtttccactggg
 ccaagcgcattccagagcgcgtcaaaggtattgcatttatggagttcatccgcctatcccgcacc
 tgggacgaatggccagaatttgcccgcgagaccttccaggccttccgcaccaccgacgtcggccg
 caagctgatcatogatcagaacgtttttatcgagggtaacgctgcagatgggtgtcgtccgcccgc
 tgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccgttctgaatcctggtgaccgcgagccactg
 tggcgttcccaaacgagctgccaatcgccgggtgagccagcgaacatcgctcgcgctggctogaaga
 atacatggactggctgcaccagtcacctgtcccgaagctgctgttctggggcaccaccaggcgttc
 tgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaaagcctgcctaactgcaaggctgtggacatc
 ggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaaccggacctgatcggcagcagatcgcgcgctg
 gctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 49 (proteína IV-HT7)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQGGSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
 GLSGFQMGLIEMI FKV VY PVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTG
 FPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGPVFLFLHGNPTSSYVWRNIIIPHVAPTHRCIAPDLIGMGKS
 DKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLIHDWGSALGFHWAKRNP ERVKGIAFMEFIRPIPT
 WDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPL
 WRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLI PPAAEARLAKSLPNCKAVDI
 GPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

10

SEQ ID NO: 50 (nucleótido 8F2-HT7)

atggtgtttacattggaggatttcggtggagactggcggcagacagctggatacaaccaagatca
 agtgtagaacaaggaggagtgtctagctgttccaaaagctgggagtgtcagtcaccccattcc
 agaaaattgtgctgtctggggagaatgggttaaaaattgatattcatgtcatcatcccttacgag
 ggactcagtggttttcaaattgggtctgattgaaatgatcttcaaagttggttaccagtggatga
 tcatcatttcaaggttattctccattatggtacactcgttattgacgggtgtgacaccaaactga
 ttgactactttggacgccttacgaggaattgctgtgtttgacggcaagaagatcacagttact
 ggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatgagcgcctgatcaaccagatggttcactcct
 ctccgcggttactatcaatggagtcacccggatggcgcctttgcgagcgtattcttgcggatatac
 tcgagccaaccactgaggatctgtactttcagagcagataacgatggatccgaaatcgggtactggc
 tttccattcgacccccattatgtggaagtcctgggagcgcgatgcactacgtcgatgttggtcc
 gcgagatggcaaccctgtgctgttctgcacggtaaccgacctctcctacgtgtggcgcaaca
 tcatcccgcatgttgacaccgacctcgcctgattgctccagacctgatcggtatgggcaaatcc
 gacaaaccagacctgggttatttcttcgacgaccacgctccgcttcatggatgccttcatcgaagc
 cctgggtctggaagaggtcgtcctggtcattcacgactggggctccgctctgggtttccactggg
 ccaagcgcaatccagagcgcgtcaaaggtattgcatttatggagttcatccgccctatcccgacc
 tgggacgaatggccagaatttgcccgagacctccaggcctccgcaccaccgacgctcggccg
 caagctgatcatcgatcagaacgtttttatcgagggtagcctgcccgatgggtgctcgtccgcccgc
 tgactgaagtcgagatggaccattaccgagcgccttctgaatcctggtgaccgagaccactg
 tggcgttcccaaacgagctgccaatcgccggtgagccagcgaacatcgtcgcgctggtcgaaga
 atacatggactggctgcaccagctccctgtcccgaaagctgctgttctggggcaccaccaggcgttc
 tgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaaagcctgcctaactgcaaggctgtggacatc

ggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaaccocggacctgatcggcagcagatcgcgctg
 gctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 51 (proteína 8F2-HT7)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQGGVSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
 GLSGFQMGLIEMIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGNKIIDERLINPDGSELLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTG
 FPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGPVFLFHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMGKS
 DKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPBRVKGIAFMFIRPIPT
 WDEWPEFARETFFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPL
 WRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIIPAEAAARLAKSLPNCKAVDI
 GPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 52 (nucleótido 15C1-HT7)

atggtggtttacattgaaggatttcggttgagactggcggcagacagctggatacaaccaagatca
 agtgttagaacaaggaggattgtctagtctgttccaaaatctgggagtgtcagtcaccccaatcc
 agaaaattgtgctgtctggggagaatgggttaaaaattgatattcatgtcatcatcccttacgag
 ggactcagtggttatcaaattgggtcagattgaaaagatcttcaaagttggtttaccagtggtga
 tcatcatttcaaggttattctccattatggtacactcgttattgacgggtgtgacaccaaacaatga
 ttgactactttggacgcccttacgaggggaattgctgtgtttgacggcaagaagatcacagttact
 ggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatgagcgcctgatcaaccagatggttcactcct
 ctcccgcttactatcaatggagtcaccggatggcgctttgagagcgtattcttgccggatate
 tcgagccaaccactgaggatctgtactttcagagcgataacgatggatccgaaatcggtactggc
 tttccattcgaacccccattatgtggaagtcctggggcagcgcgatgcactacgtcagtggtggtcc
 gcgcgatggcaccctgtgctgttctcgcaggtaaccgacctcctcctacgtgtggcgcaaca
 tcatcccgcatgttgcaaccgaccatcgtcgcattgctccagacctgatcggatggggcaaatcc
 gacaaaccagacctgggttatttcttcgacgaccacgtccgcttcatggatgccttcacgaage
 cctgggtctggaagaggctcctcctggtcattcacgactggggctccgctctgggtttccactggg
 ccaagcgcaatccagagcgcgtcaaaggattgcaattatggagttcatccgccctatcccgacc
 tgggacgaatggccagaatttgcgcgcgagacctccaggccttcgcaccaccgacgtcggccg
 caagctgatcatcgatcagaacgtttttatcgagggtaacgctgcgatgggtgtcgtccgcccgc
 tgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccgcttctgaatcctggttgaccgcgagccactg
 tggcgttcccaaacgagctgccaatcgcgggtgagccagcgaacatcgtcgcgctggtcgaaga
 atacatggactggctgcaccagtcacctgctccgaagctgctgttctggggcaccaccaggcgttc
 tgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaaagcctgcctaactgcaaggctgtggacatc
 ggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaaccggacctgatcggcagcgagatcgcgcgctg
 gctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 53 (proteína 15C1-HT7)

MVFTLKDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQGGLSSLFQNLGVSVTPPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
 GLSGYQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTG
 FPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMGKS
 DKPDLGYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMFIRPIPT
 WDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPL
 WRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIIPAEARLAKSLPNCKAVDI
 GPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 54 (Péptido de señal de secreción OgLuc) *Oplophorus gracilirostris*

atggcttactccacactggttcattcattgctctcacagccgctcgtaacacaagcctcctccacaca
 gaaaagcaacctgaca

10

SEQ ID NO: 55 (nucleótido de fusión tipo sándwich Id-C1A4E-HT7)

atgcttgggtctgtcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggacgcgcctgcccgcctt
gctggacgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcaecgctcaagg
agctgggtgcccaccctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaatc
gactacatcagggacctgcagctggagctgaactcggagctctgaagtcgggaccaccggaggccg
gggactgcctgtccgcgccccgctcagcaccctgaacggcgagatcagtccttggcggccgagg
cggcatgtgttccagccgacgatcgcactcttgtgtcgcgcttctcttgagaatctttatctcag
gcgtctggaggtgggtggcggagcgatcgccatgggtgtttacattggaggatttcgttggagactg
gcggcagacagctggatacaaccaagatcaagtgttagaacaaggaggattgtctagtctgttcc
aaaagctgggagtgctcagtcaccccaatccagaaaattgtgctgtctggggagaatgggttaaaa
tttgatattcatgtcatcatcccttacgagggactcagtggttttcaaattgggtctgattgaaat
gatcttcaaagtgtttaccagtggtgatcatcatttcaagattattctccattatggtacac
tcgttattgacgggtgtgacaccaaacatgattgactactttggaacgcccttacgaggggaattgct
gtgtttgacggcaagaagatcacagttactggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatga
gcgcctgatcaaccagatggttcactcctcttccgcggtactatcaatggagtcaccggatggc
gcctttgcgagcgtattcttgcggatctctcgagccaaccactgaggatctgtactttcagagc
gataacgatggatccgaaatcgggtactggcttccattcgcaccccccattatgtggaagtcctggg
cgagcgcgatgcactacgtcgatgttggteccgcgcgatggcaccctgtgctgttctgcacggta
accgcacctcctcctacgtgtggcgcaacatcctccgcgatgttgcaccgaccctcgcctgcatt
gctccagacctgatcggatgggcaaatccgacaaaccagacctgggttatttcttcgacgacca
cgtccgcttcatggatgccttcatcgaagccctgggtctggaagaggctcctcctgggtcattcacg
actggggctccgctctgggtttccactgggccaagcgcaatccagagcgcgtcaaaggtattgca
tttatggagttcatccgacctatcccgacctgggacgaatggccagaatttgcccgcgagacctt
ccaggccttccgcaccaccgacgtcggccgcaagctgatcctcagatcagaacgtttttatcgagg
gtacgctgccgatgggtgtcgtccgcccgtgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
ttcctgaatcctgttgaccgcgagccactgtggcgccttcccaaacgagctgccaatcgcgggtga
gccagcgaacatcgtcgcgctgggtcgaagaatacatggactggctgcaccagtcacctgtccga
agctgctgttctggggcaccaccaggcgttctgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaa
agcctgcctaactgcaaggtctgtggacatcggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaacc
ggacctgatcggcagcgagatcgcgcgctggctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 56 (proteína de fusión tipo sándwich Id-C1A4E-HT7)

MLGLSEQSVSISRCACTRLPALLDEQQVNVLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVSKEIILQHVI
DYIRDLQLELNSESEVGTGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLLENLYFQ
ASGGGGGAIAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQQGLSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLK
FDIHVILPYEGLSGFQMGLIEMI FKVVYPVDDHHFKIILHYGTLVIDGVTPNMI DYFGRPYEGIA
VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSLEPTTEDLYFQS
DNDGSEIGTGFPDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGT PVLFLHGNPTSSYVWRNII PHVAPTHRCI
APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNP ERVKGIA
FMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREP
FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLI PPAAEARLAK
5 SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

SEQ ID NO: 57 (nucleótido de fusión tipo sándwich Id-IV-HT7)

ES 2 567 410 T3

atgcttgggtctgtcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggacgcgcctgccgcctt
gctggacgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcagcctcaagg
agctgggtgcccaccctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaac
gactacatcagggacctgcagctggagctgaactcggagctctgaagtcgggaccaccggaggccg
gggactgcctgtccgcgccccgcctcagcaccctgaacggcgagatcagtgccctggcgggccgagg
cggcatgtgttccagcgcagcatcgcactcttgtgtcgcgttctcttgagaatctttatcttcag
gctctggaggtggtggcgagcgatcgccatggtgtttacattggaggatttcgctggagactg
gcggcagacagctggatacaaccaagatcaagtggttagaacaaggaggattgtctagtctgttcc
aaaagctgggagtgctcagtcacccaatccagaaaattgtgctgtctggggagaatgggttaaaa
attgatattcatgtcatcatcccttacgagggactcagtggttttcaaatgggtctgattgaaat

gatcttcaaaagttgtttaccagtggtgatcatcatttcaaggttattctccattatggtacac
tcgttattgacgggtgtgacaccaaacatgattgactactttggacgcccttacgaggggaattgct
gtgtttgacggcaagaagatcacagttactggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatga
gcgcctgatcaaccagatggttccactcctctcgcgcttactatcaatggagtcaccggatggc
gcctttgcgagcgtattcttgcgcttctctcgcgagccaaccactgaggatctgtaacttccagagc
gataacgatggatccgaaatcggtaactggcttccattcgacccccattatgtggaagtcctggg
cgagcgcactgactacgtcagtggttggctccgcgcgatggcaccctgtgctgttccctgcacggta
accgacctcctcctacgtgtggcgcaacatcatcccgcatgttgcaccgaccatcgctgcatt
gctccagacctgatcggtatgggcaaatccgacaaaccagacctgggttatttcttcgacgacca
cgtccgcttccatggatgccttccatcgaagccctgggtctggaagaggtcgtcctgggtcattcag
actggggctccgctctgggtttccactgggccaagcgaatccagagcgcgctcaaaggatttgca
tttatggagttccatccgcctatcccagacctgggacgaatggccagaatttgcccgcgagacctt
ccaggccttccgaccaccgacgtcggccgcaagctgatcagatcagaacgtttttatcgagg
gtacgctgccgatgggtgtcgtccgcgctgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
ttcctgaatcctgttgaccgcgagccactgtggcgttcccaaacgagctgccaatcgccgggtga
gccagcgaacatcgtcgcgctggtcgaagaatacatggactggctgcaccagtcacctgtcccg
agctgctgttctggggcaaccagcgttctgatcccaccggcgaagccgctcgcctggccaaa
agcctgcctaactgcaaggtgtggacatcgcccggtctgaatctgctgcaagaagacaacc
ggacctgatcggcagcagatcgcgcgctggctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 58 (proteína de fusión tipo sándwich Id-IV-HT7)

MLGLSEQSVSISRCACTRLPALLDEQQVNVLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVSKEILQHVI
DYIRDLQLELNSESEVGTGGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLNLYFQ
ASGGGGAIAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNQDQVLEQQGLSSLFQKLGVSVPPIQKIVLSGENGLK
IDIHVII PYEGLSGFQMGLIEMIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIIDYFGRPYEGIA
VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAVSLEPTTEDLYFQS
DNDGSEIGTGFPDPHYVEVLGERMHYVDVGPDRDGPVFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCI
APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLIHDWGSALGFHWAKRNPERSKGI
FMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREP
FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIIPAEARLAK
SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 59 (nucleótido de fusión tipo sándwich Id-9B8 opt+K33N-HT7)

atgcttgggtctgtcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggacgcgcctgccgcctt
gctggacgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcacgcctcaagg
agctggtgcccaccctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaatc
gactacatcagggacctgcagctggagctgaactcggagctotgaagtcgggaccaccggaggccg
gggactgcctgtccgcgccccgctcagcaccctgaacggcgagatcagtgccctggcgccgagg
cggcatgtgttccagccgacgatcgcactcttgtgtcgcgtttctcttgagaatctttatttcag
gctctggaggtggtggcggagogatcggcatggtgtttacactogaagatttcgtaggggactg
gcggcagacagccggtacaacctggaccaagtccttgagcagggcggctgtccagtttgttc
agaatctcgggggtgtccgtaacaccgatccaaaagattgtcctgagcggtgaaaacggcctgaag
atcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctctgagcggctatcagatgggccagatcgaaaa
aatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcaactatggcacac
tggaatcgacgggggttacgcccgaacatgatcgaactatttcggacggccgatgaaggcatcgc
gtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacga
gcgctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggc
ggctgtgcgagcgcattttggcgggatctctcgagccaaccactgaggatctgtactttcagagc
gataacgatggatccgaaatcggtaactggctttccattcgacccccattatgtggaagtcctggg
cgagcgcactacgtcgaatgttggctccgcgcatggcaccctgtgctgttccctgcacggta
accgacccctcctacgtgtggcgcaacatcatcccgcattgtgcaccgaccatcgcctgcatt
gctccagacctgatcggatgggcaaatccgacaaaccagacctgggttattttcttcgacgacca
cgtecgcttcattggatgccttcacogaagccctgggtctggaagaggtcgtcctgggtcattcaag

actggggctccgctctgggtttccactgggccaagcgaatccagagcgcgtcaaaggtattgca
tttatggagttcatccgccctatcccgaacctgggacgaatggccagaatttgcccgcgagacctt
ccaggccttccgcaccaccgacgtcggccgcaagctgatcatcgatcagaacgtttttatcgagg
gtacgctgcccgatgggtgtcgtccgcccgtgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
ttcctgaatcctgttgaccgcgagccactgtggcgttcccaaacgagctgccaatcgccggtga
gccagcgaacatcgtcgcgctggtogaagaatacatggactggctgcaccagtcacctgtcccga
agctgctgttctggggcaccaccagcgttctgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaa
agcctgcctaactgcaaggctgtggacatcggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaacc
ggacctgatcggcagcagatcgcgcgctggctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 60 (proteína de fusión tipo sándwich Id-9B8 opt+K33N-HT7)

MLGLSEQSVSISRCACTRLPALLDEQQVNVLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVSKEILQHVI
DYIRDLQLELNSESEVGTGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLNLYFQ
ASGGGGGAIAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGSSLFQNLGVSVTPIQKIVLSGENGLK
IDIHVIIPEGLSGYQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIIDYFGRPYEGIA
VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTVINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQS
DNDGSEIGTGFPDPHYVEVLGERMHYVDVGPDRGTPVLFHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCI
APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERSVKGIA
FMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHREP
FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVKLLFWGTPGVLIIPAEARLAK
SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 61 (nucleótido de fusión tipo sándwich Id-9B8-HT7)

atgcttgggtctgtcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggaacgcgcctgccgcctt
gctggacgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcacgcctcaagg
agetgggtgcccaccctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaatc
gactacatcagggacctgcagctggagctgaactcggagctetgaagtcgggaccaccggaggccg
gggactgcctgtccgcgccccgctcagcaccctgaacggcgagatcagtgccctggcgccgagg
cggcatgtgttccagccgacgatcgcattcttgtgtcgcgtttctcttgagaatctttatttcag
gcgtctggaggtggtggcggagcgatcgccatgggtgtttacattggaggatttcggtggagactg
gcggcagacagctggatacaacctagatcaagtgttagaacaaggaggattgtctagtctgttcc
aaaagctgggagtgctcagtcacccaatccagaaaattgtgctgtctggggagaatgggttaaaa
attgatattcatgtcatcatcccttacgagggactcagtggttatcaaattgggtcagattgaaaa
gatcttcaaagttgtttaccagtggtatgatcatttcaaggttattotccattatggtaaac
tcgttattgacgggtgtgacaccaaacatgattgactactttggaacgccttacgagggaaattgct
gtgtttgacggcaagaagatcacagttactggaactctgtggaacggcaacaagatcattgatga
gcgcctgatcaaccagatggttccactcctcttccgcgttactatcaatggagtcaccggatggc
gcctttgcgagcgtattcttgcggtttctctcogagccaaccactgaggatctgtactttcagagc
gataacgatggatccgaaatcggtaactggcttccattcogacccccattatgtggaagtcctggg
cgagcgcactgcactacgtcgatgttgggtccgcgcgatggcaccctgtgctgttctcgcagcgt
accgcacctcctcctacgtgtggcgcaaacatcctccgcgatgttgcaaccgaccatcgcctgatt
gctccagacctgatcggatgggcaaatccgacaaaccagacctgggttatttcttcgacgacca
cgtccgcttcatggatgccttcacogaagccctgggtctggaagaggtcgtcctgggtcattcacg
actggggctccgctctgggttccactgggccaagcgcaatccagagcgcgtcaaaggatttgca
tttatggagttccatccgcccctatcccgacctgggacgaatggccagaatttgcccgcgagacctt
ccaggccttccgcaccaccgacgctcggccgcaagctgatcctcagatcagaacggttttatcaggg
gtacgctgcccgatgggtgtcgtccgcccgcgtgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
ttcctgaatcctgttgaccgcgagccactgtggcgcttcccaaacgagctgccaatcgccgggtga
gccagcgaacatcgtcgcgctggctogaagaatacatggactggctgcaccagtcacctgtccoga
agetgctgttctggggcaccccaggcgttctgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaa
agcctgcctaactgcaaggtctgtggacatcggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaacc
ggacctgatcggcagcagatcgcgcgctggctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 62 (proteína de fusión tipo sándwich Id-9B8-HT7)

MLGLSEQSVSISRAGTRLPALLDEQQVNVLLYDMNGCYSRKELVPTLPQNRKVKVEILQHVI
DYIRDLQLELNSESEVGTGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLNLYFQ
ASGGGGGAIAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGLSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGLK
IDIHVIIPEGLSGYQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIA
VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAVSLEPTTEDLYFQS
DNDGSEIGTGFFPDPHYVEVLGERMHYVDVGPDRDGPVFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCI
APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLIHDWGSALGFHWAKRNPBRVKGIA
FMEFIRPIPTWDEWPEFARETQAFRTTQVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREP
FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIIPAEAAARLAK
SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 63 (nucleótido de fusión tipo sándwich Id-9F6-HT7)

atgcttgggtctgtcggagcaaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggaocgcgcctgcccgcctt
gctggacgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcagcctcaagg
agctgggtgcccaccctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaatc
gactacatcagggacctgcagctggagctgaactcggagctctgaagtcgggaccaccggaggccg
gggactgcctgtccgcgccccgcctcagcaccctgaacggcgagatcagtgccctggcgggccgagg
cggcatgtgttccagccgacgatcgcacatcttgtgtcgcgtttctcttgagaatctttatcttccag
gcgtctggaggtggtggcggagcgcgatcgcacatgggtgtttacattggaggatttcggtggagactg
gcggcagacagctggatacaacctagatcaagtgttagaacaaggaggagtgtctagctctgttcc
aaaagctgggagtgatcaatcaccccaatccagaaaattgtgctgtctggggagaatgggttaaaa
attgatattcatgtcatcacccttacgagggactcagtggttatcaaatgggtcagattgaaaa
gatcttcaaagttgtttaccagtgatgatcatttcaaggttattctccattatggtagacac
tcggtattgaaggtgtgacaccaaacatgattgactactttggacgccttacgaggggaattgct
gtgtttgacggcaagaagatcacagttactggaaactctgtggaacggcaacaagatcattgatga
gcgcctgatcaaccagatggttcaactcctcttccgcggttactatcaatggagtcaccggatggc
gcctttgagagcgtattcttgcggtttctctcgcgccaaccactgaggatctgtaacttccagagc
gataacgatggatccgaaatcggtaactggctttccattcgcacccccattatgtggaagtcctggg
cgagcgcactacgtcagatgttgggtccgcgcgatggcaccctctgctgttccctgcacggta
accgcacctcctcctacgtgtggcgcaacatcctccgcgatgttgcaccgaccatcgcctgcatt
gctccagacctgatcggatgcttccatcogaagccctgggtctggaagaggtcgtcctgggtcattcag
actggggctccgctctgggtttccactgggccaagegcaatccagagcgcgtcaaaggatttgc
ttatggagttcatccgccctatcccgaacctgggacgaatggccagaatttgcccgcgagacctt
ccaggccttccgcaccaccgacgtcggccgcaagctgatcagatcagaacgtttttatcagagg
gtacgctgcagatgggtgtcgtccgcccgcgtgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
ttcctgaatcctgttgaccgcgagccactgtggcgccttcccaaacgagctgccaatcgcgggtga
gccagcgaacatcgtcgcgctgggtcgaagaatacatggactggctgcaccagtcacctgtcccga
agctgctgttctggggcaccccaggcgttctgatcccaccgcccgaagccgctcgcctggccaaa
agcctgctaactgcaaggctgtggacatcggccccgggtctgaatctgctgcaagaagacaacc
ggacctgatcggcagcagatcgcgcgctggctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 64 (proteína de fusión tipo sándwich Id-9F6-HT7)

MLGLSEQSVSISRCACTRLPALLDEQQVNVLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVSKEILQHVI
DYIRDLQLELNSESEVGTGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLLENLYFQ
ASGGGGAIAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQKLGVSITPIQKIVLSGENGLK
IDIHVIIIPYEGLSGYQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIA
VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAVSLEPTTEDLYFQS
DNDGSEIGTFPDPHYVEVLGERMHYVDVGRDGPVLEFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCI
APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIA
FMEFIRPIPTWDEWPEFARETFAQFRITDVGKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREP

FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVKLLFWGTPGVLIIPAEARLAK
SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 65 (nucleótido 9B8 opt-P)

atgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggacca
agtccttgagcagggcggtctgtccagtttgtttcagaaactcgggggtgcccgtaacaccgatcc
aaaagattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
ggtctgagcggctatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggtgattctgcaactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacc
gggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccagcggctccctgct
gttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcattttggcgaattctc
acggcttccctcccaggtggaggagcaggccgcggcaccctgcccattgagctgcccaggag
agcggcatggatagacacctgctgcttgcgcccagcggcaggatcaacgctc

SEQ ID NO: 66 (2X ARE)

5 TAGCTTGAAATGACATTGCTAATGGTGACAAAGCAACTTTTAGCTTGAAATGACATTGCTAAT
GGTGACAAAGCAACTTT

SEQ ID NO: 67 (HRE)

CTGGAATTTTCTAGACTGGAATTTTCTAGACTGGAATTTTCTAGA

10 **SEQ ID NO: 68 (nucleótido K33N+170G)**

atgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggacca
agtccttgagcagggcggtctgtccagtttgtttcagaaactcgggggtgcccgtaacaccgatcc
aaaagattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
ggtctgagcggctatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggtgattctgcaactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacc
gggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccagcggctccctgct
gttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcattttggcggga

15 **SEQ ID NO: 69 (proteína K33N+170G)**

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGLSSLFQNLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGYQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAG

SEQ ID NO: 70 (nucleótido 27A5 (NF))

20 ATGGTGTTTACACTCGAAGATTTTCGTAGGGGACTGGCGGCAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCA
AGTCCTTGAGCAGGGCGGTCTGTCCAGTTTGTTTCAGAAATCTCGGGGTGTCGTAACCTCCGATCC
AAAAGATTGTCCTGAGCGGTGAAAACGGCCTGAAGATCGACATCCATGTTCATCATCCCCTATGAA
GGTCTGAGCGGCTATCAGATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATTCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACC
GGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCCGACGGCTCCCTGCT
GTTCCGCGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAGCGCATTTTGGCGGGA

SEQ ID NO: 71 (proteína 27A5 (NF))

25 MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGLSSLFQNLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGYQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAG

SEQ ID NO: 72 (nucleótido 23D4 (NF))

ATGGTGTTTACTACTCGAAGATTTTCGTAGGGGACTGGCGGCAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCA
AGTCCTTGAGCAGGGCGGCCTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGGGTGTCCGTAACACCGATCC
AAAAGATTGTCCTGAGCGGTGAAAACGGCCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA
GGTCTGAGCGGCTATCAGATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATTCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACCTGA
TCGACTATTTCCGGACGTCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACC
GGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCT
GTTCCGCGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAGCGCATTTTGGCGGGA

5 **SEQ ID NO: 73 (proteína 23D4 (NF))**

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGLSSLFQNLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
GLSGYQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNLIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAG

10 **SEQ ID NO: 74 (nucleótido 24C2 (NF))**

ATGGTGTTTACTACTCGAAGATTTTCGTAGGGGACTGGCAGCAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCA
AGTCCTTGAGCAGGGCGGTCTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGGGTGTCCGTAACCTCCGATCC
AAAAGATTGTCCTGAGCGGTGAAAACGGCCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA
GGTCTGAGCGGCTATCAGATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATTCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTCCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACC
GGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCT
GTTCCGCGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAGCGCATTTTGGCGGGA

SEQ ID NO: 75 (proteína 24C2 (NF))

MVFTLEDFVGDWQQTAGYNLDQVLEQGLSSLFQNLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
GLSGYQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAG

15

SEQ ID NO: 76 (nucleótido de fusión tipo sándwich Id-23D4-HT7)

atgcttgggtctgtcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggacgcgcctgcccgcctt
gctggacgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcagcctcaagg
agctgggtgccaccctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaatc
gactacatcagggacctgcagctggagctgaactcggagctgaagtcgggaccaccggaggccg
gggactgcctgtccgcgccccgctcagcaccctgaacggcgagatcagtgccctggcgccgagg
cggcatgtgtccagccgacgatcgcactcttgtgtcgcgtttctcttgagaatctttatcttcag
gcgtctggaggtgggtggcggagcgatcgccatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactg
gcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgccctgtccagtttgttc
agaatctcgggggtgtccgtaacaccgatccaaaagattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaag
atcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggctatcagatgggcccagatcgaaaa
aatctttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcaactatggcacac
tggtaatcgacgggggttacgccgaacttgatcgactatttcggacgtccgtatgaaggcatcgcc
gtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacga
gcgctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgcaccggctggc
ggctgtgcgagcgcattttggcgggatactcgcagccaaccactgaggatctgtaacttcagagc
gataacgatggatccgaaatcgggtactggctttccattcgacccccattatgtggaagtcctggg
cgagcgcactacgtcgcgtgttggtccgcgcgatggcaaccctgtgctgttccctgcacggta
accgcacctcctcctacgtgtggcgcaacatcatcccgcattgttgcaaccgacctatcgctgcatt
gctccagacctgatcggtatgggcaaatccgacaaaccagacctgggttattctctcgacgacca
cgtccgcttcattggatgccttcacgaagccctgggtctggaagaggtcgtccctgggtcattcacg
actggggctccgctctgggtttccactgggccaagcgaatccagagcgcgtcaaaggtattgca
tttatggagttcatccgcctatcccgcacctgggacgaatggccagaatttgcccgcgagacctt

ccaggcctccgcaccaccgacgtcggccgcaagctgatcgcgcagaaacgtttttatcgagg
gtacgctgccgatgggtgtcgtccgcctgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
ttcctgaatcctgttgaccgcgagccactgtggccttcccaaacgagctgccaatcgccgggtga
gccagcgaacatcgctcgcgtggctcgaagaatacatggactggctgcaccagtcacctgtcccg
agctgctgttctggggcaaccagggcttctgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaa
agcctgcctaactgcaaggctgtggacatcggcccgggtctg

SEQ ID NO: 77 (proteína de fusión tipo sándwich Id-23D4-HT7)

MLGLSEQSVSISRCACTRLPALLDEQQVNVLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVSKEIILQHVI
DYIRDLQLELNSESEVGTGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLLENLYFQ
ASGGGGAIAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGLSSLFQNLGVSVTPIQKIVLSGENGLK
IDIHVIIPEGLSGYQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNLIIDYFGRPYEGIA
VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQS
DNDGSEIGTGFPDPHYVEVLGERMHYVDVGPDRGTPVLFHGNPTSSYVWRNII PHVAPTHRCI
APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIA
FMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREP
FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIIPAEARLAK
SLPNCKAVDIGPGL

5

SEQ ID NO: 78 (nucleótido de fusión tipo sándwich Id-24C2-HT7)

atgcttgggtctgtcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggaacgcgcctgcccgcctt
gctggacgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcagcctcaagg
agctgggtgccaccctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaatc
gactacatcagggacctgcagctggagctgaactcggagctctgaagtcgggaccaccggaggccg
gggactgcctgtccgcgccccgcctcagcaccctgaacggcgagatcagtgcccttggcggccgagg
cggcatgtgttccagcccagcagatcgcatcttgtgtcgcggttctcttgagaatctttatcttccag
gcgtctggaggtggtggcggagcagatcgccatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactg
gcagcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtctgtccagtttgtttc
agaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaagattgtcctgagcgggtgaaaaacggcctgaag
atcgacatccatgtcatcctccgtatgaaggtctgagcggctatcagatggggccagatcgaaaa
aatctttaaggtggtgtacctgtggatgatcactttaaggtgattctgcaactatggcacac
tggtaatcgacgggggttacgcccgaacatgatcgactatctcgacggccgctatgaaggcatcgcc
gtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaacctgtggaacggcaacaaaattatcgacga
gagcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggetggc
ggctgtgcgagcgcattttggcgggatactcgcagccaaccactgaggatctgtactttcagagc
gataacgatggatccgaaatcggtaactggctttccattcgacccccattatgtggaagtcctggg
cgagcgcactacgtcgatggttggtccgcgcatggcaccctgtgctgttctcgcacggta
accgacctcctcctacgtgtggcgcaacatcctccgcagcttgcaccgacctatcgctgcatt
gctccagacctgatcggatagggcaaatccgacaaaccagacctgggttattctctcgacgacca
cgtccgcttcatggatgccttcatcgaagccctgggtctggaagaggtcgtcctggtcattcagc
actggggctccgctctgggtttccactgggccaagcgcaatccagagcgcgtcaaaggatttgca
tttatggagttcatccgcctatcccagacctgggacgaatggccagaatttgcccgcgagacctt
ccaggccttccgcaccaaccgacgtcggccgcaagctgatcagatcagaacgtttttatcgagg
gtacgctgcccagtggtgtcgtccgcccgcctgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
ttcctgaatcctggttgaccgagcgcactgtggcgcttcccaaacgagctgccaatcgccgggtga
gccagcgaacatcgtcgcgctgggtcgaagaatacatggactggctgcaccagtcctcctgtcccga
agctgctgttctggggcaccaccagcgcttctgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaa
agcctgcctaactgcaaggtctgtggacatcgcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaacc
ggacctgatcggcagcagatcgcgcgctggctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 79 (proteína de fusión tipo sándwich Id-24C2-HT7)

MLGLSEQSVSISRCACTRLPALLDQQVNVLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVSKEILQHVI
DYIRDLQLELNSESEVGTGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLNLYFQ

ASGGGGGAIAMVFTLEDFVGDWQQTAGYNLDQVLEQGLSSLFQNLGVSVTPIQKIVLSGENGLK
IDIHVIIPEGLSGYQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMI DYFGRPYEGIA
VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQS
DNDGSEIGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGRDGT PVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCI
APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLIHDWGSALGFHWAKRNP ERVKGIA
FMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTT DVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREP
FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGT PGVLI PPAAEARLAK
SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPD LIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 80 (nucleótido 1F7 (NF))

ATGGTGTTTACACTCGAAGATTTTCGTAGGGGACTGGCGGCAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCA
AGTCCTTGAGCAGGGCGGTCTGTCCAGTTTGTTCAGAAATCTCGGGGTGTCCGTAACACCGATCC
AAAGGATTGTCTGAGCGGTGAAAACGGCCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCCTATGAA
GGTCTGAGCGGCATCAGATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATTCTGCACACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACC
GGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCT
GTTCCGCGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAGCGCATTTTGGCGGGA

SEQ ID NO: 81 (proteína 1F7 (NF))

5 MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGLSSLFQNLGVSVTPIQIRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAG

SEQ ID NO: 82 (nucleótido 15H1 (NF))

ATGGTGTTTACACTCGAAGATTTTCGTAGGGGACTGGCGGCAGACAGCCGGCTACAACCTGGATCA
AGTCCTTGAGCAGGGCGGTCTGTCCAGTTTGTTCAGAAATCTCGGGGTGTCCGTAACACCGATCC
AAAAGATTGTCTGAGCGGTGAAAACGGCCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCCTATGAA
GGTCTGAACGGCTATCAGATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATTCTGCACACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACC
GGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCT
GTTCCGCGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAGCGCATTTTGGCGGGA

10

SEQ ID NO: 83 (proteína 15H1 (NF))

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGLSSLFQNLGVSVTPIQKIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLNGYQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAG

15

SEQ ID NO: 84 (nucleótido de fusión tipo sándwich Id-1F7-HT7)

atgcttggtctgtcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggacgcgcctgccgcctt
gctggacgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcacgcctcaagg
agctggtgcccaccctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaatc
gactacatcagggaacctgcagctggagctgaactcggagctctgaagtcgggaccaccggaggccg
gggactgcctgtccgcgccccgctcagcaccctgaacggcgagatcagtgccctggcgccgagg
cggcatgtgtccagccgacgatcgcctctgtgtcgcgcttctcttgagaatctttatcttcag
gcgtctggaggtggtggcggagcgategccatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactg
gcgccagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggctctgtccagttgtttc
agaatctcggggtgtccgtaacaccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaaaacggcctgaag
atcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggccagatcgaaaa
aatTTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTGATTCTGCACACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGA
tggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACC
gtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacga

gcgcctgatcaacccccgacggctccctgctgttccgcgtaaacatcaacggagtgaccggctggc
 ggctgtgcgagcgcattttggcgggatatctogagccaaccactgaggatctgtactttcagagc
 gataacgatggatccgaaatcggtaactggctttccattogacccccattatgtggaagtccctggg
 cgagcgcactgcactacgtogatggttggccgcgcgatggcaccctgtgctgttccctgcacggta
 acccgacctcctcctacgtgtggcgcaacatcatcccgcgatggtgcaccgaccatcgctgcatt
 gctccagacctgatcggatgggcaaatccgacaaaccagacctgggttattttcttcgacgacca
 cgtccgcttcatggatgccttcatogaagccctgggtctggaagaggctcctgggtcattcag
 actggggctccgctctgggtttccactgggccaagcgaatccagagcgcgctcaaaggattgca
 tttatggagttcatccgccctatcccgaacctgggaagcaatggccagaatttgcccgcgagacctt
 ccaggccttccgcaccaccgacgtoggccgcaagctgatcatcgatcagaacgtttttatcgagg
 gtaecgtgccgatgggtgtcgtccgcccgctgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
 ttctgaatcctgttgaccgcgagccactgtggcgcttcccaaacgagctgccaatcgccgggtga
 gccagcgaacatcgtcgcgctggctogaagaatacatggactggctgcaccagtcacctgtccgca
 agctgctgttctggggcaccaccaggcgttctgateccaccggccgaagccgctcgcctggccaaa
 agcctgcctaactgcaaggctgtggacatcgccccgggtctgaatctgctgcaagaagacaacc
 ggacctgatcggcagcagatcgcgcgctggctgtctactctggag

SEQ ID NO: 85 (proteína de fusión tipo sándwich Id-1F7-HT7)

MLGLSEQSVSISRACGTRLPALDEQOVNLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVKVSKVEILQHVI
 DYIRDLQLELNSESEVGTGGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLLENLYFQ
 ASGGGGGAIAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGLSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLK
 IDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHEFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIA
 VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTEDLYFQS
 DNDGSEIGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPDRDGPVLFHGNPTSSYVWRNII PHVAPTHRCI
 APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLIHDWGSALGFHWAKRNP ERVKGIA
 FMEFIRPIPTWDEWPEFARETQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREP
 FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLI PPAAEARLAK
 SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 86 (nucleótido de fusión tipo sándwich Id-15H1-HT7)

atgcttgggtctgtcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggacgcgcctgccgcctt
gctggacgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcacgcctcaagg
agctggtgcccaccctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaate
gactacatoaggacotgcagctggagctgaactcggagtctgaagtcgggaccaccggaggccg
gggactgcctgtccgcgccccgctcagcaccctgaacggcgagatcagtgccctggcggccgagg
cggcatgtgttccagccgacgatcgcaccttgtgtcgcgcttctcttgagaatctttatctttag
gcgtctggaggtgggtggcggagcgatcgccatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactg
gcggcagacagccggctacaacctggatcaagtccttgagcagggcggtctgtccagtttgttcc
agaatctcggggtgtccgtaacaccgatccaaaagattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaag
atcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgaacggctatcagatgggcccagatcgaaaa
aatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacac
tggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgcc
gtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacga
gogcctgatcaaccocgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggc
ggctgtgcgagcgcattttggcgggatactcgcagccaaaccactgaggatctgtactttcagagc
gataacgatggatccgaaatcgggtactggcttccattcgaaccccccattatgtggaagtccctggg
cgagcgcactacgtcgcgatgttgggtccgcgcgatggcaccctgtgctgttccctgcacggta
accogacctcctcctacgtgtggcgcaacatcatcccgcatgttgaccgaccatecgtgcatt
gctccagacctgatcggatgggcaaatccgacaaaccagacctgggttatttcttcgacgacca
cgtccgcttcattggatgccttcacgaagccctgggtctggaagaggtcgtcctgggtcattcag
actggggctccgctctgggtttccactgggccaagcgcgaatccagagcgcgtcaaaggtattgca
tttatggagttcatccgcctatcccagacctgggacgaatggccagaatttgcccgcgagacctt
ccagccttccgcaccaccgacgtcggccgcgaagctgatcagatcagaacgtttttatcagagg

gtacgctgocgatgggtgtcgtccgcccgtgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
ttcctgaatcctgttgaccgcgagccactgtggecttccccaaacgagctgccaatcgccgggtga
gocagcgaacatcgtcgcgctgggtogaagaatacatggactggctgcaccagtcacctgtccga
agetgctgttctggggcaccaccaggcgttctgatccaccggccgaagccgctcgcctggccaaa
agcctgcctaactgcaaggctgtggacatcgcccccgggtctgaatctgctgcaagaagacaacce
ggacctgatcggcagcagatcgcgcgctggctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 87 (proteína de fusión tipo sándwich Id-15H1-HT7)

MLGLSEQSVSISRCACTRLPALLDEQQVNVLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVSKEILQHVI
DYIRDLQLELNSESEVGTGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLNLYFQ
ASGGGGAIAMVFTLEDFVDWRQTAGYNLDQVLEQGGLSSLFQNLGVSVPPIQKIVLSGENGLK
IDIHVII PYEGLNGYQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIIDYFGRPYEGIA
VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQS
DNDGSEIGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGRDGPVLFHGNPTSSYVWRNII PHVAPTHRCI
APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIA
FMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREP
FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLI PPAAEARLAK
SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 88 (nucleótido 9B8 opt+K33N+L27V+T39T+K43R+Y68D)

Atggtgtttacactcgaagatttccgtaggggactggcggcagacagccggtacaacctggacca
agtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
ggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaagggtgggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaagggtgattctgcaactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacc
gggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgct
gttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcattttggcg

SEQ ID NO: 89 (proteína 9B8 opt+K33N+L27V+T39T+K43R+Y68D)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSENGLKIDIHVIIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA

5

SEQ ID NO: 90 (nucleótido de fusión tipo sándwich 9B8 opt+K33N+L27V+T39T+K43R+Y68D)

atgcttggctctgtcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggacgcgcctgcccgcctt
gctggacgagcagcaggtgaaacgtcctgctctacgacatgaaacggctgctactcacgcctcaagg
agctgggtgcccaacctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaatc
gactacatcagggacctgcagctggagctgaactcggagctctgaagtcgggaccaccggaggccg
gggactgcctgtccgcgccccgcctcagcaacctgaaacggcgcagatcagtgccctggcggccgagg
cggcatgtgttccagccgacgcatcgcatcttgtgtcgcgcttctcttgagaatctttattttcag
gcgtctggaggtgggtggcggagcgcgcacatgggtgtttacactcgaagatttccgtaggggactg
gcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttggttc
agaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaag
atcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctctgagcggcgcgatcagatgggcccagatcgaaa
aatttttaagggtgggtgtaccctgtggatgatcactttaagggtgattctgcaactatggcacac
tggaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgc
gtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacga
gcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggc
ggctgtgcgagcgcattttggcgggatatctcgagccaacctgaggatctgtactttcagagc
gataacgatggatccgaaatcggactggcttccattcgacccccattatgtggaagtcctggg
cgagcgcgatgcactacgtcgatgttggtccgcgcgatggcaccctgtgctgttctcgcacggta
accgcacctctcctacgtgtggcgcaacatcatcccgcagtttgaccgacccatcgctgcatt
gctccagacctgatcggatgcttccatcgaagccctgggtctggaagaggtcgtcctggtcattcacg
actggggctccgctctgggttccactgggccaagcgcaatccagagcgcgtcaaaggatttgca
ttatggagttcatccgacctatcccgaacctgggacgaatggcccagaatttgcccgcgagacctt
ccaggccttccgcaccaccgacgtcggccgcaagctgatcagatcagaacgttttatcgagg
gtacgctgcgatgggtgtcgtccgcccgcctgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
ttcctgaatcctgttgaccgcgagccactgtggcgccttcccaaacgagctgccaatcgccggtga
gccagogaacatcgtcgcgctggtcgaagaatacatggactggctgcaccagtcctcctgtcccga
agctgctgttctggggcaccaccaggcgttctgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaa
agcctgcctaactgcaaggctgtggacatcggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaacc
ggacctgatcggcagcgcgatcgcgcgctggctgtctactctggagatttccggt

10

SEQ ID NO: 91 (proteína de fusión tipo sándwich 9B8 opt+K33N+L27V+T39T+K43R+Y68D)

MLGLSEQSVSISRACGTRLPALLDQVNVLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVSKEILQHVI
DYIRDLQLELNSESEVGTGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLNLYFQ
ASGGGGAIAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLK
IDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIA
VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQS
DNDGSEIGTGFFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGPVLFHGNPTSSYVWRNIIIPHVAPTHRCI
APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERSVKGIA
FMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREP
FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVKLLFWGTPGVLIIPAEARLAK
SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

SEQ ID NO: 92 (nucleótido 9B8 opt+K33N+T39T+K43R+Y68D)

Atggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggtacaacctggacca
agtccttgagcagggcggtctgtccagtttgtttcagaatctcggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
ggctctgagcggcgatcagatgggcccagategaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggtgattctgcaactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacc

gggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgct
gttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcattttggcg

5

SEQ ID NO: 93 (proteína 9B8 opt+K33N+T39T+K43R+Y68D)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA

10

SEQ ID NO: 94 (nucleótido de fusión tipo sándwich 9B8 opt+K33N+T39T+K43R+Y68D)

atgcttggtctgtcggagcaaagcgtgtccatctcgcgctgcgctgggacgcgcctgcccgcctt
 gctggaecgagcagcaggtgaacgtcctgctctacgacatgaacggctgctactcacgcctcaagg
 agctggtgccaccctgccccagaaccgcaaagtgagcaaggtggagatcctgcagcatgtaatc
 gactacatcagggacctgcagctggagctgaactcggagctctgaagtcgggaccaccggagggcg
 gggactgectgtccgcgccccgctcagcaccctgaacggcgagatcagtgccctggcgggcgagg
 cggcatgtgtccagccgacgatcgcattctgtgtcggcttctcttgagaatctttatcttcag
 gctctggaggtggtggcgagcgatcgccatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactg
 gggcagacagccggctacaacctggaccaagtcccttgagcagggcggtctgtccagtttgttc
 agaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaag
 atcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaa
 aatcttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcacttaaggtgattctgcactatggcacac
 tggtaatcgacgggggttacgcogaacatgatcactatctcggacggcctgatgaaggcatcgcc
 gtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacga
 gcgectgatcaaccccgacggctccctgctgttcgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggc
 ggctgtgcgagcgcattttggcgggatctctcgagccaaccactgaggatctgtactttcagagc
 gataacgatggatccgaaatcggtaactggcttccattcgacccccattatgtggaagtcctggg
 cgagcgcactgcactacgtcgatgttggtccgcgcgatggcaccctgtgctgttccctgcacggta
 accgcacctccctacgtgtggcgcaacatcatcccgatgttgcaccgaccatcgctgcatt
 gctccagacctgatcggatgggcaaatecgacaaaccagacctgggttattctctcgacgacca
 cgtccgctcatggatgcttccatcgaagccctgggtctggaagaggtcgtcctggctcattcag
 actggggctccgctctgggtttccactgggccaagcgaateccagagcgcgtcaagggtattgca
 tttatggagttcatccgcctatcccgacctgggacgaatggccagaatttgcccgcgagacctt
 ccaggcctccgcaccaccgacgtcggcgcgaagctgatcagatcagaacgtttttatcgagg
 gtaacgtgcgatgggtgtcgtccgcgcctgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccg
 ttctgaatectgttgaccgcgagccactgtggcgcttcccaaocgagctgccaatcgccgggtga
 gccagcgaacatcgtcgcgctggctcgaagaatacatggactggctgcaccagtcacctgtccga
 agctgctgttctggggcaccccaggcgttctgatccaccggccgaagccgctcgctggccaaa
 agcctgcctaactgcaaggctgtggacatcgccccgggtctgaatctgctgcaagaagacaacc
 ggacctgatcggcagcgagatcgcgcgctggctgtctactctggagatttccggt

SEQ ID NO: 95 (proteína de fusión tipo sándwich 9B8 opt+K33N+T39T+K43R+Y68D)

MLGLSEQSVSISRAGTRLPALLDEQQVNVLLYDMNGCYSRLKELVPTLPQNRKVSKEIILQHVI
 DYIRDLQLELNSESEVGTGGRGLPVRAPLSTLNGEISALAAEAACVPADDRILCRVSLNLYFQ
 ASGGGGAIAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGLSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLK
 IDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIA
 VFDGKKITVTGLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGYLEPTTEDLYFQS
 DNDGSEIGTGFPDPHYVEVLGERMHYVDVGPDRDGPVFLHGNPTSSYVWRNII PHVAPTHRCI
 APDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERSVKGIA
 FMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREP
 FLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIIPPAEAARLAK
 SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISG

5

SEQ ID NO: 96 (CRE)

GCACCAGACAGTGACGTCAGCTGCCAGATCCCATGGCCGTCATACTGTGACGTCTTTCAGACACC
 CCTTGACGTCAATGGGAGAACA

10

SEQ ID NO: 97 (Nucleótido CP 84 sin enlazador)

Atggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgcc
gaacatgatcgactatctcggaacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatca
ctgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggc
tcctgctgtttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtgacgagcgcattttggc
gatgggtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggacc
aagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatc
caaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatga
aggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtg

SEQ ID NO: 98 (Proteína CP 84 sin enlazador)

MDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDG
5 SLLFRVTINGVTGWRLCERILAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPI
QRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPV

SEQ ID NO: 99 (Nucleótido CP 84 con enlazador de 5 aa)

Atggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgcc
gaacatgatcgactatctcggaacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatca
ctgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggc
tcctgctgtttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtgacgagcgcattttggc
ggggagctccgggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccg
gtacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtg
tcgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgt
catcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtgg
10 tgtaccctgtg

SEQ ID NO: 100 (Proteína CP 84 con enlazador de 5 aa)

MDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDG
SLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGV
15 SVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPV

SEQ ID NO: 101 (Nucleótido CP 84 con enlazador de 10 aa)

Atggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgcc
gaacatgatcgactatctcggaacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatca
ctgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggc
tcctgctgtttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtgacgagcgcattttggc
gggaagtctggtggaggagctccgggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggact
ggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgttt
cagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaa
gategacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaa
20 aaatttttaaggtggtgtaccctgtg

SEQ ID NO: 102 (Proteína CP 84 con enlazador de 10 aa)

MDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDG
SLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLF
20 QNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPV

SEQ ID NO: 103 (Nucleótido CP 84 con enlazador de 20 aa)

Atggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcc
gaacatgatcgactatctcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatca
ctgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggc
tccttgcctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgacgagcgcatcttggc
gggaagttctggtggaggagctccgggtggaggaagttctggtggaggagctccgggtggaatgg
tgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtc
cttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaag
gattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtc
tgagcggcgatcagatgggccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtg

SEQ ID NO: 104 (Proteína CP 84 con enlazador de 20 aa)

MDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDG
SLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQV
LEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENLKDIDHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPV

5

SEQ ID NO: 105 (Nucleótido CP 95 sin enlazador)

Atggggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggccgtatga
aggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaa
ttatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtg
accggctggcggctgtgacgagcgcatcttggcgatggtgtttacactcgaagatttcgtagggga
ctggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgt
ttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctg
aagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggccagatcga
aaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactat

10

SEQ ID NO: 106 (Proteína CP 95 sin enlazador)

MGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGV
TGWRLCERILAMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENL
KIDIDHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHY

15

SEQ ID NO: 107 (Nucleótido CP 95 con enlazador de 5 aa)

Atggggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggccgtatga
aggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaa
ttatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtg
accggctggcggctgtgacgagcgcatcttggcggggagctccgggtggaatggtgtttacactcga
agatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcg
gtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagc
ggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatca
gatgggccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtga
ttctgcactat

20

SEQ ID NO: 108 (Proteína CP 95 con enlazador de 5 aa)

MGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGV
TGWRLCERILAGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLS
GENLKDIDHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHY

SEQ ID NO: 109 (Nucleótido CP 95 con enlazador de 10 aa)

Atgggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggcccgatga
aggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaa
ttatcgacgagcgcctgatcaacccccgacggctccctgctgttcgcgtaaccatcaacggagtg
accggctggcggctgtgagagcgcattttggcggaagtctctgggtggaggagctccgggtggaat
gggtgtttacactcgaagatctcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaag
tccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaa

aggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaagg
tctgagcggcgatcagatgggccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatc
atcactttaaggtgattctgcaactat

SEQ ID NO: 110 (Proteína CP 95 con enlazador de 10 aa)

MGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGV
TGWRLCERILAGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQ
RIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHY

5

SEQ ID NO: 111 (Nucleótido CP 95 con enlazador de 20 aa)

Atgggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggcccgatga
aggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaa
ttatcgacgagcgcctgatcaacccccgacggctccctgctgttcgcgtaaccatcaacggagtg
accggctggcggctgtgagagcgcattttggcggaagtctctgggtggaggagctccgggtggagg
aagtctctgggtggaggagctccgggtggaatgggtgtttacactcgaagatctcgtaggggactggc
ggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcag
aatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagat
cgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggccagatcgaaaaaa
tttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcactttaaggtgattctgcaactat

10

SEQ ID NO: 112 (Proteína CP 95 con enlazador de 20 aa)

MGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGV
TGWRLCERILAGSSGGGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQ
NLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHY

15

SEQ ID NO: 113 (Enlazador)

(GSGG)_N

SEQ ID NO: 114 (L27V CP 5 TEV)

20

Atggatttctgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcaggg
cgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctga
gcggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgat
cagatgggccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcactttaaggt
gattctgcaactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggac
ggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaac
ggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaacccccgacggctccctgctgttcgcgtaaccat
caacggagtgaccggctggcggctgtgagagcgcattttggcggaagtctctgggtggaggaaagt
ctgggtggagagcctactactgagaacttgaactccagagcgataacggaagtctctgggtggagga
agttctgggtggaatgggtgtttacactcga

SEQ ID NO: 115 (L27V CP 5 TEV)

MDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV I I PYEGLSGD
QMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN
GNKI I DERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGG
SSGGMVFTLE

SEQ ID NO: 116 (L27V CP 6 TEV)

atgttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgg
tgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcg
gtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctgagcggcgatcag
atgggccagatcgaaaaaatttttaagtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgat
tctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggc
cgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggc

aacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccocgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaa
cggagtgaaccggctggcggctgtgogagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctg
gtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagt
tctggtggaatggtggtttacactcgaagat

5

SEQ ID NO: 117 (L27V CP 6 TEV)

MFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV I I PYEGLSGDQ
MGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNG
NKI I DERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGS
SGGMVFTLED

10

SEQ ID NO: 118 (L27V CP 7 TEV)

atggtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgt
gtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcggtg
aaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctgagcggcgatcagatg
ggccagatcgaaaaaatttttaagtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattct
gcaactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgt
atgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaac
aaaattatcgacgagcgcctgatcaaccocgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacgg
agtgaaccggctggcggctgtgogagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtg
gagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttct
ggtggaatggtggtttacactcgaagatttc

15

SEQ ID NO: 119 (L27V CP 7 TEV)

MVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV I I PYEGLSGDQM
GQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGN
KI I DERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSS
GGMVFTLEDF

20

SEQ ID NO: 120 (L27V CP 9 TEV)

atggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccag
tttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacg
gcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggcgatcagatgggcccag
atcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagggtgattctgcacta
tggcacactggtaatcgacggggttacgcccgaacatgatcgactatttcggacggccggtatgaag
gcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaatt
atcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttcccgtaaccatcaacggagtgc
cggctggcggctgtgacgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagc
ctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtgga
atggtgtttacactcgaagatttcgtaggg

SEQ ID NO: 121 (L27V CP 9 TEV)

MDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQ
IEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI
IDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGG
MVFTLEDFVG

5

SEQ ID NO: 122 (L27V CP 11 TEV)

Atgcccagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtt
tcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctga
agatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaa
aaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagggtgattctgcactatggcac
actggtaatcgacgggggttacgcccgaacatgatcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcg

10

ccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgac
gagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttcccgtaaccatcaacggagtgaccggctg
gcggctgtgacgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctacta
ctgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtg
tttacactcgaagatttcgtaggggactgg

SEQ ID NO: 123 (L27V CP 11 TEV)

MRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIE
KIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIID
ERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMV
FTLEDFVGDW

15

SEQ ID NO: 124 (L27V CP 12 TEV)

Cagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaa
tctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcg
acatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaaatt
tttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagggtgattctgcactatggcacactggt
aatcgacgggggttacgcccgaacatgatcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgt
tcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgc
ctgatcaaccccgacggctccctgctgttcccgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggct
gtgacgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgaga
acttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttaca
ctcgaagatttcgtaggg

20

SEQ ID NO: 125 (L27V CP 12 TEV)

QTAGYNLDQVLEQGGVSSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKI
FKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDER
LINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFT
LEDFVG

SEQ ID NO: 126 (L27V CP 15 TEV)

5

atgggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgg
ggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatcc
atgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaag
gtgggtgtacctgtggatgatcatcactttaagggtgattctgcactatggcacactggtaatcga
cggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacg
gcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaaaaaattatcgacgagcgccctgatc
aaccccgacggetccctgctgttcccggttaacctcaacggagtgaccggctggcggtgtgcca
gcccattttggcggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgt
acttcagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaa
gatttcgtaggggactggcgccagacagcc

SEQ ID NO: 127 (L27V CP 15 TEV)

MGYNLDQVLEQGGVSSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFK
VVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLI
NPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLE
DFVGDWRQTA

10

SEQ ID NO: 128 (L27V CP 18 TEV)

ctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaac
tccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcc
cgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaagggtgtgtacct
gtggatgatcatcactttaagggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgcc
gaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatca
ctgtaaccgggaccctgtggaacggcaaaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccgccgagcgc
tcctgctgttcccgcttaacctcaacggagtgaccggctggcggtgtgagagcgcattttggc
gggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcg
ataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggg
gactggcgccagacagccggctacaac

15

SEQ ID NO: 129 (L27V CP 18 TEV)

LDQVLEQGGVSSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYP
VDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDG
SLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVG
DWRQTAGYN

20

SEQ ID NO: 130 (L27V CP 21 TEV)

gtccttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcca
aaggattgtcctgagcgggtgaaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaag
gtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgat
catcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgat
cgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccg
ggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgaacggctccctgctg
ttccgcgtaaccatcaacggagtgaaccggctggcggctgtgagcgcattttggcgggaagttc
tgggtggaggaagttctgggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaa
gttctgggtggaggaagttctgggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcgg
cagacagccggctacaacactggacca

SEQ ID NO: 131 (L27V CP 21 TEV)

VLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDD
HHFKVILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSL
FRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWR
QTAGYNLDQ

5

SEQ ID NO: 132 (L27V CP 24 TEV)

cagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgt
cctgagcgggtgaaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctgagcg
gcgatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcacttt
aaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactattt
cggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgt
ggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgaacggctccctgctgtttccgcgta
accatcaacggagtgaaccggctggcggctgtgagcgcattttggcgggaagttctgggtggagg
aagttctgggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacgggaagttctgggtg
gaggaagttctgggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagcc
ggctacaacactggaccaagtccttgag

10

SEQ ID NO: 133 (L27V CP 24 TEV)

QGGVSSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHF
KVILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRV
TINGVTGWRLCERILAGSSGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTA
GYNLDQVLE

15

SEQ ID NO: 134 (L27V CP 27 TEV)

gtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgg
tgaaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctgagcggcgatcaga
tgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatt
ctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggcc
gtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggca
acaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgaacggctccctgctgtttccgcgtaaccatcaac
ggagtgaaccggctggcggctgtgagcgcattttggcgggaagttctgggtggaggaagttctgg
tggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacgggaagttctgggtggaggaagtt
ctgggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaac
ctggaccaagtccttgagcagggcgggt

20

SEQ ID NO: 135 (L27V CP 27 TEV)

VSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVI
LHYGTLVIDGVT PN MIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTIN
GVTGWRLCERILAGSSGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYN
LDQVLEQGG

SEQ ID NO: 136 (L27V CP 34 TEV)

atgctcgggggtgctccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagat
cgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaa
tttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcaactatggcacactg
gtaatcgacgggggttacgcgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgt
gttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagc
gcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcgg
ctgtgagcagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactga
gaacttgacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgttta
cactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgag
cagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaat

5

SEQ ID NO: 137 (L27V CP 34 TEV)

MLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTL
VIDGVT PN MIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWR
LCERILAGSSGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLE
QGGVSSSLFQN

10

SEQ ID NO: 138 (L27V CP 40 TEV)

Atgcgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcat
cccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtgggtgtacc
ctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcaactatggcacactggtaatcgacgggggttacg
ccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagat
cactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacg
gtccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgagcagcgcattttg
gcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgacttccagag
cgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtag
gggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgtgtccag
ttgtttcagaatctcgggggtgctccgtaact

15

SEQ ID NO: 139 (L27V CP 40 TEV)

MPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVT
PN MIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERIL
AGSSGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSS
LFQNLGVSVT

20

SEQ ID NO: 140 (L27V CP 43 TEV)

Atgaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatga
aggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatg
atcatcactttaaggtgattctgcaactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatg
atcgactatttcggacggccgctatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaac
cgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccocgacggctccctgc
tgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgagcgcattttggcgggaagt
tctgggtggaggaagttctgggtggagagcctaactactgagaacttgtacttccagagcgataacgg
aagttctgggtggaggaagttctgggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggc
ggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgtgtccagtttggttcag
aatctcgggggtgtccgtaactccgatccaa

SEQ ID NO: 141 (L27V CP 43 TEV)

MRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVT
PNM IDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGS
SGGSSSGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSSGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQ
NLGVSVTPIQ

5

SEQ ID NO: 142 (L27V CP 44 TEV)

Atgattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaagg
tctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatc
atcactttaaggtgattctgcaactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatc
gactatttcggacggccgctatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgg
gaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccocgacggctccctgctgt
tccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgagcgcattttggcgggaagttct
gggtggaggaagttctgggtggagagcctaactactgagaacttgtacttccagagcgataacgggaag
ttctgggtggaggaagttctgggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggc

agacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgtgtccagtttggttcagaat
ctcgggggtgtccgtaactccgatccaaagg

10

SEQ ID NO: 143 (L27V CP 44 TEV)

MIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVT
PNMI DYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSS
GGGSSSGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSSGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQN
LGVSVTPIQR

15

SEQ ID NO: 144 (L27V CP 45 TEV)

Atggctcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctc
gagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatc
actttaaggtgattctgcaactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgac
tatttcggacggccgctatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggac
cctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccocgacggctccctgctgttcc
gcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgagcgcattttggcgggaagttctgggt
ggaggaagttctgggtggagagcctaactactgagaacttgtacttccagagcgataacgggaagttc
tgggtggaggaagttctgggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcaga
cagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgtgtccagtttggttcagaatctc
gggggtgtccgtaactccgatccaaaggatt

SEQ ID NO: 145 (L27V CP 45 TEV)

MVLSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEKIFKV VYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMID
YFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI I DERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSG
GGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNL
GVSVTPIQRI

SEQ ID NO: 146 (L27V CP 46 TEV)

5

Atgctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgag
cggcgatcagatgggccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcact
ttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactat
ttcggacggcogtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccct
gtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccocgacggctccctgctgttccgcg
taaccatcaacggagtgaaccgctggcggtgtgacgagcgcattttggcggaagttctggtgga
ggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctgg
tggaggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacag
ccggtacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcggg
gtgtccgtaactccgatccaaaggatt

SEQ ID NO: 147 (L27V CP 46 TEV)

MLSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEKIFKV VYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDY
FGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI I DERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGG
SSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLG
VSVTPIQRI

10

SEQ ID NO: 148 (L27V CP 47 TEV)

atgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcgg
cgatcagatgggccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcacttta
aggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatctc
ggacggcogtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtg
gaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccocgacggctccctgctgttccgcgtaa
ccatcaacggagtgaaccgctggcggtgtgacgagcgcattttggcggaagttctggtggagga
agttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtgg

aggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccg
gctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtg
tccgtaactccgatccaaaggattgtcctg

15

SEQ ID NO: 149 (L27V CP 47 TEV)

MSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEKIFKV VYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYF
GRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI I DERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGG
SSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLG
VSVTPIQRI

20

SEQ ID NO: 150 (L27V CP 48 TEV)

atgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcga
 tcagatggggccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagg
 tgattctgcaactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcgga
 cggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaa
 cggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgaaggctccctgctgttccgcgtaacca
 tcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcattttggcgggaagtctctggtggaggaagt
 tctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgcataacgggaagtctctggtggagg
 aagtctctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggct
 acaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtcc
 gtaactccgatccaaaggattgtcctgagcg

SEQ ID NO: 151 (L27V CP 48 TEV)

MGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFG
 RPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGS
 5 SGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVS
 VTPIQRIVLS

SEQ ID NO: 152 (L27V CP 49 TEV)

atggaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatca
 gatggggccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtga
 ttctgcaactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacgg
 ccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaaacgg
 caacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgaaggctccctgctgttccgcgtaaccatca
 acggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcattttggcgggaagtctctggtggaggaagtct
 ggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgcataacgggaagtctctggtggaggaag
 ttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctaca
 acctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgta
 actccgatccaaaggattgtcctgagcgggt

SEQ ID NO: 153 (L27V CP 49 TEV)

MENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGR
 PYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGSS
 10 GGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVS
 VTPIQRIVLSG

SEQ ID NO: 154 (L27V CP 50 TEV)

atgaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagat
 gggccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattc
 tgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccg
 tatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaaacggcaa
 caaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgaaggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacg
 gagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcattttggcgggaagtctctggtggaggaagtctctggt

ggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgcataacgggaagtctctggtggaggaagtct
 tgggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacc
 tggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaact
 ccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaa

SEQ ID NO: 155 (L27V CP 50 TEV)

MNGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRP
YEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSG
GEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVT
PIQRIVLSGE

SEQ ID NO: 156 (L27V CP 51 TEV)

5

atgggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatggg
ccagatcgaaaaattttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgc
actatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgat
gaagggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaaca
aattatcgacgagcgccatcaaccccagcggctccctgtgttcgogtaaccatcaacggag
tgaccggctggcggctgtgagagcgcattttgccgggaagttctgggtggaggaagttctgggga
gagcctactactgagaacttgacttccagagcgataacggaagttctgggtggaggaagttctgg
tggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctgg
accaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccg
atccaaagattgtcctgagcgggtgaaaac

SEQ ID NO: 157 (L27V CP 51 TEV)

MGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPY
EGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGG
EPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTP
IQRIVLSGEN

10

SEQ ID NO: 158 (L27V CP 52 TEV)

atgctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcca
gatcgaaaaattttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcact
atggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaa
ggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaat
tatcgacgagcgccatcaaccccagcggctccctgtgttcgocgtaaccatcaacggagtga
ccggctggcggctgtgagagcgcattttgccgggaagttctgggtggaggaagttctgggtggagag
cctactactgagaacttgacttccagagcgataacggaagttctgggtggaggaagttctgggtgg
aatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggacc
aagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatc
caaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggc

15

SEQ ID NO: 159 (L27V CP 52 TEV)

MLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYE
GIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGE
PTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPI
QRIVLSGENG

20

SEQ ID NO: 160 (L27V CP 53 TEV)

atgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggccagat
cgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatg
gcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggc
atcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaaaaaattat
cgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaacatcaacggagtgaccg

gctggcggctgtgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcct
actactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaat
ggtgtttacactogaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaag
tccttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaa
aggattgtcctgagcggtgaaaacggcctg

SEQ ID NO: 161 (L27V CP 53 TEV)

MKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEG
IAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEP
TTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQ
RIVLSGENGL

5

SEQ ID NO: 162 (L27V CP 54 TEV)

atgatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggccagatcga
aaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggca
cactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcacc
gocgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaaaaaattatcga
cgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaacatcaacggagtgaccggct
ggcggctgtgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctact
actgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggt
gtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtc
ttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaagg
attgtcctgagcggtgaaaacggcctgaag

10

SEQ ID NO: 163 (L27V CP 54 TEV)

MIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGI
AVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPT
TENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQR
IVLSGENGLK

15

SEQ ID NO: 164 (L27V CP 55 TEV)

atggacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggccagatcgaaaa
aatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacac
tggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgcc
gtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaaaaaattatcgacga
gcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaacatcaacggagtgaccggctggc
ggctgtgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactact
gagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtt
tactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttg
agcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggatt
gtcctgagcggtgaaaacggcctgaagatc

20

SEQ ID NO: 165 (L27V CP 55 TEV)

MDIHV I I P Y E G L S G D Q M G Q I E K I F K V V Y P V D D H H F K V I L H Y G T L V I D G V T P N M I D Y F G R P Y E G I A V F D G K K I T V T G T L W N G N K I I D E R L I N P D G S L L F R V T I N G V T G W R L C E R I L A G S S G G G S S G G E P T T E N L Y F Q S D N G S S G G G S S G G M V F T L E D F V G D W R Q T A G Y N L D Q V L E Q G G V S S L F Q N L G V S V T P I Q R I V L S G E N G L K I

SEQ ID NO: 166 (L27V CP 56 TEV)

Atgatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggccagatcgaaaaat
ttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactgg
taatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtg
ttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcg
cctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggc
tgtgagcgcattttggcggaagtctggtggaggaagtctggtggagagcctactactgag
aacttgacttccagagcgataacggaagtctggtggaggaagtctggtggaatgggtgttac
actcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagc
agggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtc
ctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcga

5

SEQ ID NO: 167 (L27V CP 56 TEV)

MIHV I I P Y E G L S G D Q M G Q I E K I F K V V Y P V D D H H F K V I L H Y G T L V I D G V T P N M I D Y F G R P Y E G I A V F D G K K I T V T G T L W N G N K I I D E R L I N P D G S L L F R V T I N G V T G W R L C E R I L A G S S G G G S S G G E P T T E N L Y F Q S D N G S S G G G S S G G M V F T L E D F V G D W R Q T A G Y N L D Q V L E Q G G V S S L F Q N L G V S V T P I Q R I V L S G E N G L K I D

10

SEQ ID NO: 168 (L27V CP 58 TEV)

atggatcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggccagatcgaaaaat
gggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcg
acggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgac
ggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgat
caaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggcgtgtgcg
agcgcattttggcggaagtctggtggaggaagtctggtggagagcctactactgagaacttg
tacttccagagcgataacggaagtctggtggaggaagtctggtggaatgggtgtttactcga
agatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcg
gtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagc
ggtgaaaacggcctgaagatcgacatccat

15

SEQ ID NO: 169 (L27V CP 58 TEV)

MV I I P Y E G L S G D Q M G Q I E K I F K V V Y P V D D H H F K V I L H Y G T L V I D G V T P N M I D Y F G R P Y E G I A V F D G K K I T V T G T L W N G N K I I D E R L I N P D G S L L F R V T I N G V T G W R L C E R I L A G S S G G G S S G G E P T T E N L Y F Q S D N G S S G G G S S G G M V F T L E D F V G D W R Q T A G Y N L D Q V L E Q G G V S S L F Q N L G V S V T P I Q R I V L S G E N G L K I D I H

20

SEQ ID NO: 170 (L27V CP 64 TEV)

atgggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtgga
tgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaaca
tgatcgactatctcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgta
accgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgcaggctccct
gctgttccgcgtaaacatcaacggagtgaccggctggcggctgtgacgagcgcattttggcgggaa
gttctggtggaggaagttctggtggagagcctaactactgagaacttgtacttccagagcgataac
ggaagttctggtggaggaagttctggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactg
gcccagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttc
agaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaaaacggcctgaag
atcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa

SEQ ID NO: 171 (L27V CP 64 TEV)

MGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITV
TGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGSSGGEPPTENLYFQSDN
GSSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQIRIVLSGENGLK
IDIHVIIPYE

5

SEQ ID NO: 172 (L27V CP 67 TEV)

atgggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatca
ctttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgact
atctcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggacc
ctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgcaggctccctgctgttccg
cgtaaacatcaacggagtgaccggctggcggctgtgacgagcgcattttggcgggaagttctggtg
gaggaagttctggtggagagcctaactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttct
ggtggaggaagttctggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagac
agccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcg
gggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaaaacggcctgaagatcgacatc
catgtcatcatcccgtatgaaggtctgagc

10

SEQ ID NO: 173 (L27V CP 67 TEV)

MGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGT
LWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGSSGGEPPTENLYFQSDNGSS
GGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQIRIVLSGENGLKIDI
HVIIIPYEGLS

15

SEQ ID NO: 174 (L27V CP 70 TEV)

atgatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggt
gattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatctcggac
ggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaac
ggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgcaggctccctgctgttccgcgtaaacat
caacggagtgaccggctggcggctgtgacgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagtt
ctggtggagagcctaactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggagga
agttctggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggct
caacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccg
taactccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatc
atcccgtatgaaggtctgagcggcgatcag

20

SEQ ID NO: 175 (L27V CP 70 TEV)

MMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWN
GNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGSSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGG
SSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVI
IPYEGLSGDQ

SEQ ID NO: 176 (L27V CP 73 TEV)

atgatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgca
ctatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggccgtatg
aaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaaaaa
attatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagt
gaccggctggcggctgtgacgagcgcaatctggcggaagtctcggaggaggaaagtctcggaggag
agcctaactgagaacttgtacttccagagcgataaacggaagtctcggaggaggaaagtctcggg
ggaatggtgtttacactcgaagattctcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctgga
ccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccga
tccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgat
gaaggtctgagcggcgatcagatgggcccag

5

SEQ ID NO: 177 (L27V CP 73 TEV)

MIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNK
IIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGSSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSG
GMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPY
EGLSGDQMGQ

10

SEQ ID NO: 178 (L27V CP 76 TEV)

atgatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcac
actggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggccgtatgaaggcatcg
ccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaaaaaattatcgac
gagcgccctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctg
goggctgtgacgagcgcaatctggcggaagtctcggaggaggaaagtctcggaggagagccta
ctgagaacttgtacttccagagcgataaacggaagtctcggaggaggaaagtctcggaggaaatggtg
ttacactcgaagattctcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtct
tgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaagga
ttgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctg
agcggcgatcagatgggcccagatcgaaaa

15

SEQ ID NO: 179 (L27V CP 76 TEV)

MIKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIID
ERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGSSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMV
FTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPY
EGLSGDQMGQIEK

20

SEQ ID NO: 180 (L27V CP 79 TEV)

Atggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcaactatggcacactggtaat
cgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcgacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcg
acggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgctg
atcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaacctcaacggagtgaccggctggcggctgtg
cgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaact
tgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactc
gaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcaggg
cggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctga

gcggtgaaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctcgagcggcgat
cagatgggcccagatcgaaaaaatttttaag

SEQ ID NO: 181 (L27V CP 79 TEV)

MVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERL
INPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTL
EDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGD
QMGQIEKIFK

5

SEQ ID NO: 182 (L27V CP 80 TEV)

atggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcaactatggcacactggtaatcga
cgggggttacgccgaacatgatcgactatctcgacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacg
gcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgctgatc
aaccccgacggctccctgctgttccgcgtaacctcaacggagtgaccggctggcggctgtgoga
gogcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgt
acttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactcga
gatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgg
tgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcg
gtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctcgagcggcgatcag
atgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtg

10

SEQ ID NO: 183 (L27V CP 80 TEV)

MVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLI
NPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLE
DFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQ
MGQIEKIFKV

15

SEQ ID NO: 184 (L27V CP 81 TEV)

atgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcaactatggcacactggtaatcgacgg
ggttacgocgaacatgatcgactatctcgacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggca
aaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgctgatcaac
cccgacggctccctgctgttccgcgtaacctcaacggagtgaccggctggcggctgtgogagcg
cattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtact
tccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagat
ttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgt
gtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtg
aaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctcgagcggcgatcagatg
ggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtg

20

SEQ ID NO: 185 (L27V CP 81 TEV)

MYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLIN
PDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLED
FVGDRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQM
GQIEKIFKVV

SEQ ID NO: 186 (L27V CP 82 TEV)

atgcctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggt
tacgccgaacatgatcgactatctcgacggccgctatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaa
agatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaaaaaattatcgacgagcgcctgatcaacccc
gacggctccctgctgttccgcgtaacctcaacggagtgaaccggctggcggctgtgagagcgc
tttgccgggaagttctgggtggaggaagttctgggtggagagcctactactgagaacttgacttcc
agagcgataaacggaagttctgggtggaggaagttctgggtggaatggtgtttactcgaagattc
gtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgtgc

cagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaa
acggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggc
cagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtac

5

SEQ ID NO: 187 (L27V CP 82 TEV)

MPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINP
DGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDF
VGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMG
QIEKIFKVYV

10

SEQ ID NO: 188 (L27V CP 83 TEV)

atgggtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttac
gccgaacatgatcgactatctcgacggccgctatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaaga
tactgtaaccgggaccctgtggaacggcaaaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgcac
ggctccctgctgttccgcgtaacctcaacggagtgaaccggctggcggctgtgagagcgcatttt
ggcgggaagttctgggtggaggaagttctgggtggagagcctactactgagaacttgacttccaga
gcgataaacggaagttctgggtggaggaagttctgggtggaatggtgtttactcgaagatttcgta
ggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgtgtccag
ttgttttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacg
gcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccag
atcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccct

15

SEQ ID NO: 189 (L27V CP 83 TEV)

MVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPD
GSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFV
GDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQ
IEKIFKVYYP

20

SEQ ID NO: 190 (L27V CP 84 TEV)

atggatgatcatcaactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcc
gaacatgatcgactatctcgacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatca
ctgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggc
tcctgctgttccgcgtaaacatcaacggagtgaccggctggcggtgtgacgagcgcatcttggc
gggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcg
ataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggg
gactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagttt
gtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaaaacggcc
tgaagatcgacatccatgtcatcctccgatgaaggctctgagcggcgatcagatgggcccagatc
gaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtg

SEQ ID NO: 191 (L27V CP 84 TEV)

MDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDG
SLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVG
DWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQI
EKIFKVVYPV

5

SEQ ID NO: 192 (L27V CP 85 TEV)

atggatcatcaactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaa
catgatcgactatctcggaacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactg
taaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggctcc
ctgctgttccgcgtaaacatcaacggagtgaccggctggcggtgtgacgagcgcatcttggcggg
aagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgata
acggaagttctggtggaggaagttctggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggac

10

tggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttggt
tcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaaaacggccctga
agatcgacatccatgtcatcctccgatgaaggctctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaa
aaaatttttaaggtggtgtaccctgtggat

SEQ ID NO: 193 (L27V CP 85 TEV)

MDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGS
LLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGD
WRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIE
KIFKVVYPVD

15

SEQ ID NO: 194 (L27V CP 86 TEV)

atgcatcaactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacat
gatcgactatctcgacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaa
ccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggctccctg
ctgttccgcgtaaacatcaacggagtgaccggctggcggtgtgacgagcgcatcttggcggggaag
ttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacg
gaagttctggtggaggaagttctggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactgg
cggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttggttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaaaacggccctgaaga
tcgacatccatgtcatcctccgatgaaggctctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaa
atttttaaggtggtgtaccctgtggatgat

20

SEQ ID NO: 195 (L27V CP 86 TEV)

MHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSL
LFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDD

5 **SEQ ID NO: 196 (L27V CP 87 TEV)**

atgcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgat
cgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccg
ggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgctgatcaaccccgacggctccctgctg
ttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtgogagcgcattttggcggaagtctc
tgggtggaggaagttctgggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaa
gttctgggtggaggaagttctgggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcgg
cagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaa
tctcgggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcg
acatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatggggccagatcgaaaaaatt
tttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcat

10 **SEQ ID NO: 197 (L27V CP 87 TEV)**

MHFVKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSL
LFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWR
QTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKI
FKVVYPVDDH

SEQ ID NO: 198 (L27V CP 88 TEV)

atgtttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcga
ctatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccggga
ccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgctgatcaaccccgacggctccctgctgttc
cgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtgogagcgcattttggcggaagttctgg
tggaggaagttctgggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacgggaagtt

ctgggtggaggaagttctgggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcag
acagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatct
cgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgaca
tccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatggggccagatcgaaaaaattttt
aaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcac

15 **SEQ ID NO: 199 (L27V CP 88 TEV)**

MFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSL
LFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWR
QTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKI
FKVVYPVDDH

20 **SEQ ID NO: 200 (L27V CP 91 TEV)**

atgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcgg
acggccgatatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtgga
acggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggctccctgctgttcgcgtaacc
atcaacgggagtgaccggctggcggtgtgacgagcgcattttggcggaagtctcgggagggaag
ttctgggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagtctcgggagg
gaagtctcggggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggc
tacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgc
cgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtca
tcatcccgatgaaggctgagcggcgatcagatggggccagatcgaaaaatttttaagggtggtg
taccctgtggatgatcatcactttaagggtg

SEQ ID NO: 201 (L27V CP 91 TEV)

MILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVT
INGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAG
YNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSENGLKIDIHV I I PYEGLSGDQMGQIEKIFKVV
YPVDDHHFKV

5

SEQ ID NO: 202 (L27V CP 94 TEV)

atgtatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggccgta
tgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaaca
aaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggctccctgctgttcgcgtaaccatcaacgga
gtgaccggctggcggtgtgacgagcgcattttggcggaagtctcgggagggaagtctcgggtg
agagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagtctcgggagggaagtctc
gtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctg
gaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactcc
gatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcaccgt
atgaaggctgagcggcgatcagatggggccagatcgaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtg
gatgatcatcactttaagggtgattctgcacg

10

SEQ ID NO: 203 (L27V CP 94 TEV)

MYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTING
VTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNL
DQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSENGLKIDIHV I I PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPV
DDHHFKVILH

15

SEQ ID NO: 204 (L27V CP 95 TEV)

atgggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggccgatatga
aggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaa
ttatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggctccctgctgttcgcgtaaccatcaacggagt
accggctggcggtgtgacgagcgcattttggcggaagtctcgggagggaagtctcgggaggaga
gcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagtctcgggagggaagtctcgggtg
gaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggac
caagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgat
ccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcaccgtatg
aaggctgagcggcgatcagatggggccagatcgaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggat
gatcatcactttaagggtgattctgcactat

20

SEQ ID NO: 205 (L27V CP 95 TEV)

MGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGV
TGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLD
QVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVD
DHHFKVILHY

SEQ ID NO: 206 (L27V CP 97 TEV)

atgctggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggaacggccgatatgaaggcat
cgccgtggtcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcg
acgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggc
tggcggctgtgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctac
tactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatgg
tgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtc
cttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaag
gattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatatgaaggtc
tgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcat
5 cactttaagggtgattctgcactatggcaca

SEQ ID NO: 207 (L27V CP 97 TEV)

MLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTG
WRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQV
LEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDH
10 HFKVILHYGT

SEQ ID NO: 208 (L27V CP 100 TEV)

Atggacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggaacggccgatatgaaggcatcgccgtggt
cgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgc
tgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctg
tgagcgcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaa
cttgtaacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatgggtgtttacac
tcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcag
ggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcct
gagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatatgaaggctcgagcggcg
atcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaag
gtgattctgcactatggcacactggtaatc

SEQ ID NO: 209 (L27V CP 100 TEV)

MDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRL
CERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQ
GGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHFK
15 VILHYGTLVI

SEQ ID NO: 210 (L27V CP 101 TEV)

20

atggggggttacgcgaacatgatcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttoga
cggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctga
tcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaaccggctggcggtgtgc
gagcgcattttggcggaagtctctggtggaggaagtctctggtggagagcctactactgagaactt
gtacttccagagcgataacggaagtctctggtggaggaagtctctggtggaatggtgtttacactcg
aagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggc
ggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgag
cggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctctgagcggcgatc
agatgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagggtg
attctgcactatggcacactggtaatcgac

SEQ ID NO: 211 (L27V CP 101 TEV)

MGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLC
ERILAGSSGGSSSGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQG
GVSSLFQNLGVSVPPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHFKV
5 ILHYGTLVID

SEQ ID NO: 212 (L27V CP 102 TEV)

atggttacgcgaacatgatcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacgg
caaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatca
accccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaaccggctggcggtgtgagag
cgcattttggcggaagtctctggtggaggaagtctctggtggagagcctactactgagaacttgta
cttccagagcgataacggaagtctctggtggaggaagtctctggtggaatggtgtttacactcgaag
atctcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggt
gtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgg
tgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctctgagcggcgatcaga
tgggccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagggtgatt
ctgcactatggcacactggtaatcgacggg

SEQ ID NO: 213 (L27V CP 102 TEV)

MVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCE
RILAGSSGGSSSGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGG
VSSLFQNLGVSVPPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHFKVI
10 LHYGTLVIDG

SEQ ID NO: 214 (L27V CP 103 TEV)

atgacgccgaacatgatcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaa
aaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaacc
ccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaaccggctggcggtgtgagagcgc
atcttggcggaagtctctggtggaggaagtctctggtggagagcctactactgagaacttgactt
ccagagcgataacggaagtctctggtggaggaagtctctggtggaatggtgtttacactcgaagatt
tcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgtg
tccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtga
aaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctctgagcggcgatcagatgg
gcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagggtgattctg
cactatggcacactggtaatcgacggggtt

SEQ ID NO: 215 (L27V CP 103 TEV)

20

MTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCER
ILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGV
SSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVIL
HYGTLVIDGV

SEQ ID NO: 216 (L27V CP 104 TEV)

atgccgaacatgatcgactatcttcggacggccggtatgaaggcatcgccggtgttcgacggcaaaaa
gatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccg
acggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgacgagcgatt
ttggcgggaagtctctggtggaggaagtctctggtggagagcctactactgagaacttgtacttcca
gagcgataacggaagtctctggtggaggaagtctctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcg
taggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtcc
agtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaa
cggcctgaagatcgacatccatgtcatcaccgatgaaggctctgagcggcgatcagatggggc
agatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcac
tatggcacactggtaatcgacggggttacg

5

SEQ ID NO: 217 (L27V CP 104 TEV)

MPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERI
LAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVS
SLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILH
YGTLVIDGVT

10

SEQ ID NO: 218 (L27V CP 105 TEV)

atgaacatgatcgactatcttcggacggccggtatgaaggcatcgccggtgttcgacggcaaaaagat
cactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacg
gctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgacgagcgattttg
gcggaagtctctggtggaggaagtctctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagag
cgataacggaagtctctggtggaggaagtctctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtag
gggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagt
ttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacgg
cctgaagatcgacatccatgtcatcaccgatgaaggctctgagcggcgatcagatggggcaga

tcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactat
ggcacactggtaatcgacggggttacg

15

SEQ ID NO: 219 (L27V CP 105 TEV)

MNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERIL
AGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSS
LFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHY
GTLVIDGVT

20

SEQ ID NO: 220 (L27V CP 106 TEV)

atgatgatogactatctcgacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcac
tgaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggct
ccctgctgttccgcgtaaacatcaacggagtgaccggctggcggctgtgagagcgcatcttggcg
ggaagttctggtggaggaagtctggtggagagccactactgagaacttgtacttccagagcga
taacggaagtctggtggaggaagtctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtagggg
actggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccctgagcagggcgggtgtgtccagtttg
tttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcct
gaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggcgatcagatgggcccagatcg
aaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggc
acactggtaatcgacggggttacgcgaac

SEQ ID NO: 221 (L27V CP 106 TEV)

MMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA
GSSGGSSSGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSSGMVF TLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSL
FQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYG
TLVIDGVTPN

5

SEQ ID NO: 222 (L27V CP 109 TEV)

atgtatctcgacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgg
gaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggctccctgctgt
tccgcgtaaacatcaacggagtgaccggctggcggctgtgagagcgcatcttggcgggaagttct
ggtggaggaagtctggtggagagccactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaag
ttctggtggaggaagtctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggc
agacagccggctacaacctggaccaagtccctgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaat
ctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcga
catccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaattt
ttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggta
atcgacggggttacgcgaacatgatcgac

10

SEQ ID NO: 223 (L27V CP 109 TEV)

MYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSS
GGGSSSGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSSGMVF TLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNL
LGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLV
IDGVTPNMID

15

SEQ ID NO: 224 (L27V CP 112 TEV)

atgcccggcgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtg
gaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaa
ccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgagagcgcatcttggcgggaagttctggtggagga
agttctggtggagagccactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtgg
aggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccg
gctacaacctggaccaagtccctgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtg
tccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgt

catcatcccgatgaaggctctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtgg
tgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggg
gttacgcgaacatgatogactatctcgga

SEQ ID NO: 225 (L27V CP 112 TEV)

20

MRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGG
SSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSSLFQNLGV
SVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDG
VTPNMIDYFG

SEQ ID NO: 226 (L27V CP 115 TEV)

atggaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaa
caaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgaoggetccctgctgttccgcgtaaccatcaacg
gagtgaccggctggcggctgtgagcgccattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggt
ggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttc
tgggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacc
tggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaact
ccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatccc
gtatgaaggctctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctg
tggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccc
aacatgatcgactatttcggacggccgat

5

SEQ ID NO: 227 (L27V CP 115 TEV)

MEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSG
GEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSSLFQNLGVSVT
PIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTP
NMIDYFGRPY

10

SEQ ID NO: 228 (L27V CP 120 TEV)

atgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacga
gcgcctgatecaaccccgaoggetccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggc
ggctgtgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactact
gagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtt
tacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttg
agcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggatt
gtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgag
cggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcact
ttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcccgaacatgatcgactat
ttcggacggccgatgaaggcatcgtggcc

15

SEQ ID NO: 229 (L27V CP 120 TEV)

MFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTT
ENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSSLFQNLGVSVTPIQRI
VLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDY
FGRPYEGIVA

20

SEQ ID NO: 230 (L27V CP 121 TEV)

atggaaggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcg
cctgatcaaccccgaoggetccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggc
tgtgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgag
aacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttac
actcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagc
agggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtc

ctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcgg
cgatcagatggggccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcacttta
aggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttc
ggacggccgtatgaaggeatcgccgtgttc

SEQ ID NO: 231 (L27V CP 121 TEV)

5

MDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTE
NLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIV
LSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYF
GRPYEGIAVF

SEQ ID NO: 232 (L27V CP 123 TEV)

atgaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgat
caaccocgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaaccggctggcggctgtgog
agcgcattttggcgggaagttctgggtggaggaagttctgggtggagagcctactactgagaacttg
tacttccagagcgataacggaagttctgggtggaggaagttctgggtggaatgggtgtttactcga
agatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccctgagcagggcg
gtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagc
ggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatca
gatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtga
ttctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacgg
ccgtatgaaggeatcgccgtgttcgacggc

10

SEQ ID NO: 233 (L27V CP 123 TEV)

MKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENL
YFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLS
GENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGR
PYEGIAVFDG

15

SEQ ID NO: 234 (L27V CP 124 TEV)

Atgaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaa
cccgcacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaaccggctggcggctgtgogagc
gcattttggcgggaagttctgggtggaggaagttctgggtggagagcctactactgagaacttgta
ttccagagcgataacggaagttctgggtggaggaagttctgggtggaatgggtgtttactcgaaga
tttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccctgagcagggcgggtg
tgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggt
gaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagat
gggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattc
tgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccg
tatgaaggeatcgccgtgttcgacggcaaa

20

SEQ ID NO: 235 (L27V CP 124 TEV)

MKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLY
FQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSG
ENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGR
YEGIAVFDGK

SEQ ID NO: 236 (L27V CP 125 TEV)

atgatcaactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaacc
cgacggctccctgctgttcccgcgtaaccatcaacggagtgaaccggctggcggctgtgagcgcga
ttttggcgggaagtctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtaactc
cagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagattt
cgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgt

ccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaa
aacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatggg
ccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgc
actatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtat
gaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaag

SEQ ID NO: 237 (L27V CP 125 TEV)

5

MITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYF
QSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGE
NGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPY
EGIAVFDGKK

SEQ ID NO: 238 (L27V CP 129 TEV)

atggggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccocgacggctccct
gctgttcccgcgtaaccatcaacggagtgaaccggctggcggctgtgagcgcgcattttgccgggaa
gttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtaactccagagcgataac
ggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactg
gcccagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttc
agaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaaaacggcctgaag
atcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaa
aatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacac
tggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgcc
gtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacc

10

SEQ ID NO: 239 (L27V CP 129 TEV)

MGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDN
GSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENLK
IDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIA
VFDGKKITVT

15

SEQ ID NO: 240 (L27V CP 130 TEV)

atgaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccocgacggctccctgct
gttcccgcgtaaccatcaacggagtgaaccggctggcggctgtgagcgcgcattttgccgggaaagt
ctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtaactccagagcgataacgga
agttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcg
gcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcaga
atctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaaaacggcctgaagatc
gacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaat
ttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactgg
taatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtg
ttcgacggcaaaaagatcactgtaaccggg

20

SEQ ID NO: 241 (L27V CP 130 TEV)

MTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNG
SSGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKI
DIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAV
FDGKKITVTG

SEQ ID NO: 242 (L27V CP 131 TEV)

5

atgctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgctgatcaaccccgacggctccctgctggt
ccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtgacgagcgcatTTTggcggaagtctg
gtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagt
tctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttctaggggactggcgga
gacagccggtacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatc
tcggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgac
atccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatTTT
taaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaa
tcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttc
gacggcaaaaagatcactgtaaccgggacc

SEQ ID NO: 243 (L27V CP 131 TEV)

MLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGS
SGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKID
IHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVF
DGKKITVTGT

10

SEQ ID NO: 244 (L27V CP 133 TEV)

atgaacggcaacaaaattatcgacgagcgctgatcaaccccgacggctccctgctggtccgcgt
aaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtgacgagcgcatTTTggcggaagtctggtggag
gaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggt
ggaggaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttctaggggactggcggcagacagc
cggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggg
tgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccat
gtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatTTTTaaggt
ggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacg
gggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggc
aaaagatcactgtaaccgggacctgtggg

15

SEQ ID NO: 245 (L27V CP 133 TEV)

MNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSG
GGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIH
VIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDG
KKITVTGTLW

20

SEQ ID NO: 246 (L27V CP 136 TEV)

atgaaaattatcgacgagcgcctgatcaacccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaa
cggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctg
gtggagagcctaactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaag
tctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctaaa
cctggaccaagtccttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgcccgtaa
ctccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatc
ccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtacc
tgtgatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgc
cgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatc
actgtaaccgggaccctgtggaacggcaac

SEQ ID NO: 247 (L27V CP 136 TEV)

MKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGS
SGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII
PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKI
TVTGTLWNGN

5

SEQ ID NO: 248 (L27V CP 139 TEV)

atggacgagcgcctgatcaacccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgac
cggctggcggctgtgcgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagc
ctaactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtgga
atggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggacca
agtccttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgcccgtaacccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcogaacatga
tcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacc
gggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgc

10

SEQ ID NO: 249 (L27V CP 139 TEV)

MDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGG
MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDER

15

SEQ ID NO: 250 (L27V CP 140 TEV)

atggagcgcctgatcaacccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccgg
ctggcggctgtgcgagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagccta
ctaactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatg
gtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagt
ccttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgcccgtaacccgatccaaa
ggattgtcctgagcgggtgaaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaaggt
ctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatca
tcaactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcogaacatgatcg
actatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccggg
acctgtggaacggcaacaaaattatcgac

SEQ ID NO: 251 (L27V CP 140 TEV)

20

MERLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGM
VFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEG
LSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTG
TLWNGNKIID

SEQ ID NO: 252 (L27V CP 141 TEV)

atgcgctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctg
goggtgtgagagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctacta
ctgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtg
tttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtcct
tgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaagga
ttgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgcatcatcccgtatgaaggtctg
agcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatca
ctttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgact
atctcggaaggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggacc
ctgtggaacggcaacaaaattatcgacgag

5

SEQ ID NO: 253 (L27V CP 141 TEV)

MRLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMV
FTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEG
SGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGT
LWNGNKIID

10

SEQ ID NO: 254 (L27V CP 142 TEV)

atgctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcg
gctgtgagagcgcattttggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactg
agaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgttt
acactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttga
gcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattg
tcttgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgcatcatcccgtatgaaggtctgagc
ggcgatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactt
taaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatt
tcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctg
tggaacggcaacaaaattatcgacgagcgc

15

SEQ ID NO: 255 (L27V CP 142 TEV)

MLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVF
TLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLS
GDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTL
WNGNKIID

20

SEQ ID NO: 256 (L27V CP 143 TEV)

atgatecaacccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggt
gtgcgagcgcattttggcgggaagtctctggtggaggaagtctctggtggagagcctactactgaga
acttgtacttccagagcgataacggaagtctctggtggaggaagtctctggtggaatggtgtttaca
ctcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagca
ggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcc
tgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggc
gatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcacttta
ggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcogaacatgatcgactatttcg

gacggcctgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtgg
aacggcaacaaaattatcgacgagcgcctg

SEQ ID NO: 257 (L27V CP 143 TEV)

MINPDGSLFRVTVINGVWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFT
LEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDHVIIPYEGLSG
DQMGQIEKIFKVVPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGLW
NGNKIIDERL

5

SEQ ID NO: 258 (L27V CP 144 TEV)

atgaacccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtctgtg
cgagcgcattttggcgggaagtctctggtggaggaagtctctggtggagagcctactactgagaact
tgtacttccagagcgataacggaagtctctggtggaggaagtctctggtggaatggtgtttacactc
gaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcaggg
cgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctga
gcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggcgat
cagatgggcccagatcgaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggt
gattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcogaacatgatcgactatttcggac
ggcctgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaac
ggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatc

10

SEQ ID NO: 259 (L27V CP 144 TEV)

MNPDGSLFRVTVINGVWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTL
EDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDHVIIPYEGLSGD
QMGQIEKIFKVVPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGLWN
GNKIIDERLI

15

SEQ ID NO: 260 (L27V CP 145 TEV)

atgccccgacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtctgtgca
gogcattttggcgggaagtctctggtggaggaagtctctggtggagagcctactactgagaacttgt
acttccagagcgataacggaagtctctggtggaggaagtctctggtggaatggtgtttacactcgaa
gatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgg
tgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcg
gtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggcgatcag
atgggcccagatcgaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgat
ctctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcogaacatgatcgactatttcggacggc
cgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggc
aacaaaattatcgacgagcgcctgatcaac

SEQ ID NO: 261 (L27V CP 145 TEV)

MPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLE
DFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQ
MGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNG
NKIIDERLIN

5 **SEQ ID NO: 262 (L27V CP 146 TEV)**

atggacggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcg
cattttggcgggaagtctctggtggaggaagtctctggtggagagcctactactgagaacttgtact
tccagagcgataacggaagtctctggtggaggaagtctctggtggaatggtgtttacactcgaagat
ttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgt
gtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtg
aaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatg
ggccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcactttaaggtgattct

gcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatctcgacggccgt
atgaaggcagcgcgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaac
aaaattatcgacgagcgcctgatcaacccc

SEQ ID NO: 263 (L27V CP 146 TEV)

10 MDGSELLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLED
FVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQM
GQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGN
KIIDERLINP

SEQ ID NO: 264 (L27V CP 147 TEV)

atgggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcgcat
tttggcgggaagtctctggtggaggaagtctctggtggagagcctactactgagaacttgtacttcc
agagcgataacggaagtctctggtggaggaagtctctggtggaatggtgtttacactcgaagattc
gtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggtgtgtc
cagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaa
acggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggc
cagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcactttaaggtgattctgca
ctatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatctcgacggccgtatg
aaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaa
attatcgacgagcgcctgatcaaccccgac

15 **SEQ ID NO: 265 (L27V CP 147 TEV)**

MGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDF
VGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQM
QIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNK
IIDERLINPD

20 **SEQ ID NO: 266 (L27V CP 148 TEV)**

atgtccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcatttt
ggcgggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccaga
gcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactogaagatttccgta
ggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtcccttgagcagggcggtgtgtccag
tttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacg
gectgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccag
atcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcacta
tggcacactggtaatcgacggggttacgcogaacatgatcgactatttcggacggccgatgaag
gcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaatt
atcgacgagcgcctgatcaaccccgacggc

SEQ ID NO: 267 (L27V CP 148 TEV)

MSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFV
GDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQ
IEKIFKVVPVDDHFFKVLHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI
IDERLINPDG

5

SEQ ID NO: 268 (L27V CP 149 TEV)

atgctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcattttggc
gggaagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcg
ataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactogaagatttccgtaggg
gactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtcccttgagcagggcggtgtgtccagttt
gtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcc
tgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatc

10

gaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatgg
cacactggtaatcgacggggttacgcogaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggca
tcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatc
gacgagcgcctgatcaaccccgacggctcc

SEQ ID NO: 269 (L27V CP 149 TEV)

MLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVG
DWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQI
EKIFKVVPVDDHFFKVLHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKII
DERLINPDGS

15

SEQ ID NO: 270 (L27V CP 150 TEV)

atgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcattttggcggg
aagttctggtggaggaagttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgcata
acggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgtttacactogaagatttccgtaggggac
tggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtcccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtt
tcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggccctga
agatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaa
aaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcac
actggtaatcgacggggttacgcogaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcg
ccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgac
gagcgcctgatcaaccccgacggctccctg

20

SEQ ID NO: 271 (L27V CP 150 TEV)

MLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGD
WRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIE
KIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIID
ERLINPDGSL

SEQ ID NO: 272 (L27V CP 151 TEV)

5

atgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcgctgtgcgagcgcattttggcgggaag
ttctgggtggaggaagttctgggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgcataacg
gaagtctgggtggaggaagttctgggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactgg
cggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggccagatcgaaaa
atttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacact
ggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggccgtatgaaggcatcgccg
tgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgag
cgctgatcaaccccgacggctccctgctg

SEQ ID NO: 273 (L27V CP 151 TEV)

MFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDE
RLINPDGSL

10

SEQ ID NO: 274 (L27V CP 154 TEV)

atgaccatcaacggagtgaccggctggcgctgtgcgagcgcattttggcgggaagttctgggtgg
aggaagttctgggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgcataacgggaagttctg
gtggaggaagttctgggtggaatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagaca
gccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgg
gggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatcc

atgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggccagatcgaaaaatttttaag
gtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcga
cggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacg
gcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatc
aaccccgacggctccctgctgtttccgcgta

15

SEQ ID NO: 275 (L27V CP 154 TEV)

MTINGVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQT
AGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFK
VVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLI
NPDGSLFRV

20

SEQ ID NO: 276 (L27V CP 156 TEV)

atgaacggagtgaccggctggcggctgtgagagcgcatTTTggcgggaagttctggtggaggaag
ttctggtggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggag
gaagttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggc
tacaacctggaccaagtcccttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgc
cgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtca
tcaccccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtg
tacctgtggatgatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggt
tacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaa
agatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaacccc
gacggctccctgctgttccgcgtaaccatc

SEQ ID NO: 277 (L27V CP 156 TEV)

MNGVTGWRLCERILAGSSGGSSSGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAG
YNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVY
YPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINP
DGSLLFRVTI

5

SEQ ID NO: 278 (L27V CP 157 TEV)

atgggagtgaccggctggcggctgtgagagcgcatTTTggcgggaagttctggtggaggaagttc
tggaggagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaa
gttctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctac
aacctggaccaagtcccttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgt
aactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatca
tcccgatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtac
cctgtggatgatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttac
gccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaaga
tactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgcac
ggctccctgctgttccgcgtaaccatcaac

10

SEQ ID NO: 279 (L27V CP 157 TEV)

MGVTGWRLCERILAGSSGGSSSGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGY
NLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVYVY
PVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPD
GSLFRVTIN

15

SEQ ID NO: 280 (L27V CP 158 TEV)

atggtgaccggctggcggctgtgagagcgcatTTTggcgggaagttctggtggaggaagttctgg
tgagagagcctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagtt
ctggtggaatggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaac
ctggaccaagtcccttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaac
tccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcc
cgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccct
gtggatgatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcc
gaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatca
ctgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgcacggc
tccctgctgttccgcgtaaccatcaacgga

20

SEQ ID NO: 281 (L27V CP 158 TEV)

MVTGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYN
LDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYP
VDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDG
SLLFRVTING

SEQ ID NO: 282 (L27V CP 160 TEV)

atgggctggcggtgtgctgagcgcatTTTTGGCGGGAAGTtctggtggaggaagttctggtggaga
gctactactgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtg
gaatggtgtttacactegaagatttctgtaggggactggcggcagacagccggtacaaacctggac
caagtccttgagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcggggtgtccgtaactccgat
ccaaaggattgtcctgagcggtgaaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatg
aaggtctgagcggcgatcagatgggccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggat
gatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgcogaacat
gatcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaa
ccgggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctg
ctgttccgcgtaaccatcaacggagtgacc

5

SEQ ID NO: 283 (L27V CP 160 TEV)

MGWRLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLD
QVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVD
DHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSL
LFRVTINGVT

10

SEQ ID NO: 284 (L27V CP 163 TEV)

atgctgtgagcgcatTTTTGGCGGGAAGTtctggtggaggaagttctggtggagagcctactac
tgagaacttgtacttccagagcgataacggaagttctggtggaggaagttctggtggaatggtgt
ttacactegaagatttctgtaggggactggcggcagacagccggtacaaacctggaccaagtcctt
gagcagggcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcggggtgtccgtaactccgatccaaaggat
tgtcctgagcggtgaaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctga
gcgcgatcagatgggccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcac
tttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgcogaacatgatcgacta
tttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccc
tgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgc
gtaaccatcaacggagtgaccggctggcgg

15

SEQ ID NO: 285 (L27V CP 163 TEV)

MLCERILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVL
EQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHH
FKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFR
VTINGVTGWR

20

SEQ ID NO: 286 (L27V CP 166 TEV)

AtgcgcatTTTTGGCGGGAAGTTCTGGTGGAGGAAGTTCTGGTGGAGAGCCTACTACTGAGAAGTT
GTACTTCCAGAGCGATAACGGAAGTTCTGGTGGAGGAAGTTCTGGTGGGAATGGTGTTTACACTCG
AAGATTTCTAGGGGACTGGCGGCAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCAAGTCTTGAGCAGGGC
GGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAAATCTCGGGGTGTCGGTAACCTCGATCCAAAGGATTGTCTGAG
CGGTGAAAACGGCCTGAAGATCGACATCCATGTCTCATCCCGTATGAAGGTCTGAGCGGGCAGT
AGATGGGCCAGATCGAAAAATTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTG
ATTCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTCCGACG
GCCGATGAAGGCATCGCCGTGTTGACGGCAAAAAGATCACTGTAACCGGGACCTGTGGAACG
GCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCCGCGTAACCATC
AACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAG

SEQ ID NO: 287 (L27V CP 166 TEV)

MRILAGSSGGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGGSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQG
GVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV I I PYEGLSGDQMGQIEKI FKVVYPVDDHHFKV
ILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI I DERLINPDGSLFRVTI
NGVTGWRLCE

5

SEQ ID NO: 288 (pCA 9 FKBP-L27V02A 157-169)

gagtgcaggtggaaccatctccccaggagacgggcgcaccttccccaaagcgcggccagacctgc
gtggtgactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaaacaa
gccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgcccaga
tgagtgtgggtcagagagccaaactgactatactccagattatgcctatggtgccactgggcac
ccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaaggagg
agggagctccgggtggaggcagcgggtggagtgaaccggtggtggcgtgtgccaacgcattctggcg

10

SEQ ID NO: 289 (pCA 9 FKBP-L27V02A 157-169)

GVQVETIISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQ
MSVGQRAKLTISPDIYATGHPGIIIPPHATLVFDVELLKLLEGGGSSGGGSSGGVTGWRLCERILA

15

SEQ ID NO: 290 (pCA 10 L27V02A 1-156-FRB)

atggtcttcacactcgaagatttctggtggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtcttgaacaggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtcggtaactccgatcc
aaaggattgtctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaatTTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTCCGACGGCCGATGAAGGCATCGCCGTGTTGACGGCAAAAAGATCACTGTAACA
GGGACCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCT
GTTCCGAGTAACCATCAACGGAGTGACCGGAGGAGGTGGCTCAGGTGGAGGGAGCTCCGTGGCCA
TCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGG
AACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCCTGCGATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGAC
TCTGAAGGAAACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCAAGAGTGGTGCA
GGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCAAGGACCTCACCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTG
TCCGACGAATCTCA

20

SEQ ID NO: 291 (pCA 10 L27V02A 1-156-FRB)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKV VYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGGGSSGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGER
NVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHV
FRRIS

SEQ ID NO: 292 (pCA 26 FKBP-L27V02A 1-156)

ggagtgcaggtggaaccatctccccaggagacggggcgaccttccccaaagcgcggccagacctg
cgtgggtgcactaacccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaaaca
agccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggtgggaagaaggggtgcccag
atgagtgtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgggca
cccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtctctcgatgtggagcttctaaaactggaaggag
gagggagctccgggtggaggcagcgggtatggtcttccacactcgaagatttctggtggggactggcga
cagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttggttcagaa
tctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaaatgggctgaagatcg
acatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatt
ttaaagtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggt
aatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgt
tcgacggcaaaaagatcactgtaacagggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgc
ctgatcaaccccagcggctccctgctgttccgagtaaccatcaac

5

SEQ ID NO: 293 (pCA 26 FKBP-L27V02A 1-156)

GVQVETISPGDGRTEPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQ
MSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDV ELLKLEGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDWR
QTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEKI
FKV VYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDER
LINPDGSLLFRVTIN

10

SEQ ID NO: 294 (pCA 25 L27V02A 157-169-FRB)

atgggagtgaccggctggcggctgtgccaacgcattctggcgggaggaggtggctcaggtggagg
gagctccgtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgt
actttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgcatgctatgatggaa
cggggccccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggtcgagatttaatggagge
ccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaatcagggaatgtcaaggacctcaccgaagcctgggacc
tctattatcatgtgttccgacgaatctca

15

SEQ ID NO: 295 (pCA 25 L27V02A 157-169-FRB)

MGVTGWRLCERILAGGGSSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMME
RGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

20

SEQ ID NO: 296 (pCA 3 FKBP-L27V02A 103-169)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgacacctccccaaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcaactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctccccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgcccactgg
gcacccaggeatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggaggagctccgggtggaggcagcggtagccgaacatgatcgactatttcggacggccgat
gaaggcatcgcctgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaa
aattatcgacgagcgcctgatcaacccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggag
tgaccggctggcggctgtgcaaacgcattctggc

SEQ ID NO: 297 (pCA 3 FKBP-L27V02A 103-169)

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFK FMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLKLEGGSSGGGSGT PNMIDYFGRPY
EGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSL LFRVTINGVTGWRLCERIL

5

SEQ ID NO: 298 (pCA 4 L27V02A 1-102-FRB)

atggtcttcacactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggatgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttgaggagggtggct
caggtggaggaggctccgtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagaggca
tctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgcacgc
tatgatggaacggggccccccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggtcgagatt
taatggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaatcagggaatgtcaaggacctcacccaa
gcttgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

10

SEQ ID NO: 299 (pCA 4 L27V02A 1-102-FRB)

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFK FMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLKLEGGSSGGGSGT PNMIDYFGRPY
EGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSL LFRVTINGVTGWRLCERIL

15

SEQ ID NO: 300 (pCA 19 L27V02A 103-169-FRB)

atgacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaa
aaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaaattatcgacgagcgcctgatcaacc
ccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggetggcggctgtgcaacgc
attctggcgggaggagggtggctcaggtggaggagctccgtggccatcctctggcatgagatgtg
gcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttg
aggtgctggagcccttgcacgtatgatggaacggggccccccagactctgaaggaaacatccttt
aatcaggcctatggtcgagatttaattggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaatcagg
gaatgtcaaggacctcaccgaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

20

SEQ ID NO: 301 (pCA 19 L27V02A 103-169-FRB)

MTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSL LFRVTINGVTGWRLCER
ILAGGGSSGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSF
NQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

SEQ ID NO: 302 (pCA 20 FKBP-L27V02A 1-102)

atgggagtgacaggtgaaaccatctccccaggagacggggcgaccttccccaaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcaactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctccccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggetgggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatactccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccagggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccggtggaggcagcgggtatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccctgaacagggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgaccaaaatgggcccagatcgaaaaa
atTTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACT
GGTAATCGACGGGGT

5 **SEQ ID NO: 303 (pCA 20 FKBP-L27V02A 1-102)**

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSRDRNKPFKMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGI IPPHATLVFDVELLKLKLEGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGV

SEQ ID NO: 304 (pCA 11 FKBP-L27V02A 84-169)

10

atgggagtgacaggtgaaaccatctccccaggagacggggcgaccttccccaaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcaactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctccccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggetgggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatactccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccagggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccggtggaggcagcgggtatgatcatcactttaaggtgatcctgcaactatggc
acaactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcat
cgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcg
acgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttcgagtaacctcaacggagtgaccggc
tggcggctgtgogaacgcattctggcg

SEQ ID NO: 305 (pCA 11 FKBP-L27V02A 84-169)

15

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSRDRNKPFKMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGI IPPHATLVFDVELLKLKLEGGSSGGGSGDDHHFKVILHYG
TLVIDGVTPNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTG
WRLCERILA

SEQ ID NO: 306 (pCA 12 L27V02A 1-83-FRB)

atggtcttcacactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagcggctacaacctggacca
agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgctccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggctcagcggcgaccaaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtgggagg
aggtggctcaggtggaggagctccgtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaaggcctgg
aagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagccc
ttgcatgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatgg
tcgagatttaatggaggcccaagagtggtgcaggaagtacatgaaatcagggaatgtcaaggacc
tcaccaagcctgggacctctattatcatgtgttcogaogaatctca

20

SEQ ID NO: 307 (pCA 12 L27V02A 1-83-FRB)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVGGGGSSGSSVAI L WHEM WHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEP
LHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI S

SEQ ID NO: 308 (pCA 14 L27V02A 1-83 (no fusión))

atggtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatec
aaaggattgtcctgagcggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
ggtctgagcggcgaccaa atggggccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtg

5

SEQ ID NO: 309 (pCA 14 L27V02A 1-83 (no fusión))

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVYPV

10

SEQ ID NO: 310 (pCA 13 L27V02A 84-169 (no fusión))

atggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcc
gaacatgatcgactatttcggacggccgatatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatca
ctgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggc
tcctgtgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgaaacgcattctggc
g

15

SEQ ID NO: 311 (pCA 13 L27V02A 84-169 (no fusión))

MDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDG
SLLFRVTINGVTGWRLCERILA

20

SEQ ID NO: 312 (pCA 28 FKBP 1-83)

atgggagtgacaggtggaaccatctccccaggagacggggcgaccttccccaaagcgcggccagac
ctgctggtgactacacccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgcc
cagatgagtggtgagagagccaaactgactatatctccagattatgcttatggtgccaactgg
gcaccagggatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggaggagctccggtggaggeagcggatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgaccaa atggggccagatcgaaaa
attttaaggtggtgtaccctgtg

SEQ ID NO: 313 (pCA 28 FKBP 1-83)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDIYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKL EGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW

25

RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPV

SEQ ID NO: 314 (pCA 27 L27V02A 84-169 FRB)

ES 2 567 410 T3

atggatgatcatcactttaaggtgatcctgcaactatggcactggtaatcgacggggttacgcc
gaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatca
ctgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggc
tccttgcctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtgcgaacgcattctggc
gggaggaggtggctcaggtggagggagctccgtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaag
gcttggaaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctg
gagcccttgcctgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatcctttaatcagggc
ctatggtcgagatttaatggaggcccaagagtggtgcaggaagtacatgaaatcagggaatgtca
aggacctcacccaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

SEQ ID NO: 315 (pCA 27 L27V02A 84-169 FRB)

MDDHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDG
SLLFRVTINGVTGWRLCERILAGGGSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVL
EPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

5

SEQ ID NO: 316 (HT7-Keap1)

atggcagaaatcggtaactggctttccattcgaacccccattatgtggaagtcctgggogagcgcgat
gcaactacgtcogatggttgggtccgcgcgatggcaccocctgtgctgttccctgcacggtaacccgacct
cctcctacgtgtggcgcaacatcatcccgcgatgttgacccgacctatcgctgcattgctccagac
ctgatcgggatgggcaaatccgacaaaaccgacctgggttatttcttcgacgaccaogtccgctt
catggatgccttcategaagccctgggtctggaagaggtcgtcctgggtcattcaccgactggggct
ccgctctgggtttccactgggccaagcgcaatccagagcgcgtcaaaggtattgcatttatggag
ttcaccgcocctatcccgacctgggacgaatggccagaatttgcccgcgagacctccaggcctt
ccgaccacogacgtcggccgcaagctgatcatcgatcagaacgtttttatcgaggggtacgctgc
cgatgggtgtcgtccgcccgtgactgaagtcgagatggaccattaccgcgagccggttccctgaat
cctgttgaccgcgagccactgtggcgttcccaaacgagctgccaatcgccgggtgagccagcgaa
catcgtcgcgctgggtcgaagaatacatggactggctgcaccagtcocctgtcccgaagctgctgt
tctggggcaccocaggcgttctgatcccaccggccgaagccgctcgcctggccaaaagcctgcct
aactgcaaggtctgtggacatcggcccgggtctgaatctgctgcaagaagacaaccocggacctgat
cggcagcagatcgcgcgctgggtgtcgcgctcgagatttccggcgagccaaccactgaggatc
tgtactttcagagcgataacgcgatcgttttcgaaggagatagaaccatgcagccagatcccagg
cctagcggggctggggcctgctgcgattcctgcccctgcagtcacagtgccctgagggggcagg
ggacgcggtgatgtaocctccactgagtgcaaggcggaggtgacgcocctcccagcatggcaacc
gcacctcagctacaccctggaggatcataccaagcaggcctttggcatcatgaacgagctgctg
ctcagccagcagctgtgtgacgtcacactgcaggtcaagtaccaggatgcaccggccgcccagtt
catggcccacaaggtgggtgctggcctcatccagccctgttttcaaggccatgttcaccaacgggc
tgccgggagcagggcatggaggtgggtgtccattgaggggatccaccoccaaggtcatggagcgcctc
attgaattcgcctacacggcctccatctccatggggcgagaagtgtgtcctccacgtcatgaacgg
cgctgtcatgtaccagatcgacagcgttgtecgtgcctgcagtgacttccctgggtgcagcagctgg
acccagcaatgccatcggcatcgccaacttcgctgagcagattggctgtgtggagtgcaccag
cgtgcccgggagtacatctacatgcattttggggaggtggccaagcaagaggagtcttccaacct
gtcccactgccaactgggtgacctcatcagccgggacgacctgaacgtgcgctgcgagtcggagg
tcttccaacgcctgcatcaactgggtcaagtaacgactgcgaacagcgcaggttctacgtccaggcg
ctgctgcgggocgtgcgctgcccactcgttgacgcocgaacttccctgcagatgcagctgcagaagt
cgagatcctgcagtcogactcccgcctgcaaggactacctgggtcaagatcttcgaggagctcacc
tgcacaagcccacgcaggtgatgcccctgcggggcgcoccaaggtgggcccctgatctacaccgcg
ggcggtacttccgacagtcgctcagctacctggaggcttacaaccccagtaacggcacctggct
ccggttggcgacactgcaggtgcgcgggagcggcctggccgctgcgtggtggggcggtgtgt
acgccgtgggcggcaggaacaactcgcggcagcggcaacaccgactccagcgcctggactgttac

aaccccatgaccaatcagtggtgcocctgcgcccccatgagcgtgcccgcgtaaccgcacatcgggggt
gggggtcatcogatggccacatctatgcccgtcggcggctcccacggctgcacccaccacaacagt
tgagaggtatgagccagagcgggatgagtggaacttgggtggccccaatgctgacacgaaggatc
gggggtgggcgtggctgtcctcaatcgtctgctttatgcccgtggggggctttgacgggacaaaccg
ccttaattcagctgagtggtactaccagagaggaacgagtgggcgaatgatcacagcaatgaaca
ccatccgaagcggggcaggcgtctgcgtcctgcacaactgtatctatgctgctgggggctatgat
ggtcaggaccagctgaacagcgtggagcgtacgatgtggaacagagacgtggacttccgtagc
ccccatgaagcaccggcgaagtgcctggggatcactgtccaccaggggagaaatctacgtccttg
gaggctatgatggtcacacgttccctggacagtggtgaggtgttacgaccagatacagacacctgg
agcgaggtgacccgaatgacatcgggcggagtggggtgggcgtggctgtcaccatggagccctg
ccggaagcagattgaccagcagaactgtacctgttacgtagtt

SEQ ID NO: 317 (Nrf2)

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAAATCAATATTGGCTATTGGC
 CATTGCATACGTTGTATCTATATCATAAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCG
 CCATGTTGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAG
 CCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACG
 ACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCAT
 TGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT
 GCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACA
 TGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTG
 ATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCGAAGTCT
 CCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTC
 GTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC
 AGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATCACTAGAAGCTTTATTGCGGTAGTTTTATCACAGTTAAAT
 TGCTAACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCGTGAG
 GCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTG
 TCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGC
 CTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTATTAATACGA
 CTCACTATAGGGCTAGCGATCGCCATGATGGACTTGGAGCTGCCGCCGCCGGGACTCCCGTCCCA
 GCAGGACATGGATTTGATTGACATACTTTGGAGGCAAGATATAGATCTTGGAGTAAGTCGAGAAG
 TATTTGACTTCAGTCAGCGACGGAAAAGATATGAGCTGGAAAAACAGAAAAAACTTGAAAAGGAA
 AGACAAGAACAACCTCCAAAAGGAGCAAGAGAAAAGCCTTTTTTCGCTCAGTTACAACCTAGATGAAGA
 GACAGGTGAATTTCTCCCAATTCAGCCAGCCAGCACATCCAGTCAGAAACCAGTTCTCTCGGTG
 GTTCAGGTGGTGGCGGGAGCGGTGGAGGGAGCAGCGGTGGAGTGTTTTACACTCGAAGATTTTCGTA
 GGGGACTGGCGGCAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCAAGTCCTTGAGCAGGGCGGTGTGTCCAG
 TTTGTTTTCAGAATCTCGGGGTGTCCGTAACCTCCGATCCAAAGGATTGTCCTGAGCGGTGAAAACG
 GCCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCCTATGAAGGCTCTGAGCGGCGATCAGATGGGCCAG
 ATCGAAAAAATTTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTGATTCTGCACTA
 TGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAG
 GCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACCGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAAT
 ATCGACGAGCGCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCGCGTAACCATCAACGGAGTGAC
 CGGCTGGCGGCTGTGCGAGCGCATTTTGGCGTAAGGCCGCGACTCTAGAGTCGACCTGCAGGCAT
 GCAAGCTGATCCGGCTGCTAACAAAAGCCCCGAAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGC
 AATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCGGCCGCTTCGAGCAGACATGATAAGATAACATTGATGAGTT
 TGACAAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTG
 CTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATG
 TTTTCAGGTTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTTTAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAA
 AATCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATC
 TGTGCGGTATTTACACCCGCATACGCGGATCTGCGCAGCACCATGGCCTGAAATAACCTCTGAAA
 GAGGAACCTGGTTAGGTACCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGG
 TGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGC
 AACAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT

AGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCCAGTTCCGCC
CATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTC
TGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTAATT
AACTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACT
AAACCCAGGAGGCAGATCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGT
GGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCC
GGCTGTCAAGCGAGGGGCGCCCCGGTCTTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAA
CTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCT
CGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCC
TGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCAT
ACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAC
TCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAG
CCGAACTGTTCCGAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGC
GATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAATGGCCGCTTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCG
GCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTG
GCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATC
GCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAA
GCGACGCCCCAACCTGCCATCACGATGGCCGCAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTG
TTGGTTTTTTGTGTGAATCGATAGCGATAAGGATCCTCTTTGCGCTTGCCTTTCCCTTGTCCAG
ATAGCCCAGTAGCTGACATTCATCCGGGGTCCAGCACCGTTTCTGCGGACTGGCTTTCTACCCGGT
ATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
TGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCAT
AGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGAC
AGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCC
TGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGGCTTTCTCATAGCTCA
CGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC
CGTTCAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACG
ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCT
ACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGC
TCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCG
CTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATTTCAAGAA
GATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTT
GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTATAGTCCGGAAATACAGGAACGC
ACGCTGGATGGCCCTTCGCTGGGATGGTGAACCATGAAAAATGGCAGCTTCAGTGGATTAAGTG
GGGTAATGTGGCCTGTACCCTCTGGTTGCATAGGTATTCATACGGTTAAAAATTTATCAGGCGCG
ATTGCGGCAGTTTTTCGGGTGGTTTGTGTCATTTTTTACCTGTCTGCTGCCGTGATCGCGCTGAA
CGCGTTTTTAGCGGTGCGTACAATTAAGGGATTATGGTAAATCCACTTACTGTCTGCCCTCGTAGC
CATCGAGATAAACCGCAGTACTCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCT

SEQ ID NO: 318 (L27V02B)

ATGGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTAGGTGACTGGCGACAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCA
AGTCCTTGAACAGGGTGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAAATCTCGGGGTGTCCGTAACCTCCGATCC
AAAGGATTGTCTGAGCGGTGAAAATGGGCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA
GGTCTGAGCGGCGACCAATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTCCGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTGACGGCAAAAAGATCACTGTAACCT
GGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCT
GTTCCGAGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAACGCATTCTGGCG

5

SEQ ID NO: 319 (L27V01)

ATGGTGTTTACTCGAAGATTTTCGTAGGGGACTGGCGGCAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCA
AGTCCTTGAACAGGGCGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGGGTGTCCGTAACCTCCGATCC

AAAGGATTGTCTGAGCGGTGAAAACGGCCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCCTATGAA
GGTCTGAGCGGCATCAAATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACC
GGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCT
GTTCCGCGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAGCGCATTTTGGCG

SEQ ID NO: 320 (L27V01-PEST00)

ATGGTGTTTACTCGAAGATTTTCGTAGGGGACTGGCGGCAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCA
AGTCCTTGAACAGGGCGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGGGTGTCCGTAACCTCCGATCC
AAAGGATTGTCTGAGCGGTGAAAACGGCCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCCTATGAA
GGTCTGAGCGGCATCAAATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACC
GGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCT
GTTCCGCGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAGCGCATTTTGGCGAATTCAC
ACGGCTTTCCGCCCGAGGTTGAAGAGCAAGCCGCCGGTACATTGCCTATGTCCTGCGCACAAGAA
AGCGGTATGGACCGGCACCCAGCCGCTTGTGCTTCAGCTCGCATCAACGTC

5

SEQ ID NO: 321 (IL601-L27V01)

ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGCCTGCTCCTGGTGT
GCCTGCTGCCTTCCCTGCCCCAGTGTTCACACTCGAAGATTTTCGTAGGGGACTGGCGGCAGACAG
CCGGCTACAACCTGGACCAAGTCCTTGAACAGGGCGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGG
GTGTCCGTAACCTCCGATCCAAAGGATTGTCTGAGCGGTGAAAACGGCCTGAAGATCGACATCCA
TGTCATCATCCCCTATGAAGGTCTGAGCGGCATCAAATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGG
TGGTGTACCCTGTGGATGATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGAC
GGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGG
CAAAAAGATCACTGTAACCGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCA
ACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCCGCGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAG
CGCATTTTGGCG

10

SEQ ID NO: 322 (L27V02A)

ATGGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTGGGGACTGGCGACAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCA
AGTCCTTGAACAGGGAGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGGGTGTCCGTAACCTCCGATCC
AAAGGATTGTCTGAGCGGTGAAAATGGGCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCCTATGAA
GGTCTGAGCGGCACCAAATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACA
GGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCT
GTTCCGAGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAACGCATTCTGGCG

15

SEQ ID NO: 323 (L27V02A-PEST01)

ATGGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTTGGGGACTGGCGACAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCA
AGTCCCTTGAACAGGGGAGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAAATCTCGGGGTGTCCGTAACCTCCGATCC
AAAGGATTGTCCCTGAGCGGTGAAAATGGGCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCGTATGAA
GGTCTGAGCGGCGACCAAATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACA
GGGACCCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCT
GTTCCGAGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAACGCATTCTGGCGAATTCTC
ACGGCTTTCCGCCTGAGGTTGAAGAGCAAGCCGCGGTACATTGCCTATGTCCTGCGCACAAGAA
AGCGGTATGGACCGGCACCCAGCCGCTTGTGCTTCAGCTCGCATCAACGTC

SEQ ID NO: 324 (IL601-L27V02A)

ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGCCTGCTCCTGGTGT
GCCTGCTGCCTTCCCTGCCCCAGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTTGGGGACTGGCGACAGACAG
CCGGCTACAACCTGGACCAAGTCCCTTGAACAGGGGAGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAAATCTCGGG
GTGTCCGTAACCTCCGATCCAAAGGATTGTCCCTGAGCGGTGAAAATGGGCTGAAGATCGACATCCA
TGTCATCATCCCGTATGAAGGTCTGAGCGGCGACCAAATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGG
TGGTGTACCCCTGTGGATGATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGAC
GGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGG
CAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCA
ACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCGAGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAA
CGCATTCTGGCG

5

SEQ ID NO: 325 (L27V03)

ATGGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTAGGTGACTGGCGACAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCA
AGTTCCTTGAACAGGGTGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAAATCTCGGGGTGTCCGTAACCTCCAATCC

AGAGGATAGTCCTGAGTGGTAAAAATGGGCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCTTATGAA
GGTCTGAGCGGCGATCAGATGGGGCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGTGTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATTACTGTCACT
GGAACCCCTGTGGAATGGGAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCACTGCT
GTTCCGAGTAACCATCAATGGTGTACCGGCTGGCGGCTCTGCGAACGCATTCTAGCA

10

SEQ ID NO: 326 (L27V03-PEST02)

ATGGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTAGGTGACTGGCGACAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCA
AGTTCCTTGAACAGGGTGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAAATCTCGGGGTGTCCGTAACCTCCAATCC
AGAGGATAGTCCTGAGTGGTAAAAATGGGCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCTTATGAA
GGTCTGAGCGGCGATCAGATGGGGCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCCTGTGGATGA
TCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGTGTACGCCGAACATGA
TCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATTACTGTCACT
GGAACCCCTGTGGAATGGGAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCACTGCT
GTTCCGAGTAACCATCAATGGTGTACCGGCTGGCGGCTCTGCGAACGCATTCTAGCAAATAGTC
ACGGCTTTCCGCCTGAGGTTGAAGAGCAAGCCGCGGTACATTGCCTATGTCCTGCGCACAAGAA
AGCGGTATGGACCGGCACCCAGCCGCTTGTGCTTCAGCTCGCATCAACGTC

15

SEQ ID NO: 327 (IL602-L27V03)

ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTCGCCTTCTCCCTGGGCCTGCTCCTGGTGTT
GCCCCGCTGCCTTTCCTGCCCCAGTCTTCACACTCGAAGATTCGTAGGTGACTGGCGACAGACAG
CCGGCTACAACCTGGACCAAGTTCTTGAACAGGGTGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGG
GTGTCCGTAACCTCCAATCCAGAGGATAGTCCTGAGTGGTGAAAATGGGCTGAAGATCGACATCCA
TGTCATCATCCCTTATGAAGGTCTGAGCGGCGATCAGATGGGGCAGATCGAAAAAATTTTAAAGG
TGGTGTACCCTGTGGATGATCATTAAAGGTGATCCTGCACACTATGGCACACTGGTAATCGAC
GGTGTACGCCGAACATGATCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGG
CAAAAAGATTACTGTCACCTGGAACCCTGTGGAATGGGAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCA
ACCCCGACGGCTCACTGCTGTTCCGAGTAACCATCAATGGTGTACCCGGCTGG

5 **SEQ ID NO: 328 (Enlazador)**
 GSSGGSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGG

SEQ ID NO: 329 (Secuencia de consenso de FABP)

[GSAIVK] - {FE} - [FYW] -x- [LIVMF] -x-x- {K} -x- [NHG] - [FY] - [DE] -x-
[LIVMFY] - [LIVM] - {N} - {G} - [LIVMAKR]

10 **SEQ ID NO: 330 (Secuencia de consenso de OGLUC)**

[GSAIVK] - {FE} - [FYW] -x- [LIVMFSYQ] -x-x- {K} -x- [NHGK] -x- [DE] -x-
[LIVMFY] - [LIVMWF] -x- {G} - [LIVMAKRG]

15 **SEQ ID NO: 331 (9B8 PCA1 (pF5A/Met-[9B8 opt (51-169)]-GGGGSGGGSS-FRB)**

Atgggcctgaagatcgacatccatgcatcatcccgatgaaggtctgagcggctatcagatggg
ccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgc
actatggcacactggtaatcgacggggttacgcgaacatgatcgactatctcggaacggccgat
gaaggcacgcgctgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggacccctgtggaacggcaaaa
aattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttcgcgtaaccatcaacggag
tgaccgctggcgctgtgagcgcattttggcgaggagggtggctcaggtggaggagctcc
gtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagagcatctcgtttgtactttgg
gaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgcattgatgatggaacggggcc

cccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggctcgagatttaatggaggcccaagag
tggtgcaggaagtacatgaaatcagggaatgtcaaggacotcaccgaagcctgggacctctatta
tcatgtgttcogacgaatctca

20 **SEQ ID NO: 332 (9B8 PCA1 (pF5A/Met-[9B8 opt (51-169)]-GGGGSGGGSS-FRB)**

MGLKIDIHVIIIPYEGLSGYQMGQIEKIFKVVYPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPY
EGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTVINGVTGWRLCERILAGGGGSGGGSS
VAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQE
WCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

25 **SEQ ID NO: 333 (9B8 PCA2 (pF5A/[9B8 opt (1-50)]-GGGGSGGGSS-FRB)**

Atggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggacca
agtccttgagcagggcgggtctgtccagtttgtttcagaaaactcgggggtgccgtaaacaccgatcc
aaaagattgtcctgagcgggtgaaaacggaggagggtggctcaggtggaggagctccgtggccatc
ctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaa
cgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgcattgatgatggaacggggcccccagactc
tgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggtcgagatttaattggaggcccaagagtgggtgcagg
aagtacatgaaatcagggaatgtcaaggacctcacccaagcctgggacctctattatcatgtgtt
ccgacgaatctca

SEQ ID NO: 334 (9B8 PCA2 (pF5A/[9B8 opt (1-50)]-GGGSSGGSS-FRB)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGLSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGENGGGSSGGSSVAI
LWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCR
KYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

5

SEQ ID NO: 335 (9B8 PCA 3 (& pF5A/FKBP-GGGSSGGGSG-[9B8 opt (51-169)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgcaccttcccccaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggatccgaggctgggaagaaggggttggc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttccgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggaggagctccgggtggaggcagcgggtggcctgaagatcgacatccatgtcatcaccctgat
gaaggtctgagcggctatcagatggggccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtgga
tgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaaca
tgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgta
accgggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgateaacccccgacggctccct
gctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgacgagcgcatttttggcg

10

SEQ ID NO: 336 (9B8 PCA 3 (& pF5A/FKBP-GGGSSGGGSG-[9B8 opt (51-169)

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLDGGKFFDS SRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDIYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKL EGGSSGGGSGGLKIDIHVIIPY
EGLSGYQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTN MIDYFGRPYEGIAVFDGKKITV
TGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA

15

SEQ ID NO: 337 (9B8 PCA 4 (pF5A/FKBP-GGGSSGGGSG-[9B8 opt (1-50)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgcaccttcccccaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggatccgaggctgggaagaaggggttggc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttccgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggaggagctccgggtggaggcagcgggtatgggtgtttacactcgaagatttcgtaggggactgg
cggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcggctgtccagtttgtttca
gaaactcgggggtgtccgtaaacaccgatccaaaagattgtcctgagcgggtgaaaaac

20

SEQ ID NO: 338 (9B8 PCA 4 (pF5A/FKBP-GGGSSGGGSG-[9B8 opt (1-50)

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLDGGKFFDS SRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDIYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKL EGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGLSSLFQKLGVSVTPIQKIVLSGEN

SEQ ID NO: 339 (K33N+L27V+K43R+Y68D)

Atggtggtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggacca
agtccttgagcagggcggtgtgtccagtttggtttcagaatctcgggggtgtccgtaaacaccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
ggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaaggatgattctgcaactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacc
gggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccgccgagcgtccctgct
gttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcatttttgccg

5

SEQ ID NO: 340 (K33N+L27V+K43R+Y68D)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKV VYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSL LFRVTINGVTGWRLCERILA

10

SEQ ID NO: 341 (K33N+ L27V+T39T+K43R+S66N)

Atggtggtttacactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggacca
agtccttgagcagggcggtgtgtccagtttggtttcagaatctcgggggtgtccgtaaacaccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
ggtctgaaacggcctatcagatgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaaggatgattctgcaactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacc
gggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccgccgagcgtccctgct
gttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgagcgcatttttgccg

15

SEQ ID NO: 342 (K33N+ L27V+T39T+K43R+S66N)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYE
GLNGYQMGQIEKIFKV VYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSL LFRVTINGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 343 (pCA 31 pCA L27V02A 45-169 FRB)

atggtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctc
gagcggcgaccaaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatc
actttaaaggatgactcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgac
tatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggac
cctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccgccgagcgtccctgctgttcc
gagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgaaacgcattctggcggggaggaggtggc
tcagggtggaggagctccgtggccatccctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagaggc
atctcgtttgtaactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgagggtgctggagcccttgcatg
ctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatcctttaaataaggcctatggctgagat
ttaatggaggcccaagagtggtgcaggaagtaacatgaaatcagggaatgtcaaggacctcacc
agcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

20

SEQ ID NO: 344 (pCA 31 pCA L27V02A 45-169 FRB)

MVLSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTPNMID
YFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGGGG
SGGGSSVAI LWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRD
LMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI S

SEQ ID NO: 345 (pCA 32 FKBP L27V02A 1-44)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgacacctccccaaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggtgcc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccagggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccggtggaggcagcggatggtcttcacactogaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtcttgaacagggaggtgtgtccagtttgttca
5 gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggatt

SEQ ID NO: 346 (pCA 32 FKBP L27V02A 1-44)

MGVQVETI SPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLKLEGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
10 RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRI

SEQ ID NO: 347 (pCA 33 pCA L27V02A 46-169 FRB)

atgctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgag
cggcgacccaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcact
ttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactat
ttcggacggccgatgaaggcatcgccggtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccct
gtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccagcggctccctgctgttccgag
taaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcaacgcattctggcgggaggaggtggctca
ggtggaggagctccggtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagaggcatc
tcgtttgtactttggggaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgcattgcta
tgatggaacggggcccccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggctcgagattta
atggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaatcagggaatgtcaaggacctcacccaagc
15 ctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

SEQ ID NO: 348 (pCA 33 pCA L27V02A 46-169 FRB)

MLSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDY
FGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGGGGS
GGGSSVAI LWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL
20 MEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI S

SEQ ID NO: 349 (pCA 34 pCA FKBP 1-45 L27V02A)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgacacctccccaaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggtgcc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccagggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccggtggaggcagcggatggtcttcacactogaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtcttgaacagggaggtgtgtccagtttgttca
20 gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtc

SEQ ID NO: 350 (pCA 34 pCA FKBP 1-45 L27V02A)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLKLEGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIV

5

SEQ ID NO: 351 (pCA 35 pCA L27V02A 100-169 FRB)

atggacggggttacgocgaacatgatcgactatctcggaacggccgtatgaaggcatcgccgtgtt
cgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcc
tgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtg
tgccaacgcattctggcgaggagggtggctcaggtggaggagctccgtggccatcctctggca
tgagatgtggcatgaaggcctggaagagggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaag
gcattgttgaggtgctggagcccttgcattgatgatggaacggggccccagactctgaaggaa
acatcctttaatcaggcctatgggtcgagatttaatggaggcccaagagtggtgcaggaagtacat
gaaatcagggaatgtcaaggacctcaccgaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaa
tctca

10

SEQ ID NO: 352 (pCA 35 pCA L27V02A 100-169 FRB)

MDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRL
CERILAGGGSSGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKE
TSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

15

SEQ ID NO: 353 (pCA 36 FKBP L27V02A 1-99)

atgggagtgacaggtggaaccatctccccaggagacgggagcacttccccaaagcggcgccagac
ctgcgtggtgcaactacaccgggatgcttgaagatggaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatactccagattatgcctatggtgcccactgg
gcacccaggcatcaccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccggtggaggcagcggatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggtacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgaccaaagggccagatcgaaaaa
atctttaaggtggtgtaccctgtggatgatcactttaaggtgatcctgcactatggcacact
ggaatc

SEQ ID NO: 354 (pCA 36 FKBP L27V02A 1-99)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLKLEGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVI

20

SEQ ID NO: 355 (pCA 37 L27V02A 101-169 FRB)

atggggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcga
cggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctga
tcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgc
gaacgcattctggcgggaggaggtggctcaggtggagggagctccgtggccatcctctggcatga
gatgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggca
tgtttgaggtgctggagcccttgcacgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaaca
tcctttaatcaggcctatggtcgagatttaatggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaa
atcagggaatgtcaaggacctcacccaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatct
ca

SEQ ID NO: 356 (pCA 37 L27V02A 101-169 FRB)

MGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLC
ERILAGGGGSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKET
SFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI S

5

SEQ ID NO: 357 (pCA 38 FKBP 1-100 L27V02A)

Atgggagtgacaggtggaaccatctcccaggagacgggcgcaccttccccaaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcacccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggaggagctccggtggaggcagcggatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgaccaaagggccagatcgaaaaa
atttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacact
ggtaatcgac

10

SEQ ID NO: 358 (pCA 38 FKBP 1-100 L27V02A)

MGVQVETI SPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVQORAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDV ELLKLEGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVS VTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVID

15

SEQ ID NO: 359 (pCA 39 L27V02A 102-169 FRB)

Atggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacgg
caaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatca
accccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcgaa
cgcattctggcgggaggaggtggctcaggtggagggagctccgtggccatcctctggcatgagat
gtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgt
ttgaggtgctggagcccttgcacgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatcc
tttaatcaggcctatggtcgagatttaatggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaatc
agggaatgtcaaggacctcacccaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

20

SEQ ID NO: 360 (pCA 39 L27V02A 102-169 FRB)

MVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCE
RILAGGGGSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETS
FNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI S

SEQ ID NO: 361 (pCA 40 FKBP L27V02A 1-101)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgaccttccccaaagcgcggccagac
ctgctggtgcaactacacccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaagggttggc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggaggagctccgggtggaggcagcgggtatggtcttcacactcgaagatttcggttggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacaggagggtgtgtccagttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctcagcggcgaccaaaatgggcccagatcgaaaa
atttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcactttaaggtgatcctgcactatggcacact
ggtaatcgacggg

5

SEQ ID NO: 362 (pCA 40 FKBP L27V02A 1-101)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSSRDRNKPFKMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTPDYAYGATGHPGIIIPPHATLVFDVELLKLEGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVPFIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDG

10

SEQ ID NO: 363 (pCA 41 L27V02A 143-169 FRB)

atgatcaacccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggct
gtgcgaacgcattctggcgggaggaggtggctcaggtggaggagctccgtggccatcctctggc
atgagatgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaa
ggcatgtttgaggtgctggagcccttgcatgctatgatggaacggggccccagactctgaagga
aacatcctttaatcaggcctatggtcgagatttaatggaggcccaagagtggtgcaggaagtaca
tgaaatcagggaatgtcaaggacctcacccaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacga
atctca

15

SEQ ID NO: 364 (pCA 41 L27V02A 143-169 FRB)

MINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGGGSSGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVK
GMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRR
IS

SEQ ID NO: 365 (pCA 42 FKBP 1-142 L27V02A)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgaccttccccaaagcgcggccagac
ctgctggtgcaactacacccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaagggttggc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggaggagctccgggtggaggcagcgggtatggtcttcacactcgaagatttcggttggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacaggagggtgtgtccagttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctcagcggcgaccaaaatgggcccagatcgaaaa
atttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcactttaaggtgatcctgcactatggcacact
ggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggaacggccgatgaaggcatcgccg
tgttcgacggcaaaaagatcactgtaacaggaccctgtggaaacggcaacaaaattatcgacgag
cgccctg

20

SEQ ID NO: 366 (pCA 42 FKBP 1-142 L27V02A)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDIYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLKLEGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSENGLKDIDHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDE
RL

5

SEQ ID NO: 367 (pCA 43 L27V02A 145-169 FRB)

atgcccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaaccggctggcggtgtgcca
acgcattctggcgggaggagggtggctcaggtggaggagctccgtggccatcctctggcatgaga
tgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgcttctactttggggaaaggaacgtgaaaggcatg
ttgagggtgctggagcccttgcctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatc
ctttaatcaggcctatggctcgagatttaatggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaat
cagggaatgtcaaggacctcaccgaagcctgggaacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

10

SEQ ID NO: 368 (pCA 43 L27V02A 145-169 FRB)

MPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGGGSSGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGM
FEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

15

SEQ ID NO: 369 (pCA 44 FKBP 1-144 L27V02A)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgcaccttccccaaagcggccagac
ctgctgggtgcaactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggtgggaagaaggggttggc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccaggeatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggaggagctccggtggaggcagcggatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggtacaacctggaccaagtccttgaacaggagggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
togacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaa
atthttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagggtgatcctgcaactatggcacact
ggtaatcgacggggttaacgccgaacatgatcgactatttcggacggcggatgaaggcatcgccg
tgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggacctgtggaaacggcaacaaaattatcgacgag
cgctgatcaac

SEQ ID NO: 370 (pCA 44 FKBP 1-144 L27V02A)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDIYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLKLEGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSENGLKDIDHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDE
RLIN

20

SEQ ID NO: 371 (pCA 45 L27V02A 147-169 FRB)

atgggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgccaacgcatt
tctggcgggaggaggtggctcaggtggagggagctccgtggccatcctctggcatgagatgtggc
atgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgag
gtgctggagcccttgcattgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatccttta
tcaggcctatggtcgagatttaattggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaatcaggg
atgtcaaggacctcaccgaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

SEQ ID NO: 372 (pCA 45 L27V02A 147-169 FRB)

MGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGGGGSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFE
VLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

5

SEQ ID NO: 373 (pCA 46 FKBP- L27V02A 1-146)

atgggagtgacaggtggaaccatctccccaggagacggggcgcacctcccccaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcactacacgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctccccgggacagaa
acaagcactttaagttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttggc
cagatgagtggtgggacagagagccaaactgactatactccagattatgcctatggtgccactgg
gcacccaggcatcctccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccggtggaggcagcggatggtcttcacactcgaagatttcgcttggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacaggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcctccgtatgaaggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaa
atTTTTAAGGTGGTGTACCCGTGGATGATCATCACTTTAAGGTGATCCTGCCTATGGCACACT
GGTAATCGACGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTCCGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCG
TGTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCCTGTGGAACGGCAAAAATTATCGACGAG
CGCCTGATCAACCCCGAC

10

SEQ ID NO: 374 (pCA 46 L27V02A-FKBP 1-146)

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLDGGKFDSSRDRNKHFKFMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PHATLVDFVELLKLLEGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW

RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSENGLKIIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVT PNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDE
RLINPD

15

SEQ ID NO: 375 (pCA 47 L27V02A 148-169 FRB)

atgtccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgccaacgcattct
ggcgggaggaggtggctcaggtggagggagctccgtggccatcctctggcatgagatgtggcatg
aaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgagggtg
ctggagcccttgcattgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatcctttaatca
ggcctatggtcgagatttaattggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaatcagggaaatg
tcaaggacctcaccgaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

SEQ ID NO: 376 (pCA 47 L27V02A 148-169 FRB)

MSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGGGGSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEV
LEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

20

SEQ ID NO: 377 (pCA 48 FKBP- L27V02A 1-147)

atgggagtgacaggtggaaccatctccccaggagacggggcgacettccccaaagcgcggccagac
ctgcggtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcttatggtgccactgg
gcaccagcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcogatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccgggtggaggcagcgggtatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctgagcggcgacccaaatgggcccagatcgaaaaa
atthttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcact
ggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatthtcggacggccgtatgaaggcatcgccg
tgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgag
cgctgatcaaccccagcggc

SEQ ID NO: 378 (pCA 48 FKBP- L27V02A 1-147)

MGVQVETIISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGRAKLTIISPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLKLEGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGT LWNGNKI IDE
RLINPDG

5

SEQ ID NO: 379 (pCA 49 L27V02A 156-169 FRB)

atgaacggagtgaccggctggcggctgtgccaacgcattctggcgggaggaggtggctcaggtgg
agggagctccgtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagagggcatctcgtt
tgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgthttgaggtgctggagcccttgcattgatgatg
gaacggggccccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggtcgagatttaatgga
ggcccaagagtggtgcaggaagtacatgaaatcagggaatgtcaaggacctcacccaagcctggg
acctctattatcatgtgttccgacgaatctca

10

SEQ ID NO: 380 (pCA 49 L27V02A 156-169 FRB)

MNGVTGWRLCERILAGGGGSSGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMM
ERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRIS

15

SEQ ID NO: 381 (pCA 50 FKBP-L27V02A 1-155)

atgggagtgacaggtggaaccatctccccaggagacggggcgacettccccaaagcgcggccagac
ctgcggtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcttatggtgccactgg
gcaccagcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcogatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccgggtggaggcagcgggtatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctgagcggcgacccaaatgggcccagatcgaaaaa
atthttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcact
ggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatthtcggacggccgtatgaaggcatcgccg
tgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgag
cgctgatcaaccccagcggctccctgctgttccgagtaaccatc

20

SEQ ID NO: 382 (pCA 50 FKBP-L27V02A 1-155)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLEGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNMI DYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI IDE
RLINPDGSLLFRVTI

SEQ ID NO: 383 (pCA 51 L27V02A 158-169 FRB)

atggtgaccggctggcggctgtgogaacgcattctggcgggaggaggtggctcaggtggagggag
ctccgtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtact
ttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgcatgctatgatggaacgg
ggccccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggctcgagatttaatggaggcca
agagtgggtgcaggaagtacatgaaatcagggaatgtcaaggacctcacccaagcctgggacctct
attatcatgtgttccgacgaatctca

SEQ ID NO: 384 (pCA 51 L27V02A 158-169 FRB)

MVTGWRLCERILAGGGGSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMER
GPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI S

SEQ ID NO: 385 (pCA 52 FKBP 1-157 L27V02A)

atgggagtgacaggtggaaccatctccccaggagacggggcgcaacctcccccaagcgcggccagac
ctgctggtgactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctccccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggtgcc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgctatggtgccactgg
gcaccaggcatcatcccaccacatgccactctgctctcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggaggagctccgggtggaggcagcggatggtcttcacactcgaagatttcgttggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtcctgaacagggaggtgtgtccagtttgttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctcagcggcgaccacaaatgggcccagatcgaaaa
atttttaagggtggtgtaacctgtggatgatcatcactttaagggtgatcctgcactatggcacact
ggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccg
tggtcgacggcaaaaagatcactgtaacagggacctgtggaacggcacaacaaattatcgacgag
cgccctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacctcaacgga

SEQ ID NO: 386 (pCA 52 FKBP 1-157 L27V02A)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLEGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNMI DYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI IDE
RLINPDGSLLFRVTING

SEQ ID NO: 387 (pCA 53 L27V02A 166-169 FRB)

atgctgattctggcgggaggaggtggctcaggtggagggagctccgtggccatcctctggcatga
gatgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggca
tgtttgaggtgctggagcccttgcatgctatgatggaacggggccccccagactctgaaggaaaca
tcctttaatcaggcctatggctcgagatttaatggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaa
atcagggaatgtcaaggacctcacccaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatct
ca

SEQ ID NO: 388 (pCA 53 L27V02A 166-169 FRB)

MRI LAGGGGSGGGSSVAI LWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKET
SFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI S

5 **SEQ ID NO: 389 (pCA 54 FKBP L27V02A 1-165)**

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgacacctcccccaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcaactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcacccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccgggtggaggcagcggatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttggttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaa
atthtttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacact
ggtaatcgacggggttaacgccgaacatgatcgactatthtcggacggccgcatgaaggcatcgccg
tgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaaaaaattatcgacgag
cgctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcg
gctgtgcgaa

SEQ ID NO: 390 (pCA 54 FKBP L27V02A 1-165)

10

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKFDSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKL EGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI IDE
RLINPDGSELLFRVTINGVTGWRLCE

SEQ ID NO: 391 (pCA 55 FKBP L27V02A 1-47)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgacacctcccccaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcaactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcacccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccgggtggaggcagcggatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttggttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagc

15

SEQ ID NO: 392 (pCA 55 FKBP L27V02A 1-47)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKFDSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKL EGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLS

20

SEQ ID NO: 393 (pCA 56 L27V02A 48-169-FRB)

Atggggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgga
ccaaatggggccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagg
tgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcgga
cggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaa
cggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgaaggctccctgctgttccgagtaacca
tcaacggagtgaaccggtggcggctgtgccaacgcattctggcgggaggaggtggctcaggtgga
gggagctccgtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgttt
gtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgcattgatgatgg
aacggggcccccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggtcgagatttaatggag
gcccagagtggtgcaggaagtacatgaaatcagggaaatgtcaaggacctcaccgaagcctggga
cctctattatcatgtgttccgacgaatctca

SEQ ID NO: 394 (pCA 56 L27V02A 48-169-FRB)

MGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNMIIDYFG
RPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCERILAGGGSGG
GSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLME
AQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHFRRIS

5

SEQ ID NO: 395 (pCA 57 FKBP L27V02A 1-49)

atgggagtgacaggtggaaccatctccccaggagacggggcgcacctcccccaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcactacacogggatgcttgaagatggaagaaatattgatccctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggtgggaagaaggggtgccc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatgggtccactgg
gcaccagggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcogatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccggtggaggcagcggatgggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggtacaacctggaccaagtccttgaaacagggaggtgtgtccagtttggttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaa

10

SEQ ID NO: 396 (pCA 57 FKBP L27V02A 1-49)

MGVQVETISPGDGRTEPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIIPPHATLVFDVELLKLKLEGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGE

15

SEQ ID NO: 397 (pCA 58 pCA L27V02A 50-169 FRB)

atgaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgaccacaaat
gggccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatcc
tgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccg
tatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaaacggcaa
caaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgaaggctccctgctgttccgagtaaccatcaacg
gagtgaccggtggcggctgtgccaacgcattctggcgggaggaggtggctcaggtggagggagc
tccgtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactt
tggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgcattgatgatggaacggg
gccccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggtcgagatttaatggaggcccaa
gagtggtgcaggaagtacatgaaatcagggaaatgtcaaggacctcaccgaagcctgggacctcta
ttatcatgtgttccgacgaatctca

20

SEQ ID NO: 398 (pCA 58 pCA L27V02A 50-169 FRB)

MNGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRP
YEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVVTINGVTGWRLCERILAGGGGSGGGS
SVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQ
EWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRIS

SEQ ID NO: 399 (pCA 59 FKBP L27V02A 1-82)

atgggagtgacaggtggaaacccatctccccaggagacggggcgacacctcccccaagcgcgccagac
ctgctggtgactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgcc
cagatgagtggtggcagagagocaaactgactatatctccagattatgctatggtgccactgg
gcaccagcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccgggtggaggcagcgggtatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacaggaggtgtgtccagttgtttca
gaatctoggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctgagcggcgacccaaatgggcccagatcgaaaaa
atttttaaggtggtgtacct

5

SEQ ID NO: 400 (pCA 59 FKBP L27V02A 1-82)

MGVQVETI SPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGRAKLTISPDIYAGATGHPGII PHATLVFDVELLKLEGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYP

10

SEQ ID NO: 401 (pCA 60 L27V02A 83-169-FRB)

atgggtggatgatcactcttaaggtgatcctgcaactatggcacactggtaatcgacgggggttac
gccgaacatgatcgactatttcggacggcogtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaaga
tcaactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccggac
ggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcaacgcattct
ggcgggaggaggtggctcaggtggaggagctccgtggccatcctctggcatgagatgtggcatg
aaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtg
ctggagcccttgcatgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatcctttaatca
ggcctatggtcgagatttaatggaggccaagagtggtgcaggaagtacatgaaatcagggaatg
tcaaggacctcaaccaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

15

SEQ ID NO: 402 (pCA 60 L27V02A 83-16-FRB)

MVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPD
GSLFRVVTINGVTGWRLCERILAGGGGSGGGS SVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEV
LEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRIS

20

SEQ ID NO: 403 (pCA 61 FKBP L27V02A 1-84)

Atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgaccttccccaaagcgcggccagac
ctgCGTGGTgcactacacCGGgatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctccccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgcc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcacccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccggtggaggcagcggatgggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccctgaacagggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgaccaaagtgggcccagatcgaaaa
atttttaaggtggtgtaccctgtggat

SEQ ID NO: 404 (pCA 61 FKBP L27V02A 1-84)

MGVQVETI SPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLKLEGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVD

5

SEQ ID NO: 405 (pCA 62 L27V02A 85-169-FRB)

atggatcatcactttaaggtgatcctgcaactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaa
catgatcgactatttcggacggccgctatgaaggcatcgccggttcgacggcaaaaagatcactg
taacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgaaggctcc
ctgctgttcgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtgcaaacgcattctggcggg
aggaggtggctcaggtggaggagctccgtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaaggcc
tggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggag
cccttgcatgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggccta
tggtcgagatttaatggaggcccaagagtggtgcaggaagtacatgaaatcaggggaatgtcaagg
acctcacccaagcctgggacctctattatcatgtgttcgacgaatctca

10

SEQ ID NO: 406 (pCA 62 L27V02A 85-169-FRB)

MDHHFKVILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGS
LLFRVTINGVTGWRLCERILAGGGSSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLE
PLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

15

SEQ ID NO: 407 (pCA 63 FKBP L27V02A 1-122)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgaccttccccaaagcgcggccagac
ctgCGTGGTgcactacacCGGgatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctccccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgcc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcacccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccggtggaggcagcggatgggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccctgaacagggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgaccaaagtgggcccagatcgaaaa
atttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcactttaaggtgatcctgcaactatggcacact
ggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgctatgaaggcatcgccg
tgttcgacggc

20

SEQ ID NO: 408 (pCA 63 FKBP L27V02A 1-122)

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLEGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDDHHEFKVILHYGTLVIDGVTNMI DYFGRPYEGIAVFDG

SEQ ID NO: 409 (pCA 64 L27V02A 123-169-FRB)

atgaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgat
caaccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaaccggctggcgctgtgcg
aacgcattctggcgggaggaggtggctcaggtggaggagctccgtggccatcctctggcatgag
atgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcat
gtttgaggtgctggagcccttgcattgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacat
cctttaatcaggcctatggctcgagatttaatggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaa
tcagggaatgtcaaggacctcacccaagcctgggacctotattatcatgtgttccgacgaatctc
a

5

SEQ ID NO: 410 (pCA 64 L27V02A 123-169-FRB)

MKKITVTGTLWNGNKI I DERLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCERILAGGGGSSGGSSVAILWHE
MWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMK
SGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

10

SEQ ID NO: 411 (pCA 65 FKBP L27V02A 1-123)

atgggagtgacaggtggaaccatctccccaggagacggggcaccctcccccaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcaactacaccgggatgcttgaagatggaagaaatttgattcctccccgggacagaa

acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggtggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggaggagctccggtggaggcagcggatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggtacaacctggaccaagtccttgaacaggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgaccaaattgggccagatcgaaaa
atttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagggtgatcctgcactatggcacact
ggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccg
tgttcgacggcaaaa

15

SEQ ID NO: 412 (pCA 65 FKBP L27V02A 1-123)

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLEGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDDHHEFKVILHYGTLVIDGVTNMI DYFGRPYEGIAVFDGK

20

SEQ ID NO: 413 (pCA 66 L27V02A 124-169 FRB)

atgaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaa
ccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtgcgaa
gcattctggcgggaggagggtggctcaggtggagggagctccgtggccatcctctggcatgagatg
tggcatgaaggcctggaagaggaatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatggt
tgaggtgctggagcccttgcattgatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatcct
ttaatcaggcctatggctgagatttaatggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaatca
gggaatgtcaaggacctcaccgaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

SEQ ID NO: 414 (pCA 66 L27V02A 124-169 FRB)

MKIVTVGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCERILAGGGGSGGGSSVAILWHEM
WHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKS
GNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

5

SEQ ID NO: 415 (pCA 67 L27V02A 1-168)

atgggagtgacaggtggaaccatctcccaggagacgggacaccttccccaaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggatccgaggctgggaagaagggttgcc
cagatgagtggtggctcagagagccaaactgactatactccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccgggtggaggcagcggatgggtcttcacactcgaagatttcggttggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctcagcggcgaccacaaatgggcccagatcgaaaa
atthttaagggtggtgtaccctgtggatgatcactttaagggtgatcctgcaactatggcacact
ggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcactatthtcggacggccgtatgaaggcatcgccg
tgthtcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgag
cgctgatcaaccocgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaaccggctggcg
gctgtgogaacgcattctg

10

SEQ ID NO: 416 (pCA 67 L27V02A 1-168)

atgggagtgacaggtggaaccatctcccaggagacgggacaccttccccaaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggatccgaggctgggaagaagggttgcc
cagatgagtggtggctcagagagccaaactgactatactccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag

gaggagggagctccgggtggaggcagcggatgggtcttcacactcgaagatttcggttggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctcagcggcgaccacaaatgggcccagatcgaaaa
atthttaagggtggtgtaccctgtggatgatcactttaagggtgatcctgcaactatggcacact
ggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcactatthtcggacggccgtatgaaggcatcgccg
tgthtcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgag
cgctgatcaaccocgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaaccggctggcg
gctgtgogaacgcattctg

15

SEQ ID NO: 417 (pCA 67 L27V02A 1-168)

MGVQVETISPGDGRTEFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKL EGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTN MIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVVTGTLWNGNKI IDE
RLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERIL

SEQ ID NO: 418 (*pCA 68 L27V02A 169 FRB)

Atggcgggaggaggtggctcaggtggaggagctccgtggccatcctctggcatgagatgtggca
tgaaggcctggaagaggcatctcgtttgactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgagg
tgctggagcccttgcatgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatcctttaat
caggcctatggctcgagatttaatggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaatcaggaa
tgtcaaggacctcaccgaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

5

SEQ ID NO: 419 (*pCA 68 L27V02A 169 FRB)

MAGGGSSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN
QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRIS

10

SEQ ID NO: 420 (pCA 69 FKBP L27V02A 1-166)

atgggagtgacaggtggaaacatctcccaggagacggggcgaccttccccaaagcgcggccagac
ctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatgggtccactgg
gcaccagcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggaggagctccggtggaggcagcggatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgttca
gaatctcgggggtgtccgtaactcogacccaaaggattgtcctgagcggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcaccatcccgatgaaggctgagcggcgaccaaaatgggcccagatcgaaaaa
atthttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagggtgatcctgcactatggcacact
ggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatogactatthtcggacggccgcatgaaggcatcgccg
tgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgag
cgctgatcaaccccgaagcgtccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcg
gctgtgcgaacgc

15

SEQ ID NO: 421 (pCA 69 FKBP L27V02A 1-166)

MGVQVETISPGDGRTEFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKL EGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTN MIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVVTGTLWNGNKI IDE
RLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCER

20

SEQ ID NO: 422 (*pCA 70 L27V02A 167-169 FRB)

Atgattctggcgggaggaggtggctcaggtggaggagctccgtggccatcctctggcatgagat
gtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgt
ttgaggtgctggagcccttgcatgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaaacatcc
tttaatcaggcctatggctcgagatttaatggaggcccaagagtgggtgcaggaagtacatgaaatc
agggaaatgtcaaggacctcaccgaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctca

SEQ ID NO: 423 (*pCA 70 L27V02A 167-169 FRB)

MILAGGGGSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETS
FNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRIS

SEQ ID NO: 424 (pCA 71 FKBP L27V02A 1-164)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgaccttccccaaagcggccagac
ctgcggtggtgcactacacccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctccccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgcc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccgggtggaggcagcggatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacaggaggtgtgtccagtttgttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgaccaaattgggccagatcgaaaa
atttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacact
ggtaatcgacgggggttaacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccg
tgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgag
cgctgatcaaccccgaaggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcg
gctgtgc

5

SEQ ID NO: 425 (pCA 71 FKBP L27V02A 1-164)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLEGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVT PNMI DYFGRPYEGIAVFDGKKITVVTGTLWNGNKI IDE
RLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLC

10

SEQ ID NO: 426 (pCA 72 L27V02A 165-169 FRB)

atggaacgcattctggcgggaggaggtggctcaggtggaggagctccgtggccatcctctggca
tgagatgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaaacgtgaaag
gcattgttgaggtgctggagcccttgcatgctatgatggaacggggccccagactctgaaggaa
acatcctttaatcaggcctatggtcgagatttaatggaggcccaagagtggtgcaggaagtacat
gaaatcaggaatgtcaaggacctcaccacagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaa
tctca

15

SEQ ID NO: 427 (secuencia patrón)

GSAIVK

SEQ ID NO: 428 (pCA 72 L27V02A 165-169 FRB)

20

MERILAGGGGSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKE
TSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRIS

SEQ ID NO: 429 (pCA 73 FKBP L27V02A 1-162)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgaccttccccaaagcggccagac
ctgcggtggtgcactacacccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctccccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgcc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg
gcaccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag

25

gaggagggagctccgggtggaggcagcgggtatggctcttcacactcgaagatttcogttggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaa
atTTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACT
GGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTCCGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCG
TGTTCCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAG
CGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCCGAGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCG
G

SEQ ID NO: 430 (pCA 73 FKBP L27V02A 1-162)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSVGRRAKLTISPDIYAGATGHPGII PPHATLVFDVELLKL EGGSSSGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVT PNMI DYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI IDE
RLINPDGSL LFRVTINGVTGWR

5

SEQ ID NO: 431 (pCA 74 L27V02A 163-169 FRB)

atgctgtgcgaacgcattctggcgggaggaggtggctcaggtggaggagctccogtggccatcct
ctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacg
tgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgcatgctatgatggaacggggccccagactctg
aaggaaacatcctttaatcaggcctatggctcgagatttaattggaggcccaagagtgggtgcaggaa
gtacatgaaatcagggaatgtcaaggacctcacccaagcctgggacctctattatcatgtgttcc
gacgaatctca

10

SEQ ID NO: 432 (pCA 74 L27V02A 163-169 FRB)

MLCERILAGGGGSGGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTL
KETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRIS

15

SEQ ID NO: 433 (pCA 75 FKBP L27V02A 1-160)

atgggagtgacaggtgaaaccatctccccaggagacggggcgacacctcccccaagcgcggccagac
ctgcgtgggtgcactacacogggatgcttgaagatggaaagaaatttgattcctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggtgcc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactataatctccagattatgcctatgggtgccactgg
gcacccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccgggtggaggcagcgggtatggctcttcacactcgaagatttcogttggggactgg
cgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaa
atTTTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCACACT
GGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTCCGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCG
TGTTCCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAG
CGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCCGAGTAACCATCAACGGAGTGACCGGC

20

SEQ ID NO: 434 (pCA 75 FKBP L27V02A 1-160)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSV GQRAKLTISP DYAYGATGHPGII PP HATLVFDVELLKL EGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVT PN MIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI IDE
RLINPDGSLLFRVTINGVTG

SEQ ID NO: 435 (pCA 76 L27V02A 161-169 FRB)

atgtggcggtgtgcgaaacgcattctggcgaggagggtggctcaggtggagggagctccgtggc
catcctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagagcatctcgtttgactttggggaaa
ggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgc atgctatgatggaacggggccccag
actctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggctcgagattta atggaggcccaagagtggg
caggaagtacatgaaatcaggaatgtcaaggacctcaaccaagcctgggacctctattatcatg
tgttccgacgaatctca

5

SEQ ID NO: 436 (pCA 76 L27V02A 161-169 FRB)

MWRLCERILAGGGGSGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQ
TLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI S

10

SEQ ID NO: 437 (pCA 77 FKBP L27V02A 1-158)

atgggagtgacaggtggaaaccatctccccaggagacggggcgacacctccccaaagcggccagac
ctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttgatctctcccgggacagaa
acaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggtgggaagaaggggttgc
cagatgagtggtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatgggtgccactgg
gcaccagggcatcatcccaccacatgccactctcgtctctcgatgtggagcttctaaaactggaag
gaggagggagctccggtggaggcagcggatgggtcttcacactcgaagatttcggttggggactgg
cgacagacagccggtacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttca
gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgaccaa atgggcccagatcgaaaaa
atTTTTAAGGTGGTGTACCCGTGATGATCATACTTTAAGGTGATCCTGC ACTATGGCACACT
GGTAATCGACGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTCCGACGGCCGTATGAAGGCATGCCG
TGTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAG
CGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCCGAGTAACCATCAACGGAGTG

15

SEQ ID NO: 438 (pCA 77 FKBP L27V02A 1-158)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS SRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVA
QMSV GQRAKLTISP DYAYGATGHPGII PP HATLVFDVELLKL EGGGSSGGGSGMVFTLEDFVGDW
RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
IFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVT PN MIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI IDE
RLINPDGSLLFRVTINGV

20

SEQ ID NO: 439 (pCA 78 L27V02A 159-169 FRB)

Atgaccggctggcggtgtgcgaaacgcattctggcgaggagggtggctcaggtggagggagctc
cgtggccatcctctggcatgagatgtggcatgaaggcctggaagagggcatctcgtttgactttg
gggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgc atgctatgatggaacggggc
ccccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggctcgagattta atggaggcccaaga
gtgggtgcaggaagtacatgaaatcaggaatgtcaaggacctcaaccaagcctgggacctctatt
atcatgtgttccgacgaatctca

SEQ ID NO: 440 (pCA 78 L27V02A 159-169 FRB)

MTGWRLCERILAGGGSSGGSSVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERG
PQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRIS

SEQ ID NO: 441 RIIbB (Secuencia de nt)

5

ATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAA
AGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTCAGGGAGATT
CGGCTGATTCTTTTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAA
TCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGA
GCTTGCCCTGGTAACTAACAAACCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTT

TAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAAC
ATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTA

SEQ ID NO: 442 RIIbB (secuencia de aa)

MYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFFIIIESGEVKITMKRKGK
SEVEENGAVEIARCSRQYFGEALVTKPRAASAHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRN
IATYEEQLVALYGTNMDIV

10

SEQ ID NO: 443 (L27V CP 13 TEV)

atgacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaa
tctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaacggcctgaagatcg
acatccatgtcatcaccggtatgaaggctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaaatt
ttaaagggtggtgtaccctgtggatgateatcactttaagggtgattctgcactatggcacactggt
aatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatctcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgt
tcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaaaaaattatcgacgagcgc
ctgatcaaccccgaaggctccctgtgttccgcgtaaccatcaacggagtgaaccggctggcggct
gtgagcagcgcattttggcgggaagtctcgggtggaggaagtctcgggtggagagcctactactgaga
acttgtaactccagagcgataacggaagtctcgggtggaggaagtctcgggtggaatgggtgtttaca
ctcgaagatttcgtaggggactggcggcag

15

SEQ ID NO: 444 (L27V CP 13 TEV)

MTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKI
FKVVYPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDER
LINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGSSSGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSGGMVFT
LEDFVGDWRQ

20

SEQ ID NO: 445 (L27V CP 57 TEV)

Atgcatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgatcagatgggcccagatcgaaaaat
taaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgattctgcactatggcacactggtaa
tcgacggggttacgccgaacatgatcgactatctcgacggccggtatgaaggcatcgccgtgtc
gacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcct
gatcaaccccagcggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgt
gagagcgcattttggcgggaagtctggtggaggaagtctggtggagagcctactactgagaac
ttgtacttccagagcgataacgggaagtctggtggaggaagtctggtggaatggtgtttact
cgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgagcagg
gcggtgtgtccagtttgtttcagaatctcggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctg
agcggtgaaaacggcctgaagatcgacatc

SEQ ID NO: 446 (L27V CP 57 TEV)

MHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVF
DGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILAGSSGGSSSGGEPTTEN
LYFQSDNGSSGGSSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVL
SGENGLKIDI

5

SEQ ID NO: 447 (L27V CP 98 TEV)

atggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatctcgacggccggtatgaaggcatcgc
cgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaccgggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacg
agcgcctgatcaaccccagcggctccctgctgttccgcgtaaccatcaacggagtgaccggctgg
cggctgtgcgagcgcattttggcgggaagtctggtggaggaagtctggtggagagcctactac
tgagaactgtacttccagagcgataacgggaagtctggtggaggaagtctggtggaatggtgt
ttactcgaagatttcgtaggggactggcggcagacagccggctacaacctggaccaagtcctt
gagcagggcgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcggggtgtccgtaactccgatccaaaggat
tgtcctgagcggtgaaaacggcctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctga

gcggogatcagatgggcccagatcgaaaaattttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcac
tttaaggtgattctgcactatggcacactg

10

SEQ ID NO: 448 (L27V CP 98 TEV)

MVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGW
RLCERILAGSSGGSSSGGEPTTENLYFQSDNGSSGGSSSGGMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVL
EQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHH
FKVILHYGTL

15

SEQ ID NO: 449 (Proteína humana quinasa C alfa (PKCa) (Secuencia de nt)

ATGGCTGACGTTTTCCCGGGCAACGACTCCACGGCGTCTCAGGACGTGGCCAACCGCTTCGCCCG
 CAAAGGGGCGCTGAGGCAGAAGAACGTGCACGAGGTGAAGGACCACAAATTCATCGCGCGCTTCT
 TCAAGCAGCCCACCTTCTGCAGCCACTGCACCGACTTCATCTGGGGGTTTGGGAAACAAGGCTTC
 CAGTGCCAAGTTTGTGTTTTGTGGTCCACAAGAGGTGCCATGAATTTGTTACTTTTTCTTGTC
 GGGTGCGGATAAAGGACCCGACACTGATGACCCAGGAGCAAGCACAAAGTTCAAATCCACACTT
 ACGGAAGCCCCACCTTCTGCGATCACTGTGGGTCACTGCTCTATGGACTTATCCATCAAGGGATG
 AAATGTGACACCTGCGATATGAACGTTCAACAAGCAATGCGTCATCAATGTCCCCAGCCTCTGCGG
 AATGGATCACACTGAGAAGAGGGGGCGGATTTACCTAAAGGCTGAGGTTGCTGATGAAAAGCTCC
 ATGTCACAGTACGAGATGCAAAAAATCTAATCCCTATGGATCCAAACGGGCTTTCAGATCCTTAT
 GTGAAGCTGAAACTTATTCTGATCCCAAGAATGAAAGCAAGCAAAAAACCAAAACCATCCGCTC
 CACACTAAATCCGCAGTGAATGAGTCTTTACATTCAAATTGAAACCTTCAGACAAAGACCGAC
 GACTGTCTGTAGAAATCTGGGACTGGGATCGAACAACAAGGAATGACTTCATGGGATCCCTTTCC
 TTTGGAGTTTTCGGAGCTGATGAAGATGCCGGCCAGTGGATGGTACAAGTTgCTTAACCAAGAAGA
 AGGTGAGTACTACAACGTACCCATTCGGAAGGGGACGAGGAAGGAAACATGGAACCTCAGGCAGA
 AATTCGAGAAAGCCAAACTTGGCCCTGCTGGCAACAAAGTCATCAGTCCCTCTGAAGACAGGAAA
 CAACCTTCCAACAACCTTGACCGAGTGAACCTCACGGACTCAATTTCTCATGGTGTGGGAAA
 GGGGAGTTTTGGAAAGGTGATGCTTGCCGACAGGAAGGGCACAGAAGAACTGTATGCAATCAAAA
 TCCTGAAGAAGGATGTGGTGAATCAGGATGATGACGTGGAGTGCACCATGGTAGAAAAGCGAGTC
 TTGGCCCTGCTTGACAAACCCCGTTCTTGACGCAGCTGCACCTCTGCTTCCAGACAGTGGATCG
 GCTGTACTTCGTATGGAATATGTCAACGGTGGGGACCTCATGTACCACATTCAGCAAGTAGGAA
 AATTTAAGGAACCACAAGCAGTATTCTATGCGGCAGAGATTTCCATCGGATTGTTCTTTCTTCAT
 AAAAGAGGAATCATTTATAGGGATCTGAAGTTAGATAACGTCATGTTGGATTGAGAAGGACATAT
 CAAAATTGCTGACTTTGGGATGTGCAAGGAACACATGATGGATGGAGTCACGACCAGGACCTTCT
 GTGGGACTCCAGATTATATCGCCCCAGAGATAATCGCTTATCAGCCGTATGGAAAATCTGTGGAC
 TGGTGGGCCTATGGCGTCTGTTGTATGAAATGCTTGCCGGGCAGCCTCCATTTGATGGTGAAGA
 TGAAGACGAGCTATTTCACTATCATGGAGCACAAACGTTTCTATCCAAAATCCTTGTCCAAGG
 AGGCTGTTTTCTATCTGCAAAGGACTGATGACCAAACACCCAGCCAAGCGGCTGGGCTGTGGGCCT
 GAGGGGAGAGGGACGTGAGAGAGCATGCCTTCTTCCGGAGGATCGACTGGGAAAAACTGGAGAA
 CAGGGAGATCCAGCCACCATTCAAGCCCAAAGTGTGTGGCAAAGGAGCAGAGAACTTTGACAAGT
 TCTTACACGAGGACAGCCCGTCTTAACACCACCTGATCAGCTGGTTATTGCTAACATAGACCAG
 TCTGATTTTGAAGGGTTCTCGTATGTCAACCCCCAGTTTGTGCACCCATCTTACAGAGTGCAGT
 AGTT

SEQ ID NO: 450 (Proteína humana quinasa C alfa (PKCa) (secuencia de aa)

MADVFPGNDS TASQDVANRFARKGALRQKNVHEVKDHKFIARFFKQPTFC SHCTDFIWGFGKQGF
 QCQVCCFVVHRCHEFVTFSCPGADKGPDDPRSKHKFKIHTYGSPTFC DHCGSLLYGLIHQGM
 KCDTCDMNVHKQCVINVP SLCGMDHTEKRRIYLKAEVADEKLHVTVRDAKNLI PMPDNLSDPY
 VKLKLIPDPKNE SKQKTKTIRSTLNPQWNE SFTFKLKP SDKRRLSVEIWDWDRTRNDFMGSLS
 FGVSELMKMPASGWYKLLNQEEGEY YNVPIPEGDEEGNME LRQKFEKAKLGPAGNKVISP SEDRK
 QPSNNLDRVKLTD FNFLMVLGKGSFGKVMLADRKGTEELYAIKILKKDVVIQDD DVECTMVEKRV
 LALLDKPPFLTQLHSCFQTVDRLYFVMEYVNGDLMYHIQQVGKFKEPQAVFYAAEISIGLFFLH
 KRGIYRDLKLDNVMLDSEGH IKIADFGMCKEHMMDGVTRTRFCGTPDYIAPEIIAYQPYGKSVD
 WWAYGVLLYEMLAGQPPFDGEDEDEL FQSIMEHNVSYPKSLSKEAVSICKGLMTKHPAKRLGCGP

EGERDVREHAFFRRIDWEKLENREIQPPFKPKVCGKGAENFDKFFTRGQPVLT PPDQLVIANIDQ
 SDFEGFSYVNPQFVHPILQSAVV

5

SEQ ID NO: 451 (Receptor de glucocorticoides humano (GR) (secuencia de nt)

ATGGACTCCAAAGAATCATTAACCTCCTGGTAGAGAAGAAAACCCAGCAGTGTGCTTGCTCAGGA
 GAGGGGAGATGTGATGGACTTCTATAAAACCCTAAGAGGAGGAGCTACTGTGAAGGTTTCTGCGT
 CTTACCCCTCACTGGCTGTGCTTCTCAATCAGACTCCAAGCAGCGAAGACTTTTGGTTGATTTT
 CCAAAGGCTCAGTAAGCAATGCGCAGCAGCCAGATCTGTCCAAAGCAGTTTCACTCTCAATGGG
 ACTGTATATGGGAGAGACAGAAAACAAAAGTGATGGGAAATGACCTGGGATTCACACAGCAGGGCC
 AAATCAGCCTTTCTCGGGGAAACAGACTTAAAGCTTTTGGAAAGAAAGCATTGCAAACCTCAAT
 AGGTCGACCAGTGTTCAGAGAACCCCAAGAGTTCAGCATCCACTGCTGTGTCTGCTGCCCCAC
 AGAGAAGGAGTTTCCAAAACCTCACTCTGATGTATCTTCAGAACAGCAACATTTGAAGGGCCAGA
 CTGGCACCAACGGTGGCAATGTGAAATTTGTATACCACAGACCAAAGCACCTTTGACATTTTGCAG
 GATTTGGAGTTTTCTTCTGGGTCCCAGGTAAAGAGACGAATGAGAGTCCTTGGAGATCAGACCT
 GTTGATAGATGAAAACCTGTTTGCTTTCTCCTCTGGCGGGAGAAGACGATTCATTCCTTTTGGAAAG
 GAACTCGAATGAGGACTGCAAGCCTCTCATTTTACCGGACACTAAACCCAAAATTAAGGATAAT
 GGAGATCTGGTTTTGTCAAGCCCCAGTAATGTAACACTGCCCAAGTGAAAACAGAAAAAGAAGA
 TTTTCATCGAACTCTGCACCCCTGGGGTAATTAAGCAAGAGAACTGGGCACAGTTTACTGTCAGG
 CAAGCTTTCTGGAGCAAATATAATTGGTAATAAAAATGTCTGCCATTTCTGTTTCATGGTGTGAGT
 ACCTCTGGAGGACAGATGTACCCTATGACATGAATACAGCATCCCTTTCTCAACAGCAGGATCA
 GAAGCCTATTTTTAATGTCATTCCACCAATTCCTGTTGGTTCCGAAAATTGGAATAGGTGCCAAG
 GATCTGGAGATGACAACTTGACTTCTCTGGGGACTCTGAACTTCCCTGGTTCGAACAGTTTTTTCT
 AATGGCTATTCAAGCCCCAGCATGAGACCAGATGTAAGCTCTCCTCCATCCAGCTCCTCAACAGC
 AACACAGGACCACCTCCCAAACCTCTGCCTGGTGTGCTCTGATGAAGCTTCAGGATGTCATTATG
 GAGTCTTAACCTGTGGAAGCTGTAAAGTTTTCTTCAAAGAGCAGTGAAGGACAGCACAAATTAC
 CTATGTGCTGGAAGGAATGATTGCATCATCGATAAAAATTCGAAGAAAAAACTGCCCAGCATGCCG
 CTATCGAAAATGTCTTCAGGCTGGAATGAACCTGGAAGCTCGAAAAACAAAGAAAAAAAATAAAG
 GAATTCAGCAGGCCACTACAGGAGTCTCACAAGAAACCTCTGAAAATCCTGGTAACAAAACAATA
 GTTCTGCAACGTTACCACAACCTACCCCTACCCCTGGTGTCACTGTTGGAGGTTATTGAACCTGA
 AGTGTATATGCAGGATATGATAGCTCTGTTCCAGACTCAACTTGGAGGATCATGACTACGCTCA
 ACATGTTAGGAGGGCGGCAAGTGATTGCAGCAGTGAAATGGGCAAAGGCAATACCAGGTTTCAGG
 AACTTACACCTGGATGACCAAATGACCCTACTGCAGTACTCCTGGATGTTTTCTTATGGCATTTC
 TCTGGGGTGGAGATCATATAGACAATCAAGTGCAAACCTGCTGTGTTTTGCTCCTGATCTGATTA
 TTAATGAGCAGAGAATGACTCTACCCTGCATGTACGACCAATGTAAACACATGCTGTATGTTTTCC
 TCTGAGTTACACAGGCTTCAGGTATCTTATGAAGAGTATCTCTGTATGAAAACCTTACTGCTTCT
 CTCTTCAGTTCTTAAGGACGGTCTGAAGAGCCAAGAGCTATTTGATGAAATTAGAATGACCTACA
 TCAAAGAGCTAGGAAAAGCCATTGTCAAGAGGGAAGGAAACTCCAGCCAGAACTGGCAGCGGTTT
 TATCAACTGACAAAACCTCTGGATTCTATGCATGAAGTGGTTGAAAATCTCCTTAACTATTGCTT
 CCAAACATTTTTGGATAAGACCATGAGTATTGAATTCCCCAGAGATGTTAGCTGAAATCATACCA
 ATCAGATACCAAATATTCAAATGGAAATATCAAAAACCTTCTGTTTTCATCAAAGGTT

SEQ ID NO: 452 (Receptor de glucocorticoides humano (GR) (secuencia de aa)

MDSKESLTPGREENPSSVLAQERGDVMDFYKTLRGGATVKVVSASSPSLAVASQSDSKQRLLVDF
 PKGSVSNAAQPDLSKAVSLSMGLYMGETETKVMGNDLGFPPQQGQISLSSGETDLKLEESIANLN
 RSTSVPENPKSSASTAVSAAPEKEFPKTHSDVSSEQOHLKGQTGTNGGNVKLYTTDQSTFDILQ
 DLEFSSGSPGKETNESPWRSDLLIDENCLLSPLAGEDDSFLEGNSSNEDCKPLILPDTKPKIKDN
 GDLVLSSPSNVTLPOVKTEKEDFIELCTPGVIKQEKLGTVYCQASFPGANIIGNKMSAISVHGVS
 TSGGQMYHYDMNTASLSQQQDQKPIFNVIPIIPVGSENWNRCQGSQDDNLTSLGTLNFPGRTVFS
 NGYSSPSMRPDVSSPPSSSSTATTPPKLCLVCSDEASGCHYGVLTGSCVKVFFKRAVEGQHNY
 LCAGRNDICIIDKIRRNKCPACRYRKCLQAGMNLARKTKKKIKGIQQATTGVSQETS ENPKNKI
 VPATLPQLTPTLVSLLEVIEPEVLYAGYDSSVPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFR
 NLHLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTLPCMYDQCKHMLYVS

5

SELHRLQVSYEEYLCKMTLLLLSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIKREGNSSQNWQRF
 YQLTKLLDSMHEVVENLLNYCFQTFLDKTMSEFPEMLAEIITNQIPKYSNGNIKKLLFHQKV

SEQ ID NO: 453 (enlazador L27V02-GR/L27V02-PKCa (secuencia de nt)

GGTGGTTCAGGTGGTGGCGGGAGCGGTGGAGGGAGCAGCGGTGGAGCGATCGCC

SEQ ID NO: 454 (enlazador L27V02-GR/L27V02-PKCa (secuencia de aa))
GGSGGGGSGGGSSGGAIA

5

SEQ ID NO: 455 (enlazador GR-L27V02/PKCa-L27V02 (secuencia de nt))
TCTCTCGGTGGTTCAGGTGGTGGCGGGAGCGGTGGAGGGAGCAGCGGTGGA

SEQ ID NO: 456 (enlazador GR-L27V02/PKCa-L27V02 (secuencia de aa))
SLGGSGGGGSGGGSSGG

10

SEQ ID NO: 457 (enlazador GSSG (secuencia de nt))
GCTCGAGCGGA

15

SEQ ID NO: 458 (enlazador GSSG (secuencia de aa))
GSSG

SEQ ID NO: 459 (AT1R (secuencia de nt))

ATGATTCTCAACTCTTCTACTGAAGATGGTATTAAAAGAATCCAAGATGATTGTCCCAAAGCTGG
AAGGCATAATTACATATTTGTCATGATTCTACTTTTATACAGTATCATCTTTGTGGTGGGAATAT
TTGGAAACAGCTTGGTGGTGTAGTTCATTTACTTTTATATGAAGCTGAAGACTGTGGCCAGTGTT
TTTCTTTTGAATTTAGCACTGGCTGACTTATGCTTTTTACTGACTTTGCCACTATGGGCTGTCTA
CACAGCTATGGAATACCGCTGGCCCTTTGGCAATTACCTATGTAAGATTGCTTCAGCCAGCGTCA
GTTTCAACCTGTACGCTAGTGTGTTTTCTACTCACGTGTCTCAGCATTGATCGATACCTGGCTATT
GTTCAACCAATGAAGTCCCCTTCGACGCACAATGCTTGTAGCCAAAGTCACCTGCATCATCAT
TTGGCTGCTGGCAGGCTTGGCCAGTTTGGCAGCTATAATCCATCGAAATGTATTTTTTTCATTGAGA
ACACCAATATTACAGTTTGTGCTTTCCATTATGAGTCCCAAAATTCACCCCTCCGATAGGGCTG
GGCCTGACCAAAAATACTGGGTTTCCCTGTTTCCCTTTTCTGATCATTCTTACAAGTTATACTCT
TATTTGGAAGGCCCTAAAGAAGGCTTATGAAATTCAGAAGAACAACCAAGAAATGATGATATTT
TTAAGATAATTATGGCAATTGTGCTTTTTCTTTTTCTTTCCCTGGATTCCCCACCAATATTTCACT
TTTCTGGATGTATTGATTCAACTAGGCATCATACTGACTGTAGAATTGCAGATATTGTGGACAC
GGCCATGCCTATCACCATTTGTATAGCTTATTTTAAACAATTGCCTGAATCCTCTTTTTTATGGCT
TTCTGGGGAAAAAATTTAAAGATATTTTCTCCAGCTTCTAAAATATATTTCCCCAAAAGCCAAA
TCCCCTCAAACCTTTCAACAAAAATGAGCAGCTTTCCCTACCGCCCTCAGATAATGTAAGCTC
ATCCACCAAGAAGCCTGCACCATGTTTTTGAGTTGAGTGA

20

SEQ ID NO: 460 (AT1R (secuencia de aa))

MILNSSTEDGIKRIQDDCPKAGRHNHYIFVMIPTLYSIIIFVVGIFGNLSLVVIVIVYFYMKLKTVASV
FLLNLALADLCFLTLPLWAVYTAMEYRWPFGNYLCKIASASVSFNLYASVFLLTCLSIDRYLAI
VHPMKSRLRRTMLVAKVTCIIIWLLAGLASLPAAIHRNVFFIENTNITVCAFHYESQNSTLPIGL
GLTKNILGFLFPFLIILTSYTLIWKALKKAYEIQKNKPRNDDIFKIIMAIIVLFFFVSWIPHQIF
FLDVLIQLGIIRDRIADIVDTAMPITICIAFYNNCLNPLFYGFLGKKFKRYFLQLLKYIPPKAK
SHSNLSTKMSTLSYRPSDNVSSSTKKPAPCFEVE

25

SEQ ID NO: 461 (péptido señal IL6-00 (secuencia de nt))

ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGT
GCCTGCTGCCTTCCCTGCCCA

30

SEQ ID NO: 462 (péptido señal IL6-00 (secuencia de aa))

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAP

SEQ ID NO: 463 (IL6-00 L27V-00 (secuencia de nt))

ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGT
GCCTGCTGCCTTCCCTGCCCCAGTGTTTACACTCGAAGATTTTCGTAGGGGACTGGCGGCAGACAG
CCGGCTACAACCTGGACCAAGTCCTTGAGCAGGGCGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGG
GTGTCCGTAACCTCCGATCCAAAGGATTGTCTGAGCGGTGAAAACGGCCTGAAGATCGACATCCA
TGTCATCATCCCCTATGAAGGTCTGAGCGGCGATCAGATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTTAAGG
TGGTGTACCCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTGATTCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGAC
GGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTCCGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGG
CAAAAAGATCACTGTAACCGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCA
ACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCCGCGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAG
CGCATTTTGGCG

SEQ ID NO: 464 (IL6-00 L27V-00 (secuencia de aa))

5

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSSLFQNLG
VSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVID
GVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCE
RILA

SEQ ID NO: 465 (Señal de secreción natural + L27V (secuencia de nt))

atggcttaactccacactgttcatcattgctctcacagccgctcgtaacacaagcctcctccacaca
gaaaagcaacctgacaGTGTTTACACTCGAAGATTTTCGTAGGGGACTGGCGGCAGACAGCCGGCT
ACAACCTGGACCAAGTCCTTGAGCAGGGCGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGGGTGTCC
GTAACCTCCGATCCAAAGGATTGTCTGAGCGGTGAAAACGGCCTGAAGATCGACATCCATGTCAT
CATCCCGTATGAAGGTCTGAGCGGCGATCAGATGGGCCAGATCGAAAAAATTTTTAAGGTGGTGT
ACCCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTGATTCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTT
ACGCCGAACATGATCGACTATTTCCGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAA
GATCACTGTAACCGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCG
ACGGCTCCCTGCTGTTCCGCGTAACCATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAGCGCATT
TTGGCG

10

SEQ ID NO: 466 (Señal de secreción natural + L27V (secuencia de aa))

MAYSTLFIIALTAVVTQASSTQKSNLTVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSSLFQNLGVS
VTPIQRIIVLSGENGLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGV
TPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERI
LA

15

SEQ ID NO: 467 (CP 6 L27V (RIIbB) (secuencia de nt) (secuencia de nt))

Atgttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggagg
 tgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcg
 gtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgaccaa
 atgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgat
 cctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggc
 cgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggc

aacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgaaggctccctgctgttccgagtaaccatcaa
 cggagtgaaccgctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCTAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTT
 CCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCATTCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGC
 CTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATAACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTCAGGG
 AGATTCCGGCTGATTCTTTTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAAG
 GTAAATCAGAAGTGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTT
 GGAGAGCTTGCCCTGGTAACCTAACAACCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAA
 ATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAA
 GGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGG
 TCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatggtcttcacactcgaagat

SEQ ID NO: 468 (CP 6 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQ
 MGQIEKI FKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNMI DYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNG
 NKI I DERLINPDGSL LFRVTINGVTGWRLCERILASSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSAR
 LKVVDVIGTKVYNDGEQI IAQGDSADSF IIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRQYF
 GELALVTNKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVG
 SGGSGGSSSMVFTLED

5

SEQ ID NO: 469 (CP 12 L27V (R11bB) (secuencia de nt) (secuencia de nt)

ATGcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttca
 gaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaaga
 tcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgaccaaatgggcccagatcgaaaaa
 atttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacact
 ggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccg
 tgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgag
 cgctgatcaaccccgaaggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaaccgctggcg
 gctgtGCGAACGCATTCTGGCTAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCT
 TTATTGAGTCACTGCCATTCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTG
 ATAGGCACCAAAGTATAACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTTT
 TTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGAAG
 AGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTA
 ACTAACAACCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGT
 GCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATG
 AAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGT
 AGCTCTTCTatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactggcga

10

SEQ ID NO: 470 (CP 12 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYEGLSGDQMGQIEK
 I FKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNMI DYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKI IDE
 RLINPDGSL LFRVTINGVTGWRLCERILASSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVDV
 IGTKVYNDGEQI IAQGDSADSF IIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGEALALV
 TNKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGG
 SSMVFTLEDFVGDWR

SEQ ID NO: 471 (CP 48 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctctgagcggcga
 ccaaatgggcccagatcgaaaaatttttaaggtgggtaccctgtggatgatcatcactttaagg
 tgatcctgcaactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcogaacatgatcgactatttcgga
 cggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaa
 cggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgcacggctccctgctgtttccgagtaacca

tcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGC
 GGTTCCGGAAATGTATGAAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGC
 ACGCCTGAAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTC
 AGGGAGATTCCGGCTGATTCTTTTTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGA
 AAGGGTAAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTA
 CTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACAACCTCGAGCAGCTTCTGCCCACGCCATTGGGACTG
 TCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATG
 AAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGT
 AGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatggtcttcacactcgaagatttcgttggggact
 ggcgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacaggggaggtgtgtccagtttggtt
 cagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagc

5

SEQ ID NO: 472 (CP 48 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFG
 RPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILASSSGGSG
 GSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKR
 KGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRAASAHAIIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIM
 KRNIATYEEQLVALYGTNMDIVSGSGGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLF
 QNLGVSVTPIQRIVLS

10

SEQ ID NO: 473 (CP 52 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCCTATGAAGGTCTGAGCGGCGACCAAATGGGCCA
 GATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCATTCTTAAGGTGATCCTGCACT
 ATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTCCGACGGCCGTATGAA
 GGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAT
 TATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCCGAGTAACCATCAACGGAGTGA
 CCGGCTGGCGGCTGTGCGAACGCATTCTGGCTAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATG
 TATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGT
 AGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTCAGGGAGATTCGG
 CTGATTCTTTTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCA
 GAAGTGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCT
 TGCCCTGGTAACTAACAACCTCGAGCAGCTTCTGCCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAG
 CAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAACATC
 GCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGG
 ATCTGGAGGTAGCTCTTCTATGGTCTTCACTCGAAGATTTTCGTTGGGGACTGGCGACAGACAG
 CCGGCTACAACCTGGACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGG
 GTGTCCGTAACCTCCGATCCAAAGGATTGTCTGAGCGGTGAAAATGGG

15

SEQ ID NO: 474 (CP 52 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MLKIDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHEFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYE
 GIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCERILASSSGGSGGSGM
 YESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFFIIIESGEVKITMKRKGKS
 EVEENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNI
 ATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSSLFQNLG
 VSVTPIQRIVLSGENG

SEQ ID NO: 475 (CP 55 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

Atggacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgacccaaatggggccagatcgaaaa
 aatTTTTaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacac
 tggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgctatgaaggcatcgcc
 gtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacga

gcgcctgatcaacccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggc
 ggetgtGCGAACGCATTCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTcAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGC
 TTTATTGAGTCACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGT
 GATAGGCACCAAAGTATACAACGATGGAGAACAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTT
 TTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAATAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGGAA
 GAGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGT
 AACTAACAAACCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATG
 TGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTAT
 GAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGG
 TAGCTCTTCTatggtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctaca
 acctggaccaagtccctgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgta
 actccgatccaaaggattgtccctgagcgggtgaaaatgggctgaagatc

5

SEQ ID NO: 476 (CP 55 L27V (RllbB) (secuencia de aa)

MDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHEFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIA
 VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLEFRVTINGVTGWRLCERILASSSGGSGGSGMYES
 FIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFFIIIESGEVKITMKRKGKSEVE
 ENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATY
 EEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSSLFQNLGVSV
 TPIQRIVLSGENGLKI

10

SEQ ID NO: 477 (CP 83 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGgtggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttac
 gccgaacatgatcgactatttcggacggccgctatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaaga
 tcaactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaacccccgac
 ggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAACGCATTCT
 GGCTAGCTCAAGCGGAGGTTcAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCAT
 TCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATAC
 AACGATGGAGAACAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTTTTTTTCATTATTGAATCTGG
 AGAAGTGAATAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAA
 TCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACAAACCTCGAGCA
 GCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCT
 TCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCC
 TGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatggtcttc
 aactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggaccaagtcccttga
 acagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattg
 tcttgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagc
 ggcgacaaaatggggccagatcgaaaaaatTTTTaaggtggtgtaccct

SEQ ID NO: 478 (CP 83 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPD
 GSELLFRVTINGVTGWRLCERILASSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVY
 NDGEQIIAQGDSADSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRA
 ASHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVSGGSGGSSSMVF
 TLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLS
 GDQMGQIEKIFKVVP

5

SEQ ID NO: 479 (CP 84 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

atggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaategacgggggtaacgcc
 gaacatgatcgactatctcgacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatca
 ctgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaaccccgacggc

tcctgtctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGC
 tAGCTCAAGCGGAGGTTcAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCATTCC
 TTAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATACAAC
 GATGGAGAACAAATCATTGCTCAGGGAGATTCGGCTGATTCTTTTTTCATTATTGAATCTGGAGA
 AGTGAATAACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAATCG
 CTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACAAACCTCGAGCAGCT
 TCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCTTCT
 GGGACCTTGCATGGAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCCCTGT
 ATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatgggtcttcaca
 ctogaagatttccgttggggactggogacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaaca
 gggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcc
 tgagcggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggc
 gaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtg

10

SEQ ID NO: 480 (CP 84 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDG
 SLLFRVTINGVTGWRLCERILASSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYN
 DGEQIIAQGDSADSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRAA
 SAHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVSGGSGGSSSMVFT
 LEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSG
 DQMGQIEKIFKVVPV

15

SEQ ID NO: 481 (CP 103 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGacgccgaacatgatcgactatcttcggacggccgatatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaa
 aaagatcaactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaacc
 ccgacggctccctgctgttccgagtaaacatcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAACGC
 ATTCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACT
 GCCATTCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAG
 TATACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTTTTTTTCATTATTGAA
 TCTGGAGAAGTAAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCAGT
 AGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACATAACAAACCTC
 GAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAA
 AGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAATTTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGT
 TGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatgg
 tcttcacactogaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacctggaccaagtc
 cttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaag
 gattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtc
 tgagcggcgaccaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcat
 cactttaaggtgatectgcactatggcacactggtaatcgacggggtt

SEQ ID NO: 482 (CP 103 L27V (RllbB) (secuencia de aa)

MTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVVTGTLWNGNKI IDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLCER
 ILASSSGSGSGSMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFFIIIE
 SGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGEALVTKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFE
 RLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGSGSGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQV
 LEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDH
 HFKVILHYGTLVIDGV

5

SEQ ID NO: 483 (CP 120 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGttcgacggcaaaaagatcaactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacga
 gcgccctgatcaaccccgaacggctccctgctgttccgagtaaacatcaacggagtgaccggctggc
 ggctgtGCGAACGCATTCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGC

TTTATTGAGTCACTGCCATTCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGT
 GATAGGCACCAAAGTATACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTT
 TTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTAAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGGAA
 GAGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGT
 AACTAACAAACCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATG
 TGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAATTTATGAAAAGGAACATCGCTACCTAT
 GAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGG
 TAGCTCTTCTatggtcttcacactogaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctaca
 acctggaccaagtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgta
 actccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcat
 cccgatgaaggtctgagcggcgaccaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtacc
 ctgtggatgatcatcactttaaggtgatectgcactatggcacactggtaatcgacggggttacg
 ccgaacatgatcgactatcttcggacggccgatatgaaggcatcgccgtg

10

SEQ ID NO: 484 (CP 120 L27V (RllbB) (secuencia de aa)

MFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTVINGVTGWRLCERILASSSGGSGGSGMYES
FIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVE
ENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRAASAHAIQVTKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATY
EEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVS
VTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVT
PNMIDYFGRPYEGIAV

SEQ ID NO: 485 (CP 123 L27V (RilbB) (secuencia de nt)

ATGaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgat
caacccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtGCG
AACGCATTCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAG
TCACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCAC
CAAAGTATACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTCAGGGAGATTTCGGCTGATTCTTTTTTCATTA
TTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGT
GCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACAA
ACCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCAT
TTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGAAATTTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAG
TTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTC
Tatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacctggacc
aagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttggttcagaatctcggggtgtccgtaactccgatc
caaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcccgatga
aggtctgagcggcgaccaaattgggacagatcgaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatg
atcatcactttaaggatcctgcaactatggcacactggtaatcgacggggttaocgccgaacatg
atcgactatctcgacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggc

5

SEQ ID NO: 486 (CP 123 L27V (RilbB) (secuencia de aa)

MKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTVINGVTGWRLCERILASSSGGSGGSGMYESFIE
SLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVEENG
AVEIARCSRQYFGELALVTNKPRAASAHAIQVTKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQ
LVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVS
VTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVT
PNMIDYFGRPYEGIAVFDG

10

SEQ ID NO: 487 (CP 124 L27V (RilbB) (secuencia de nt)

ATGaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaa
ccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAAC

GCATTCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCA
CTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAA
AGTATACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTTTTTTTCATTATTG
AATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCA
GTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAAC TAACAAACC
TCGAGCAGCTTCTGCCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTG
AAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTA
GTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTat
ggtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggaccaag
tccctgaaacagggaggtgtgtccagtttggtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaa
aggattgtcctgagcggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaagg
tctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatc
atcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatecgacggggttacgcogaacatgatc
gactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaa

SEQ ID NO: 488 (CP 124 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MKITVTGTLWNGNKI I DERLINPDGSL LFRV TINGVTGWRLCERILASSSGSGSGSMYESFIES
LPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYNDGEQI IAQGDSADSFFI IESGEVKITMKRKGKSEVEENGA
VEIARCSRQYFGELALVTNKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQL
VALYGTNMDIVGSGSGSSSMVF TLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSS LFNQNLGVSVTPIQ
RIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMI
DYFGRPYEGIAVFDGK

5

SEQ ID NO: 489 (CP 125 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgccctgatcaacc
cgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAACGCA
TTCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTG
CCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGT
ATACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTTTTTTTCATTATTGAAT
CTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCAAGTA
GAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAAC TAACAAACCCTCG
AGCAGCTTCTGCCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAA
GGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTT
GCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatggt
cttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggaccaagtc
ttgaaacagggaggtgtgtccagtttggtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaagg
attgtcctgagcggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggct
gagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatc
actttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatecgacggggttacgcogaacatgatcgac
tatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaag

10

SEQ ID NO: 490 (CP 125 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILASSSGGSGGSGMYESFIESL
PFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAV
EIARCSRQYFGELALVTNKPRAASAHAIIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLV
ALYGTNMDIVGSGGSGGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQR
IVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTPNMID
YFGRPYEGIAVFDGKK

SEQ ID NO: 491 (CP 130 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGaccctgtggaacggcaacaaaattatogacgagcgctgatcaaccccgaoggtccctgct
gttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCtAGCTCAA
GCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCATTCTTAAATCT
TTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATAACAACGATGGAGA
ACAAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTTTTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAA
TTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGC
TCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACAAACCTCGAGCAGCTTCTGCCCA
CGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTT
GCATGGAATTTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACG
AACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatggtcttcacactcgaaga
tttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtg
tgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcggg
gaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgaccaa
gggccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatcc
tgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggcgc
tatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagg

5

SEQ ID NO: 492 (CP 130 L27V (RllbB) (secuencia de aa)

MTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILASSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKS
LEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARC
SRQYFGELALVTNKPRAASAHAIIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGT
NMDIVGSGGSGGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSG
ENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRP
YEGIAVFDGKKITVTG

10

SEQ ID NO: 493 (CP 145 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGcccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGA
ACGCATTCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGT
CACTGCCATTCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACC
AAAGTATAACAACGATGGAGAACAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTTTTTTTCATTAT
TGAAATCTGGAGAAGTGAAAATTTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTG
CAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACAAA
CCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATT
TGAAAGGCTTCTGGGACCTTGATGGAATTTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGT
TAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCT
atggtcttcacactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatga
ggctctgagcggcgaccaaattggccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggtgatccctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggcgcgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaca
gggaccctgtggaacggcaacaaaattatogacgagcgctgatcaac

SEQ ID NO: 494 (CP 145 L27V (RllbB) (secuencia de aa)

MPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILASSSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGT
 KVYNDGEQIIAQGDSADSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNK
 PRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGSSS
 MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
 GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGNKIIDERLIN

5

SEQ ID NO: 495 (CP 148 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGtccctgctgttccgagtaacctcaacggagtgaccggetggcggetgtGCGAACGCATTCT
 GGctAGCTCAAGCGGAGGTTT CAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCAT
 TCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATAC
 AACGATGGAGAACAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTTTTTTCATTATTGAATCTGG
 AGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAA
 TCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACAAACCTCGAGCA
 GCTTCTGCCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCT
 TCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCC
 TGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatggtcttc
 aactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagccggtacaacctggaccaagtccttga
 acagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcggggtgtccgtaactccgatccaaaggattg
 tctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaagggtctgagc
 ggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactt
 taaggatcctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatt
 tcggaacggcogtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctg
 tggaaacggcaaaaaattatcgacgagocctgatcaacccccgacggc

10

SEQ ID NO: 496 (CP 148 L27V (RllbB) (secuencia de aa)

MSLLFRVTINGVTGWRLCERILASSSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVY
 NDGEQIIAQGDSADSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRA
 ASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGSSSMVF
 TLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLS
 GDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTL
 WNGNKIIDERLINPDG

15

SEQ ID NO: 497 (CP 157 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

AtGGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAACGCATTCTGGCTAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGG
 TTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCAC
 GCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTCAG
 GGAGATTCGGCTGATTCTTTTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAA
 GGGTAAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACT
 TTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACAAACCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTC
 AAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAA
 AAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAG
 GGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTATGGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTTGGGGACTGG
 CGACAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCAAGTCCTTGAACAGGGAGGTGTGTCCAGTTTGTTC
 GAATCTCGGGGTGTCCGTAACCTCCGATCCAAAGGATTGTCTGAGCGGTGAAAATGGGCTGAAGA
 TCGACATCCATGTCATCATCCCGTATGAAGGTCTGAGCGGCGACCAAATGGGCCAGATCGAAAA
 ATTTTAAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCACTTTAAGGTGATCCTGCACATATGGCACACT
 GGTAATCGACGGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTCCGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCG
 GTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAG
 CGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCCGAGTAACCATCAAC

SEQ ID NO: 498 (CP 157 L27V (RilbB) (secuencia de aa)

MGVtGWRLCERILASSSGSGSGSMYEFIESLFPFLKSLEF'SARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQ
 GDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGEALVTKPRAASAHAIIGTV
 KCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGSGSSSMVFTLEDFVGDW
 RQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEK
 IFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDE
 RLINPDGSLFRVTIN

5

SEQ ID NO: 499 (SS 6 L27V (RilbB) (secuencia de nt)

ATGgttcttcacactogaagatAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctt
 tattgagtcactgcoattccttaaatctttggagttttctgcaagcctgaaagtagtagatgtga
 taggcaccaaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgctcagggagattcggctgattctttt
 ttcattattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaaagggtaaatacagaagtggaaaga
 gaatggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacagtaactttggagagcttgccctggtaa
 ctaacaaacctcgagcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaatgtttagcaatggatgtg
 caagcatttgaaaggcttctgggaccttgcatggaaattatgaaaaggaacatcgctacctatga
 agaacagttagttgacctgTATggaacgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtA
 GCTCttcTttcgttggggactggcgacagacagccggtacaacctggaccaagtccttgaacag
 ggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcct
 gagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcctccgatgaaggtctgagcggcg
 accaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtacctgtggatgatcatcactttaag
 gtgatcctgcaactatggcacactggtaatogaagggttacgccgaacatgatcgactatttcgg
 acggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggacctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAACGCATTCTGGCt

10

SEQ ID NO: 500 (SS 6 L27V (RilbB) (secuencia de aa)

MVFTLEDSASGGSGSGSMYEFIESLFPFLKSLEF'SARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSF
 FIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGEALVTKPRAASAHAIIGTVKCLAMDV
 QAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGSGSSSFVGDWRQTAGYNLDQVLEQ
 GGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFK
 VILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
 INGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 501 (SS 12 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacaactcgaagatttcggttggggactggcgaAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTC
 CGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaactcttggagttttctgcacgcc
 tgaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgctcagggg
 gattcggctgattcttttttccattattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaaagg
 taaatcagaagtggaagagaatgggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacagtactttg
 gagagcttgccctggtaactaacaacctcgagcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaa
 tgtttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggacctgcatggaaattatgaaaag
 gaacatcgctacctatgaagaacagtttagttgccctgTATggaacgaacatggatattgtaggGT
 CAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCtctcagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacag
 ggaggtgtgtccagttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcct
 gagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctcagcggcg
 accaaatgggccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaag
 gtgatcctgcactatggcacactggtaatecgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcgg
 acggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCt

5 **SEQ ID NO: 502 (SS 12 L27V (RllbB) (secuencia de aa)**

MVFTLEDFVGDWRSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQG
 DSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRAASAHAIQTVK
 CLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSQTAGYNLDQVLEQ
 GGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHEK
 VILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVT
 INGVTGWRLCERILA

10 **SEQ ID NO: 503 (SS 26 L27V (RllbB) (secuencia de nt)**

ATGgtcttcacaactcgaagatttcggttggggactggcgaacagacagcggctacaacctggacca
 agtccttgaacaggggaAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCGGAatgtatgaaagctttattg
 agtcaactgccattccttaaactcttggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggc
 accaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgctcagggagattcggctgattcttttttccat
 tattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaaagggtaaatcagaagtggaagagaatg
 gtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacagtactttggagagcttgccctggtaactaac
 aaacctcgagcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaatgttttagcaatggatgtgcaagc
 atttgaaaggcttctgggaccttgcacatggaaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaac
 agttagttgccctgTATggaacgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCt
 ctTgggtgtgtccagttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcct
 gagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctcagcggcg
 accaaatgggccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaag
 gtgatcctgcactatggcacactggtaatecgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcgg
 acggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCt

SEQ ID NO: 504 (SS 26 L27V (RllbB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIG
TKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTN
KPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSS
SGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFK
VILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVT
INGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 505 (SS 45 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactg
ccattccctaaatctttggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgatagggaccaaagt
atacaacgatggagaacaaatcattgctcagggagattcggctgattcttttttcattattgaat
ctggagaagtgaataactatgaaaagaaagggtaaatacagaagtggaagagaatggtgcagta
gaaatcgctcgatgctcgcggggacagtaactttggagagcttgccctggtaactaacaacctcg
agcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaatgtttagcaatggatgtgcaagcatttga
ggcttctgggaccttgcattggaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagttagtt
gccctgTATggaacgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTgtcct
gagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggcg
accaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaag
gtgatcctgcactatggcacactggtaatacgcgggggttacgcggaacatgatcgactatttcgg
acggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacgggcaaaaagatcactgtaacagggacctgtgga
acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCT

5

SEQ ID NO: 506 (SS 45 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRISASGGSGGSGMYESFIESL
PFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAV
E IARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLV
ALYGTNMDIVGSGGSGGSSSVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFK
VILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVT
INGVTGWRLCERILA

10

SEQ ID NO: 507 (SS 48 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

atggcttccacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttatt
gagtcactgccattccctaaatctttggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgatagg
caccaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgctcagggagattcggctgattcttttttca
ttattgaatctggagaagtgaataactatgaaaagaaagggtaaatacagaagtggaagagaat
gggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacagtaactttggagagcttgccctggtaactaa
caacctcgagcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaatgtttagcaatggatgtgcaag
catttgaaggtctctgggaccttgcattggaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaa
cagttagttgccctgTATggaacgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTC
ttcTggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggcg
accaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatgatcatcactttaag
gtgatcctgcactatggcacactggtaatacgcgggggttacgcggaacatgatcgactatttcgg
acggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacgggcaaaaagatcactgtaacagggacctgtgga
acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCT

SEQ ID NO: 508 (SS 48 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSSASGGSGGSGMYESEFI
ESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEEN
GAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRASAHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEE
QLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFK
VILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVT
INGVTGWRLCERILA

5

SEQ ID NO: 509 (SS 52 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtat
gaaagctttattgagtcactgccattccttaaattctttggagttttctgcacgcctgaaagtagt
agatgtgataggcaccaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgctcagggagattcggctg
attcttttttcattattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaaagggtaaatcagaa
gtggaagagaatggtgacagtagaaaatcgctcgatgctcgcggggacagtaactttggagagcttgc
cctggtaactaacaacactcgagcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaatgtttagcaa
tggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcattggaattatgaaaaggaacatcgct
acctatgaagaacagttagttgccctgTATggaacgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATC
TGGAGGtAGCTCttcTctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggcg
accaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaag
gtgatcctgcactatggcacactggtaategacggggttacgccgaacatgatcgactatttcgg
acggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtgga
acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGct

10

SEQ ID NO: 510 (SS 52 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGSASGGSGGSGMY
ESFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSE
VEENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRASAHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIA

TYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFK
VILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVT
INGVTGWRLCERILA

15

SEQ ID NO: 511 (SS 55 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGgtctttcaactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
 agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
 aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCC
 GGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaatctttggagttttctgcacgcct
 gaaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgatgggagaacaaatcattgctcagggag
 attcggctgattcttttttcattattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaaaggggt
 aatcagaagtggaagagaatgggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacagtactttgg
 agagcttgccttggttaactaaciaaacctcgagcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaat
 gtttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcattgaaattatgaaaagg
 aacatcgctacctatgaagaacagtttagttgcctgtTATggaacgaacatggatattgtaggGTC
 AGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTgacatccatgtcatcatcccgatgaaggctctgagcggcg
 accaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaag
 gtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcgg
 acggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggacctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccagcggctccctgctgttccgagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCt

SEQ ID NO: 512 (SS 55 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKISASGGSGGS
 GMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKG
 KSEVEENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRAASAHAIPTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKR
 NIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSDIHVIIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFK
 VILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
 INGVTGWRLCERILA

5

SEQ ID NO: 513 (SS 83 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGgtctttcaactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
 agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
 aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
 ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctAGCgctAG
 CGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaatctt
 tggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgatggagaa
 caaatcattgctcagggagattcggctgattcttttttcattattgaatctggagaagtgaaaat
 tactatgaaaagaaagggtaaatacagaagtggaagagaatgggtgcagtagaaatcgctcgatgct
 cgcggggacagtactttggagagcttgccttggttaactaaciaaacctcgagcagcttctgcccac
 gccattgggactgtcaaatgttttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttg
 catggaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagtttagttgcctgtTATggaacga
 acatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTgtggatgatcatcactttaag
 gtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcgg
 acggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggacctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccagcggctccctgctgttccgagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCt

10

SEQ ID NO: 514 (SS 83 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIIPYE
 GLSGDQMGQIEKIFKVVPVPSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGE
 QIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRAASAH
 AIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSVDDHHFK
 VILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
 INGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 515 (SS 84 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttcggttggggactgggogacagacagccggctacaacctggacca
 agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
 aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
 ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtgAGCgc
 tAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaat
 ctttggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgatgga
 gaacaaatcattgctcagggagattcggctgattcttttttcattattgaatctggagaagtgaa
 aatactatgaaaagaaaggttaaatcagaagtggaagagaatgggtgcagtagaaatcgctcgat
 gctcgcggggacagtaactttggagagccttgccctggtaactaacaacctcgagcagcttctgcc
 cacgccattgggactgtcaaatgtttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggacc
 ttgcatggaaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagttagttgccctgTATggaa
 cgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTgatgatcatcactttaag
 gtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcgg
 acggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcaactgtaacagggaccctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCt

5

SEQ ID NO: 516 (SS 84 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
 GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYNDG
 EQIIAQGDSADSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGEALALVTNKPRAASA
 HAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGSSDDHFK
 VILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
 INGVTGWRLCERILA

10

SEQ ID NO: 517 (SS 85 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttcggttggggactgggogacagacagccggctacaacctggacca
 agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
 aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
 ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatAG
 CgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattcctta
 aatctttggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgat
 ggagaacaaatcattgctcagggagattcggctgattcttttttcattattgaatctggagaagt
 gaaaatactatgaaaagaaaggttaaatcagaagtggaagagaatgggtgcagtagaaatcgctc
 gatgctcgcggggacagtaactttggagagccttgccctggtaactaacaacctcgagcagcttct
 gccacgccattgggactgtcaaatgtttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctggg
 accttgcattggaaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagttagttgccctgTATg
 gaacgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTgatcatcactttaag
 gtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgactatttcgg
 acggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcaactgtaacagggaccctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCt

15

SEQ ID NO: 518 (SS 85 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYND

GEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAAS
AHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSDHHFK
VILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVT
INGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 519 (SS 100 L27V (RIIbB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactogaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
ggctctgagcggcgaccacaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaateAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCG
GTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaatctttggagttttctgca
cgccctgaaagtagtagatgtgataggcaccacaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgtc
gggagattcggctgattcttttttcattattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaa
agggtaaatcagaagtggaagagaatgggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacagtac
tttggagagcttgccctggtaactaacaacctcgagcagcttctgcccacgccattgggactgt
caaatgttttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcatggaaattatga
aaaggaacatcgctacctatgaagaacagtttagttgcctgTATggaacgaacatggatattgta
ggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCctcTgacgggggttacgcogaacatgatcgactatttcgg
acggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcaactgtaacagggaccctgtgga
acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgtttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCt

5

SEQ ID NO: 520 (SS 100 L27V (RIIbB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVISASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSA
RLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQY
FGELALVTNKPRAASAHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIV
GSGGSGGSSSDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVT
INGVTGWRLCERILA

10

SEQ ID NO: 521 (SS 101 L27V (RIIbB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactogaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
ggctctgagcggcgaccacaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatecgacAGCgctAGCGGAGGTTTCAG
GCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaatctttggagttttct
gcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccacaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgc
tcagggagattcggctgattcttttttcattattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaa
gaaagggtaaatcagaagtggaagagaatgggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacag
tactttggagagcttgccctggtaactaacaacctcgagcagcttctgcccacgccattgggac
tgtcaaatgttttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcatggaaatta
tgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagtttagttgcctgTATggaacgaacatggatatt
gtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCctcTgggggttacgcogaacatgatcgactatttcgg
acggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcaactgtaacagggaccctgtgga
acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgtttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCt

SEQ ID NO: 522 (SS 101 L27V (RIIbB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFS
ARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGO
YFGELALVTNKPRAASAHAIIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDI
VGS GGSGGSSSGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVT
INGVTGWRLCERILA

5

SEQ ID NO: 523 (SS 102 L27V (RIIbB) (secuencia de nt)

ATGgtottcacactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggctctgagcggcgaccaaataaggccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaagggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggAGCgctAGCGGAGGTT
CAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaatactttggagttt
tctgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgatggagaacaaatcat
tgctcagggagattcggctgattcttttttcattattgaaatctggagaagtgaaaataactatga
aaagaaagggtaaaatcagaagtggaagagaatggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcgggga
cagtaactttggagagcttgccctggtaactaacaacctcgagcagcttctgeccacgccattgg
gactgtcaaatgttttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcatggaaa
ttatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagttagttgccctgTATggaacgaacatggat
attgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCcttctggttacgccgaacatgatcgactatttcgg
acggccgtagaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtgga
acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGct

10

SEQ ID NO: 524 (SS 102 L27V (RIIbB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEF
SARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGO
YFGELALVTNKPRAASAHAIIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDI
VGS GGSGGSSSGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVT
INGVTGWRLCERILA

15

SEQ ID NO: 525 (SS 103 L27V (RIIbB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
 agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
 aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
 ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
 tcatcactttaaggatgatcctgcactatggcacactggtaatcgacggggttAGCgctAGCGGAG
 GTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccatccttaaattctttggag
 tttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgatggagaacaaat
 cattgctcaggagattcggctgattctttttcattattgaatctggagaagtgaaaattacta
 tgaagaagaagggtaaatcagaagtggagaagaatggtgcagtagaaatcgctcgatgctcggg
 ggacagtactttggagagcttgccctggtaactaacaaccccgagcagcttctgcccacgccat
 tgggactgtcaaatgtttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcattgg
 aaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagtttagttgcccctgTATggaacgaacatg
 gatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTtagccgaacatgatcgactatctcgg
 acggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcaactgtaacagggacctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccagcggctccctgctgttccgagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCT

SEQ ID NO: 526 (SS 103 L27V (RilbB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYE
 GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVSASGGSGGSMYEFIESLPFLKSLE
 FSARLKVV DVI GTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSR
 GQYFGELALVTNK PRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNM
 DIVGSGGSGGSSSTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
 INGVTGWRLCERILA

5

SEQ ID NO: 527 (SS 120 L27V (RilbB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
 agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
 aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
 ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
 tcatcactttaaggatgatcctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatga
 tcgactatctcggacggcgcgtatgaaggcatcgccgtgAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCC
 GGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccatccttaaattctttggagttttctgcacgcct
 gaaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgctcaggag
 attcggctgattctttttcattattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaagggt
 aatcagaagtggagaagaatggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgggggacagtaactttgg
 agagcttgccctggtaactaacaaccccgagcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaat
 gtttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcattggaattatgaaaagg
 aacatcgctacctatgaagaacagtttagttgcccctgTATggaacgaacatggatattgtaggGTC
 AGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTttogacggcaaaaagatcaactgtaacagggacctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccagcggctccctgctgttccgagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCT

10

SEQ ID NO: 528 (SS 120 L27V (RilbB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYE
 GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVT PNMI D Y FGRPYEGIAVSASGGSGGS
 GMYEFIESLPFLKSLEFSARLKVV DVI GTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKG
 KSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNK PRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKR
 NIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
 INGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 529 (SS 123 L27V (RIIbB) (secuencia de nt)

ATGgtctttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
 agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
 aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
 ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
 tcatcactttaagggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
 tcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcAGCgctAGCGGAGGTTCA
 GGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaattctttggagtttct
 tgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgatggagaacaaatcattg
 ctccaggagattcggctgattcttttttctatttgaatctggagaagtgaaaattactatgaaa
 agaaagggtaaatcagaagtggaagagaatggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgccgggaca
 gtaactttggagagcttgcctggtaactaacaacctcgagcagcttctgccccagccattggga
 ctgtcaaattgttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcatggaaatt
 atgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagttagttgcctgTATggaacgaacatggatat
 tgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTaaaaagatcactgtaacagggaccctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCT

5 **SEQ ID NO: 530 (SS 123 L27V (RIIbB) (secuencia de aa)**

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
 GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHFFKVIILHYGLTVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGSASGGS
 GSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMK
 RKGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRAASAHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEI
 MKRNIAITYEEQLVALYGTNMDIVGSGSGGSSSKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
 INGVTGWRLCERILA

10 **SEQ ID NO: 531 (SS 124 L27V (RIIbB) (secuencia de nt)**

ATGgtctttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
 agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
 aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
 ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
 tcatcactttaagggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
 tcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaAGCgctAGCGGAGGT
 TCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaattctttggagtt
 tcttgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgatggagaacaaatca
 ttgctcaggagattcggctgattcttttttctatttgaatctggagaagtgaaaattactatg
 aaaagaaagggtaaatcagaagtggaagagaatggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgccggg
 acagtactttggagagcttgcctggtaactaacaacctcgagcagcttctgccccagccattg
 ggaactgtcaaattgttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcatggaa
 attatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagttagttgcctgTATggaacgaacatgga
 tattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTaagatcactgtaacagggaccctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCT

SEQ ID NO: 532 (SS 124 L27V (RIIbB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKSASGG
SGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITM
KRKKGSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRASAHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCME
IMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSKITVVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
INGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 533 (SS 125 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagcggctacaacctggacca
agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaagggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccgctatgaaggcatcgccgtgttcgacggcmetaaagAGCgctAGCGGA
GGTTCAGGCGGTTCGGAatgtatgaaagcctttattgagtcactgccattccttaaatctttgga
gttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccmetaaagatacaacgatggagaacaaa
tcattgctcagggagattcggctgattcttttttcattattgaaatctggagaagtmetaaattact
atgaaaagaaagggtaaatcagaagtggaagagaatgggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcg
gggacagtactttggagagcttgccctggtaactaacaacctcgagcagcttctgcccacgcca
ttgggactgtcaaatgtttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcag
gaaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagttagttgcccctgTATggaacgaacat
ggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTatcactgtaacagggacctgtgga

acggcaacmetaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAACGCATTCTGGCt

5

SEQ ID NO: 534 (SS 125 L27V (RllbB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKSASG
SGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKIT
MKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRASAHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCM
EIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSITVVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
INGVTGWRLCERILA

10

SEQ ID NO: 535 (SS 130 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagcggctacaacctggacca
agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaagggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccgctatgaaggcatcgccgtgttcgacggcmetaaagatcactgtaaca
gggAGCgctAGCGGAGGTTCAGGCGGTTCGGAatgtatgaaagcctttattgagtcactgccatt
ccttaaatctttggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccmetaaagataca
acgatggagaacmetaaattcattgctcagggagattcggctgattcttttttcattattgaaatctgga
gaagtmetaaattactatgaaaagaaagggtaaatcagaagtggaagagaatgggtgcagtagaaat
cgctcgatgctcgcggggacagtactttggagagcttgcccctggtaactaacaacctcgagcag
cttctgcccacgccattgggactgtcaaatgtttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggctt
ctgggaccttgcagtgaaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagttagttgcccct
gTATggaacgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTaccctgtgga
acggcaacmetaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAACGCATTCTGGCt

SEQ ID NO: 536 (SS 130 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIESG
EVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAIPTVKCLAMDVQAFERL
LGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
INGVTGWRLCERILA

5

SEQ ID NO: 537 (SS 136 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGgtcttccacactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttggttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaagggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatctcggacggccgctatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaca
gggacctgtggaacggcaacAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctt
tattgagtcactgccattccttaaatctttggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtga
taggcaccaaagtatatacaacgatggagaacaaatcattgctcagggagattcggctgattctttt
ttcattattgaaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaaagggtaaatacagaagtggaaaga
gaatgggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacagtagtctttggagagcttgccctggtaa
ctaacaaacctcgagcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaattgttttagcaatggatgtg
caagcatttgaaaggcttctgggaccttgcattggaattatgaaaaggaacatcgctacctatga

agaacagtttagttgccctgTATggaacgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtA
GCTCttcTaaaattatogacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaacc
atcaacgggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGct

10

SEQ ID NO: 538 (SS 136 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSF
FIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAIPTVKCLAMDV
QAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSKIIDERLINPDGSLFRVT
INGVTGWRLCERILA

15

SEQ ID NO: 539 (SS 143 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ES 2 567 410 T3

ATGgttcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttggttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaatTTTTAaggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatecgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatctcggacggcccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaca
gggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGG
TTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaatctttggagttttctgcac
gcctgaaagtagtagatgtgataggcaccaaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgctcag
ggagattcggctgattcttttttcattattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaaa
gggtaaatcagaagtggaagagaatggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacagtact
ttggagagcttgccctggtaactaacaacacctcgagcagcttctgcccacgccattgggactgtc
aaatgtttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcatggaaattatgaa
aaggaacatcgctacctatgaagaacagttagttgcctgTATggaacgaacatggatattgtag
gGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTatcaaccocgacggctccctgctgttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAACGCATTCTGGCt

SEQ ID NO: 540 (SS 143 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQIRIVLSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHHFKVILHYGLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLSASGGSGGSMYEFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQ
GDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGELALVTNKPRAASAHAI GTV
KCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGSSSINPDGSLFRVT
INGVTGWRLCERILA

5

SEQ ID NO: 541 (SS 145 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGgttcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttggttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaatTTTTAaggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatecgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatctcggacggcccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaca
gggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaacAGCgctAGCGGAGGTTTC
AGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaatctttggagtttt
ctgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccaaaagtatacaacgatggagaacaaatcatt
gctcagggagattcggctgattcttttttcattattgaatctggagaagtgaaaattactatgaa
aagaaagggtaaatcagaagtggaagagaatggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggac
agtactttggagagcttgccctggtaactaacaacacctcgagcagcttctgcccacgccattggg

10

actgtcaaatgtttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcatggaaat
tatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagttagttgcctgTATggaacgaacatggata
ttgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTcccgacggctccctgctgttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAACGCATTCTGGCt

SEQ ID NO: 542 (SS 145 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLVSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQII
AQQDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAI
TVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSPDGSLLFRVT
INGVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 543 (SS 147 L27V (RilbB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggtctgagcggcgaccaaatgggcccagatcgaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggatgactcactatggcactatggcaactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaca
gggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccagacAGCgctAGCGG
AGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaactctttgg
agttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgatggagaacaa
atcattgctcagggagattcggctgattcttttttcattattgaatctggagaagtgaaaattac
tatgaaaagaaagggtaaatcagaagtggaagagaatggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgc
ggggacagtactttggagagcttgccctggtaactaacaacctcgagcagcttctgcccacgcc
attgggactgtcaaatgttttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgc
ggaaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagttagttgccctgTATggaacgaaca
tggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTggctccctgctgttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAACGCATTCTGGCt

5

SEQ ID NO: 544 (SS 147 L27V (RilbB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLVSGENGLKIDIHVIIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQ
IIAQQDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAI
IGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSGSLLFRVT
INGVTGWRLCERILA

10

SEQ ID NO: 545 (SS 148 L27V (RilbB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggtctgagcggcgaccaaatgggcccagatcgaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggatgactcactatggcactatggcaactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaca
gggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccagcggcAGCgctAG
CGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccattccttaaactctt
tggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgataggcaccaaagtatacaacgatggagaa
caaatcattgctcagggagattcggctgattcttttttcattattgaatctggagaagtgaaaat
tactatgaaaagaaagggtaaatcagaagtggaagagaatggtgcagtagaaatcgctcgatgct

cgcggggacagtactttggagagcttgccctggtaactaacaacctcgagcagcttctgcccac
gccattgggactgtcaaatgttttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggacctgtg
catggaaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagttagttgccctgTATggaacga
acatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCttcTccctgctgttccgagtaacc
atcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAACGCATTCTGGCt

SEQ ID NO: 546 (SS 148 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGE
QIIAQGDSADSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAH
AIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSSLLFRVT
INGVTGWRLCERILA

5

SEQ ID NO: 547 (SS 156 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggagggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggctctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtgggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaagggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaca
gggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgcagggctccctgct
gttccgagtaaccatcAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattg
agtcactgccattccttaaatctttggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgatagc
accaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgctcagggagattcggctgattcttttttcat
tattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaaagggtaaatcagaagtgaagagaatg
gtgcagtagaaaatcgctcgatgctcgcggggacagtaactttggagagcttgcacctggtaactaac
aaacctcgagcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaatgtttagcaatggatgtgcaagc
atgtgaaaggcttctgggaccttgcattgaaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaagaac
agttagttgccctgTATggaacgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTct
tcTaaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCT

10

SEQ ID NO: 548 (SS 156 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHV IIPYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTISASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIG
TKVYNDGEQIIAQGDSADSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTN
KPRAASAHAIIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSS
SNGVTGWRLCERILA

15

SEQ ID NO: 549 (SS 157 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ES 2 567 410 T3

ATGgtcttccacactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaategacggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaca
gggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgct
gttccgagtaaccatcaacAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagcttta
ttgagtcactgccattccttaaatctttggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtgata
ggcaccaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgctcagggagattcggctgattctttttt

cattattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaaagggtaaatcagaagtggaagaga
atgggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacagtagtactttggagagcttgccctggtaact
aaciaaacctcgagcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaagtgttagcaatggatgtgca
agcatttgaaaggcttctgggaccttgcatggaaattatgaaaaggaacatcgctacctatgaaag
aacagttagttgcccctgTATggaacgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGC
TCttcTggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGct

SEQ ID NO: 550 (SS 157 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMI DYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVV DVI
GTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVT
NKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGS
SSGVTGWRLCERILA

5

SEQ ID NO: 551 (SS 158 L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGgtcttccacactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacctggacca
agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatgaa
ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtgggtgtaccctgtggatga
tcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaategacggggttacgccgaacatga
tcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaaca
gggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctccctgct
gttccgagtaaccatcaacggaAGCgctAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAatgtatgaaagct
ttattgagtcactgccattccttaaatctttggagttttctgcacgcctgaaagtagtagatgtg
ataggcaccaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgctcagggagattcggctgattcttt
tttcattattgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaagaaagggtaaatcagaagtggaag
agaatgggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacagtagtactttggagagcttgccctggta
actaaciaaacctcgagcagcttctgcccacgccattgggactgtcaaagtgttagcaatggatgt
gcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcatggaaattatgaaaaggaacatcgctacctatg
aagaacagttagttgcccctgTATggaacgaacatggatattgtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGt
AGCTCttcTgtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGct

10

SEQ ID NO: 552 (SS 158 L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYE
GLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMI DYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
GTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGSASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVV DVI
IGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALV
TNKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGG
SSSVTGWRLCERILA

SEQ ID NO: 553 (SS 166 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGgtcttcacactcgaagatttctggtggggactggcgacagacagccggtacaacctggacca
 agtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcc
 aaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaa
 ggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatga
 tcatcactttaaggatgactcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatga
 tcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgaocggcaaaaagatcactgtaaca
 gggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgaocggctccctgct
 gttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAAAGCgctAGCGGAGGTTGAG
 GCGGTTCCGGAatgtatgaaagctttattgagtcactgccatttccttaaatctttggagttttct

gcacgcctgaaagtagtagatgtgatagccaccaaagtatacaacgatggagaacaaatcattgc
 tcagggagattcggctgattcttttttctatttgaatctggagaagtgaaaattactatgaaaa
 gaaagggtaaatcagaagtggaagagaatggtgcagtagaaatcgctcgatgctcgcggggacag
 tactttggagagcttgccctggtaactaacaacctcgagcagcttctgcccacgccattgggac
 tgtcaaatgtttagcaatggatgtgcaagcatttgaaaggcttctgggaccttgcatggaaatta
 tgaaaaggaacatcgctacctatgaagaacagtttagttgcctgtTATggaacgaacatggatatt
 gtaggGTCAGGTGGATCTGGAGGtAGCTCcttTCGCATCTGGCT

5

SEQ ID NO: 554 (SS 166 L27V (RllbB) (secuencia de aa)

MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYE
 GLSGDQMGQIEKI FKVYYPVDDHFKVILHYGTLVIDGVT PNMI DYFGRPYEGIAVFDGKKITVT
 GTLWNGNKI I DERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCESASGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFS
 ARLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQ
 YFGELALVTNKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDI
 VGSGGSGGSSSRILA

10

SEQ ID NO: 555 (CP 26 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGgggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcct
 gagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggctctgagcggcg
 accaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaag
 gtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcgg
 acggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtgga
 acggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgaocggctccctgctgttcogagtaacc
 atcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCTAGCTCAAGCGGAGGTTGAGG
 CGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTG
 CACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATACAACGATGGAGAACAACAAATCATTGCT
 CAGGGAGATTCGGCTGATTCTTTTTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAG
 AAAGGGTAAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGT
 ACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACAACCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACT
 GTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTAT
 GAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTG
 TAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatggtcttcacactcgaagatttctggtggggac
 tggcgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggga

15

SEQ ID NO: 556 (CP 26 L27V (RllbB) (secuencia de aa)

MGVSSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEYGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFK
 VILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
 INGVTGWRLCERILASSSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIA
 QGDSADSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAI
 GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSMVFTLEDFVGD
 WRQTAGYNLDQVLEQG

SEQ ID NO: 557 (CP 45 L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtct
 gagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatc
 actttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgccgaacatgatcgac
 tatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggac
 cctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccagcggctccctgctgttcc
 gagtaacatcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCTAGCTCAAGCGGA
 5 GTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGA
 TCAATTGCTCAGGGAGATTCGGCTGATTCTTTTTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACT
 ATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCG
 GGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACAAACCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCA
 TTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATG
 GAAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACAT
 GGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatggtcttcacactcgaagatttcg
 ttggggactggcgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtcc
 agtttgtttcagaatctcggggtgtccgtaactccgatccaaaggatt

SEQ ID NO: 558 (CP 45 L27V (RllbB) (secuencia de aa)

MVLSGENGLKIDIHVIIPEYGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMID
 YFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILASSSG
 GSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFFIIESGEVKIT
 MKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCM
 10 EIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVS
 SLFQNLGVSVTPIQRI

SEQ ID NO: 559 (CP 100(+1) L27V (RllbB) (secuencia de nt)

ATGgaacgggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccggtatgaaggcatcgccgtgtt
 cgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgc
 tgateaaccccagcggctccctgctgttccgagtaacatcaacggagtgaacggctggcggctg
 tGCGAACGCATTCTGGCTAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTAT
 TGAGTCACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAG
 GCACCAAAGTATAACAACGATGGAGAACAATCATTGCTCAGGGAGATTCGGCTGATTCTTTTTTC
 ATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGAAGAGAA
 TGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTA
 ACAAACCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAA
 GCATTTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGA
 ACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCT
 CTTCTatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacctg
 gaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcggggtgtccgtaactcc
 gatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgt
 atgaaggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtg
 gatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatcGAC

15

SEQ ID NO: 560 (CP 100(+1) L27V (RilbB) (secuencia de aa)

MDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRL
CERILASSSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFF
IIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAIIGTVKCLAMDVQ
AFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVSGSGGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNL
DQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPV
DDHFKVILHYGTLVID

5 **SEQ ID NO: 561 (CP 101(+1) L27V (RilbB) (secuencia de nt)**

ATGgggggttacgcccgaacatgatcgactatctcggaocggccgatgaaggcatcgccgtgttcga
cggcaaaaagatcaactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctga
tcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtGC
GAACGCATTCTGGCTAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGA
GTCACTGCCATTCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCA
CCAAAGTATACAACGATGGAGAACAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTTTTTTTCATT
ATTGAATCTGGAGAAGTAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGAAGAGAATGG

TGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACA
AACCTCGAGCAGCTTCTGCCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCA
TTTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACA
GTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTT
CTatggtcttcacactcgaagatctcgttggggactggcgacagacagccggtacaacctggac
caagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttggttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgat
ccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatg
aaggtctgagcggcgaccaaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggat
gatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacGGG

10 **SEQ ID NO: 562 (CP 101(+1) L27V (RilbB) (secuencia de aa)**

MGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRLC
ERILASSSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFFI
IESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAIIGTVKCLAMDVQA
FERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVSGSGGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLD
QVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVD
DDHFKVILHYGTLVIDG

SEQ ID NO: 563 (CP 102(+1) L27V (RilbB) (secuencia de nt)

ATGgttacgcgcgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacgg
caaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatogacgagcgccctgatca
accccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtGCGAA
CGCATTCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTC
ACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCA
AAGTATACAACGATGGAGAACAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTTTTTTTCATTATT
GAATCTGGAGAAGTGAATAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGAAGAGAATGGTGC
AGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACATAACAAAC
CTCGAGCAGCTTCTGCCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATT
GAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTT
AGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTa
tggctcttcacactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacctggaccaa
gtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatcca
aaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatogacatccatgtcatcatcccgatgaag
gtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgat
catcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggGTT

SEQ ID NO: 564 (CP 102(+1) L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCE
RILASSSSGGSGGSMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFPII
ESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGEALVTKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAF
ERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQ
VLEQGGVSSLFQNLGVSVPPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDD
HHFKVILHYGTLVIDGV

5

SEQ ID NO: 565 (CP 143(+1) L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggt
gtGCGAACGCATTCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTA
TTGAGTCACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATA
GGCACCAAAGTATACAACGATGGAGAACAATCATTGCTCAGGGAGATTCCGGCTGATTCTTTTTT
CATTATTGAATCTGGAGAAGTGAATAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGAAGAGA
ATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACT

AACAAACCTCGAGCAGCTTCTGCCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCA
AGCATTTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAG
AACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGC
TCTTCTatggctcttcacactcgaagatttcggtggggactggcgacagacagccggctacaacct
ggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcgggggtgtccgtaactc
cgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatogacatccatgtcatcatcccg
tatgaaggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgt
ggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacggggttacgcoga
acatgatogactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcact
gtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgcctgATC

10

SEQ ID NO: 566 (CP 143(+1) L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILASSSSGGSGGSMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVI
GTKVYNDGEQIIAQGDSADSFPIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRQYFGEALVTK
NKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGS
SSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVPPIQRIVLSGENGLKIDIHVII P
YEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKIT
VTGTLWNGNKIIDERLI

SEQ ID NO: 567 (CP 147(+1) L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGggctccctgctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCAT
 TCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTcAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGC
 CATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTA
 TACAACGATGGAGAACAAATCATTGCTCAGGGAGATTcGGCTGATTCTTTTTTCATTATTGAATC
 TGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAAGGTAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCAGTAG
 AAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACATAACAAACCTCGA
 GCAGCTTCTGCCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAG
 GCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTG
 CCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatggtc
 ttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccggctacaacctggaccaagtcc
 tgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaatctcggggtgtccgtaactccgatccaaagga
 ttgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctg
 agcggcgaccaaatgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatca
 cttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaategacggggttacgccgaacatgatcgact
 atttcggacggccgtatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggacc
 ctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgctgatcaaccccgacGGC

5

SEQ ID NO: 568 (CP 147(+1) L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MGSLLFRVTINGVTGWRLCERILASSSGSGSGSMYIESFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKV
 YNDGEQIIAQGDSADSFIIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGEALVTKPR
 AASAHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGSGSSSMV
 FTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGL
 SGDQMGQIEKIFKVVPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTNMIIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGT
 LWNNGNKIIDERLINPDG

10

SEQ ID NO: 569 (CP 156(+1) L27V (R11bB) (secuencia de nt)

ATGaacggagtgaccggctggcggctgtGCGAACGCATTCTGGCtAGCTCAAGCGGAGGTTcAGG
 CGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGAGTCACTGCCATTCCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTG
 CACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATACAACGATGGAGAACAAATCATTGCT
 CAGGGAGATTcGGCTGATTCTTTTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAG
 AAAGGTAATCAGAAGTGGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGT

ACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACATAACAAACCTCGAGCAGCTTCTGCCCACGCCATTGGGACT
 GTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTAT
 GAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTG
 TAGGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatggcttcacactcgaagatttcggttggggac
 tggcgacagacagccggtacaacctggaccaagtccctgaaacagggaggtgtgtccagtttgtt
 tcagaatctcggggtgtccgtaactccgatccaaaggttgtcctgagcgggtgaaaatgggctga
 agatcgacatccatgtcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgaccaaatgggcccagatcgaa
 aaaatttttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaaggtgatcctgcactatggcac
 actggtaategacggggttacgccgaacatgatcgactatttcggacggccgtatgaaggcatcg
 ccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaattatcgac
 gagcgctgatcaaccccgacggctccctgctgtttccgagtaaccatcAAC

15

SEQ ID NO: 570 (CP 156(+1) L27V (R11bB) (secuencia de aa)

MNGVTGWRLCERILASSSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIA
QGDSDSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAI
GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSMVFTLEDFVGD
WRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVPPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIE
KIFKVVPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIID
ERLINPDGSLLFRVTIN

SEQ ID NO: 571 (CP 158(+1) L27V (RilbB) (secuencia de nt)

ATGgtgaccggetggcggetgtGCGAACGCATTCTGGctAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCC
CGGAATGTATGAAAGCTTTTATTGAGTCACTGCCATTTCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCC
TGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCACCAAAGTATACAACGATGGAGAACAATCATTGCTCAGGGA
GATTCGGCTGATTCTTTTTTTCATTATTGAATCTGGAGAAGTGAAAATTACTATGAAAAGAAAGGG
TAAATCAGAAGTGAAGAGAATGGTGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTG
GAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACAAACCTCGAGCAGCTTCTGCCACGCCATTGGGACTGTCAAA
TGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCATTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGAAATTATGAAAAG
GAACATCGCTACCTATGAAGAACAGTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGT
CAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCTatggtcttcacactcgaagatttcggtggggactggcga
cagacagccggctacaacctggaccaagtcctgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaa
tctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagatcg
acatccatgtcatcatecccgatgaaggtctgagcggcgaccaaaggccagatcgaaaaaatt
tttaaggtggtgtaccctgtggatgatcactttaaggtgatcctgcaactatggcacactggt
aatcgacgggggttacgcccgaacatgatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgt
tcgacggcaaaaagatcactgtaacagggacctgtggaacggcaacaaaattatcgacgagcgc
ctgatcaaccccgacggctccctgctgttccgagtaaacatcaacggaGTG

5

SEQ ID NO: 572 (CP 158(+1) L27V (RilbB) (secuencia de aa)

MVTGWRLCERILASSSSGGSGGSGMYESFIESLPFLKSLEFSARLKVVVDVIGTKVYNDGEQIIAQQ
DSADSFFIIESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAI
GTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGGSGGSSSMVFTLEDFVGDWR
QTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVPPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPEGLSGDQMGQIEKI
FKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIID
ERLINPDGSLLFRVTINGV

10

SEQ ID NO: 573 (CP 166(+1) L27V (RilbB) (secuencia de nt)

ATGCGCATTCTGGctAGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGAATGTATGAAAGCTTTATTGA
GTCCTACTGCCATTTCCTTAAATCTTTGGAGTTTTCTGCACGCCTGAAAGTAGTAGATGTGATAGGCA
CCAAAGTATACAACGATGGAGAACAATCATTGCTCAGGGAGATTTCGGCTGATTCTTTTTTTCATT
ATTGAATCTGGAGAAGTAAAATTACTATGAAAAGAAAGGGTAAATCAGAAGTGAAGAGAATGG

TGCAGTAGAAATCGCTCGATGCTCGCGGGGACAGTACTTTGGAGAGCTTGCCCTGGTAACTAACA
AACCTCGAGCAGCTTCTGCCCACGCCATTGGGACTGTCAAATGTTTAGCAATGGATGTGCAAGCA
TTTGAAAGGCTTCTGGGACCTTGCATGGAAATTATGAAAAGGAACATCGCTACCTATGAAGAACA
GTTAGTTGCCCTGTATGGAACGAACATGGATATTGTAGGGTTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTT
CTatggttcttcacactcgaagatttcggttggggactggcgacagacagccgggtacaaacctggac
caagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttggttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgat
ccaaaggattgtcctgagcggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatcccgatg
aaggtctgagcggcgaccaaattgggcccagatcgaaaaaatttttaaggtggtgtaccctgtggat
gatcatcactttaaggtgatcctgcaactatggcacactggtaatcgacgggggttacgcogaacat
gatcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaa
cagggacctgtggaacggcaaaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccagcgggtccctg
ctgttccgagtaaccatcaacggagtgaccggtggtggcgtgtGCGAACGC

SEQ ID NO: 574 (CP 166(+1) L27V (RIIbB) (secuencia de aa)

MRILASSSGSGSGSMYEFIESLPFLKSLEFSARLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFPI
IESGEVKITMKRKGKSEVEENGAVEIARCSRGQYFGELALVTNKPRAASAHAI GTVKCLAMDVQA
FERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALYGTNMDIVGSGSGSSSMVFTLEDFVGDWRQTAGYNLD
QVLEQGGVSSFLQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVII PYEGLSGDQMGQIEKIFKVVPV
DHHFKVILHYGTLVIDGVTNMDIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSL
LFRVTINGVTGWRLCER

5

SEQ ID NO: 575 (enlazador)

GGGTCAGGTGGATCTGGAGGTAGCTCTTCT

10

SEQ ID NO: 576 (enlazador)

AGCTCAAGCGGAGGTTTCAGGCGGTTCCGGA

SEQ ID NO: 577 (LC3 (secuencia de nt))

ATGCCGTCCGAGAAGACCTTCAAACAGCGCCGGAGCTTCGAACAAAGAGTGGAAGATGTCCGGCT
CATCCGGGAGCAGCACCCACCAAGATCCCAGTGATTATAGAGCGATAACAAGGGTGAGAAGCAGC
TGCCCGTCCCTGGACAAGACCAGTTCCTTGTACCTGATCACGTGAATATGAGCGAACTCATCAAGA
TAATTAGAAGGCGCCTGCAGCTCAATGCTAACCAAGCCTTCTTCCCTCCTGGTGAATGGGCACAGC
ATGGTGAGTGTGTCCACACCCATCTCTGAAGTGTACGAGAGCGAGAGAGATGAAGACGGCTTCCCT
GTACATGGTCTATGCCTCCAGGAGACGTTCCGGACAGCACTGGCTGTGTAA

15

SEQ ID NO: 578 (LC3 (secuencia de aa))

MPSEKTFKQRRSFEQRVEDVRLIREQHPTKIPVIERYKGEKQLPVLDKTKFLVPDHVNMSELIK
IIRRLQLNANQAFFLLVNGHSMVSVSTPISEVYESERDEDGFLYMYASQETFGTALAV

20

SEQ ID NO: 579 (Secuencia patrón)

GSAIVK

SEQ ID NO: 580 (secuencia patrón)

NHGK

25

SEQ ID NO: 581 (secuencia patrón)

SILM

30

SEQ ID NO: 582 (secuencia patrón)

AVTK

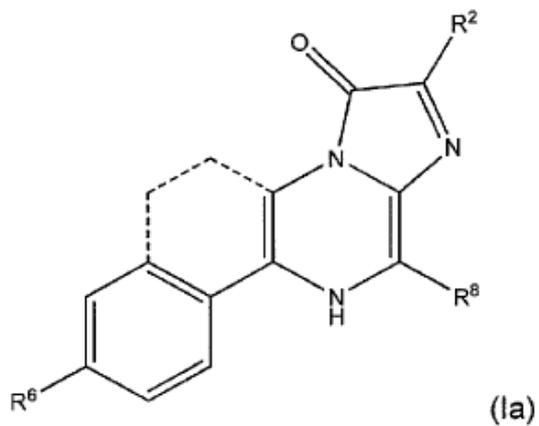
SEQ ID NO: 583 (secuencia patrón)

LIVMFY

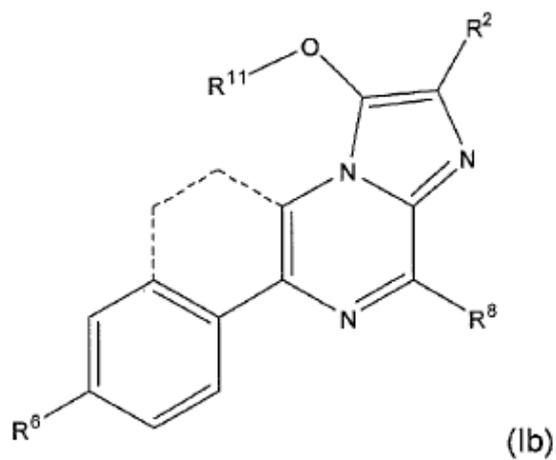
- SEQ ID NO: 584 (secuencia patrón)**
LIVMFY
- 5 **SEQ ID NO: 585 (secuencia patrón)**
LIVM
- SEQ ID NO: 586 (secuencia patrón)**
LIVMWF
- 10 **SEQ ID NO: 587 (secuencia patrón)**
EKTQ
- SEQ ID NO: 588 (secuencia patrón)**
LIVMAKR
- 15 **SEQ ID NO: 589 (secuencia patrón)**
LIVMAKRG
- SEQ ID NO: 590 (secuencia patrón)**
LIVMF
- 20 **SEQ ID NO: 591 (secuencia patrón)**
LIVMFSYQ
- 25 **SEQ ID NO: 592 (proteínas de fusión OgLuc L27V-LC3 (secuencia de nt))**
- ATGGTGTTTACTCGAAGATTTTCGTAGGGGACTGGCGGCAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCAAGTCCTTGAGCAG
GGCGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGGTGTCCGTAACCTCCGATCCAAAGGATTGTCTTGAGCGGTGAAAAC
GGCCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCGTATGAAGGTCTGAGCGGCATCAGATGGGCCAGATCGAAAAAATT
TTTAAGGTGGTGTACCCTGTGGATGATCCTTTAAGGTGATCTGCACTATGGCACACTGGTAATCGACGGGGTT
ACGCCGAACATGATCGACTATTTTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATCACTGTAACC
GGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGAGCGCCTGATCAACCCCGACGGCTCCCTGCTGTTCCGCGTAACC
ATCAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAGAGAATTTTGGCGGGCTCGAGCGGAGGTGGAGGTTTCAGGTGGTGGC
GGGAGCGGTGGAATGCCGTCCGAGAAGACCTTCAAACAGCGCCGGAGCTTCGAACAAGAGTGGAAGATGTCCGGCTC
ATCCGGGAGCAGCACCCCAAGATCCCAGTGATTATAGAGCGATACAAGGGTGAGAAGCAGCTGCCCGTCTCGGAC
AAGACCAAGTTCCTTGTACCTGATCAGTGAATATGAGCGAATCATCAAGATAATTAGAAGGCGCCTGCAGCTCAAT
GCTAACCAAGCCTTCTTCTCTGGTGAATGGGCACAGCATGGTGAGTGTGTCCACCCCATCTCTGAAGTGTACGAG
AGCGAGAGAGATGAAGACGGCTTCTGTACATGGTCTATGCCTCCCAGGAGACGTTCCGGGACAGCACTGGCTGTGTAA
- 30 **SEQ ID NO: 593 (proteínas de fusión OgLuc L27V-LC3 (secuencia de aa))**
- MVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVILPYEGLSGDQMGQIEKI
FKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTNMIYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVT
INGVTGWRLCERILAGSSGGGGSGGGSGGMPSEKTFKQRRSFEQRVEDVRLIREQHPTKIPVILERYKGEKQLPVL
KTKFLVPDHNMSSELIKII RRLQLNANQAFLLVNGHSMVSVSTPISEVYESERDEDGFLYMVYASQETFGTALAV

REIVINDICACIONES

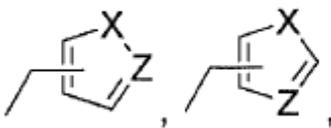
1. Un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib):



5
o



en las que R² se selecciona del grupo que consiste en:



10

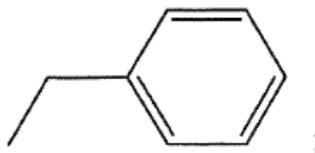
o

alquilo C₂₋₅ de cadena lineal;

R⁶ se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -NH₂, -OC(O)R o -OCH₂OC(O)R;

15

R⁸ es



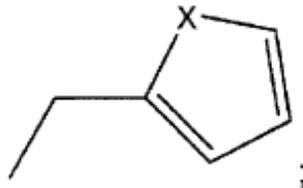
X es -S-, -O- o -NR²²-;

Z es -CH- o -N-;

cada R¹¹ es, de manera independiente, -C(O)R" o -CH₂OC(O)R";

R²² es H, CH₃ o CH₂CH₃;
 cada R es, de manera independiente, alquilo C₁₋₇ de cadena lineal o alquilo C₁₋₇ ramificado;
 R" es alquilo C₁₋₇ de cadena lineal o alquilo C₁₋₇ ramificado;
 los enlaces de trazos indican la presencia de un anillo opcional, que puede estar saturado o insaturado.

- 5
 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1,
 en el que R² es



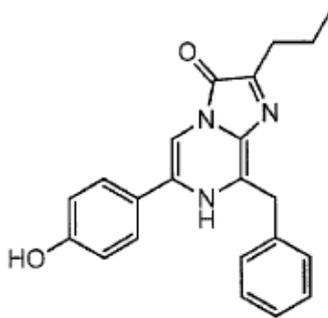
- 10
 y
 X es O o S.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R² es alquilo C₂₋₅ de cadena lineal.

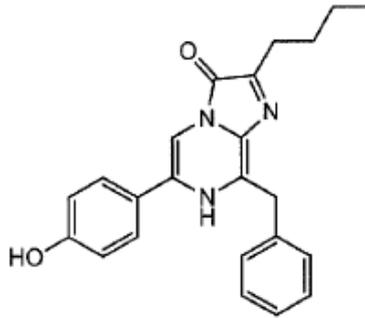
- 15
 4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R¹¹ es
 CH₂OC(O)C(CH₃)₃.

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que R" es -C(CH₃)₃, -CH(CH₃)₂,
 -CH₂C(CH₃)₃ o -CH₂CH(CH₃)₂.

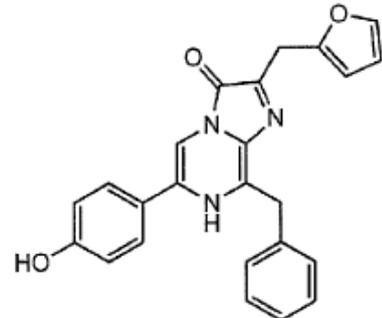
- 20
 6. Un compuesto que tiene una fórmula seleccionada entre



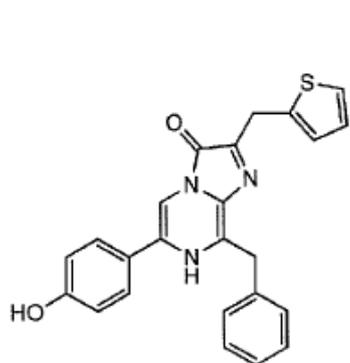
3899



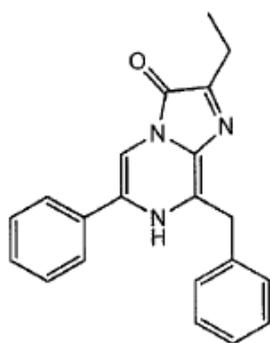
3900



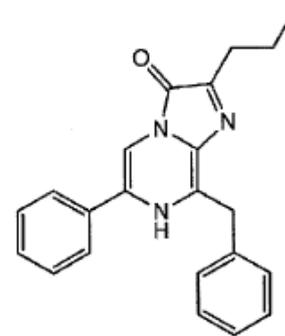
3945



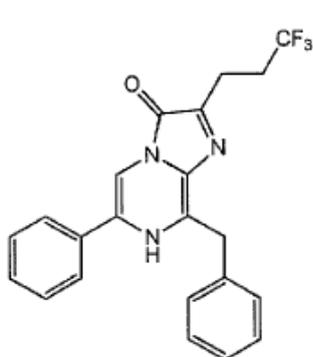
4002



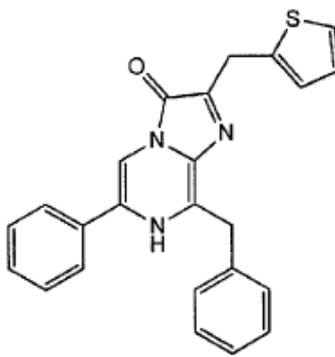
3925



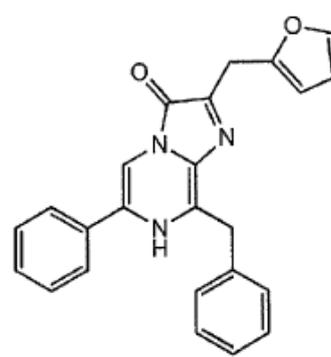
3933



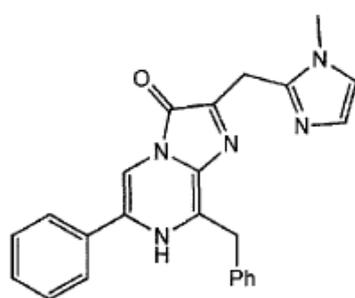
3946



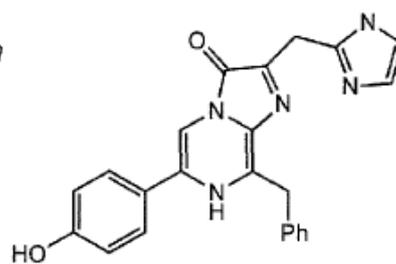
3889



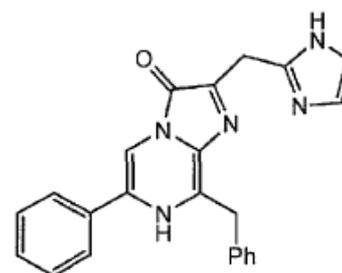
3939



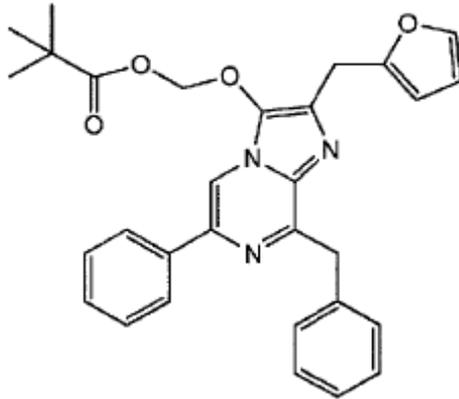
4525



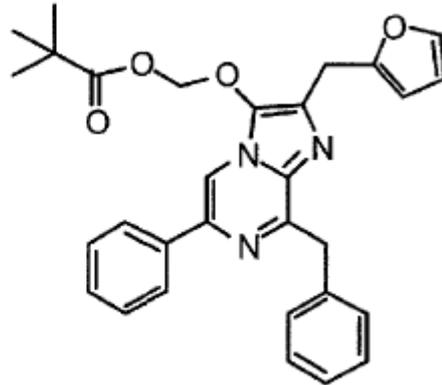
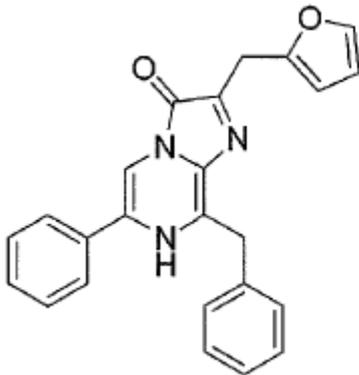
4540



4541



7. Un compuesto de fórmula:



o.

- 5 8. Un kit que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. El kit de la reivindicación 8 que comprende además luciferasa.
- 10 10. El kit de la reivindicación 9, en el que la luciferasa es una luciferasa de *Oplophorus* o de *Renilla*.
11. Un kit de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, que comprende además un reactivo tampón.
12. Un método de detección de la luminiscencia en una muestra, que comprende:
- 15 poner en contacto una muestra con un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7; poner en contacto la muestra con una luciferasa que utiliza coelenterazina, si no está presente en la muestra; y detectar la luminiscencia.
- 20 13. El método de la reivindicación 12, en el que la muestra contiene células vivas.
14. El método de la reivindicación 12, en el que la muestra contiene una luciferasa que utiliza coelenterazina.
15. Un método de detección de la luminiscencia en un animal transgénico, que comprende:
- 25 administrar a un animal transgénico un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7; y detectar la luminiscencia; en donde el animal transgénico expresa una luciferasa que utiliza coelenterazina.

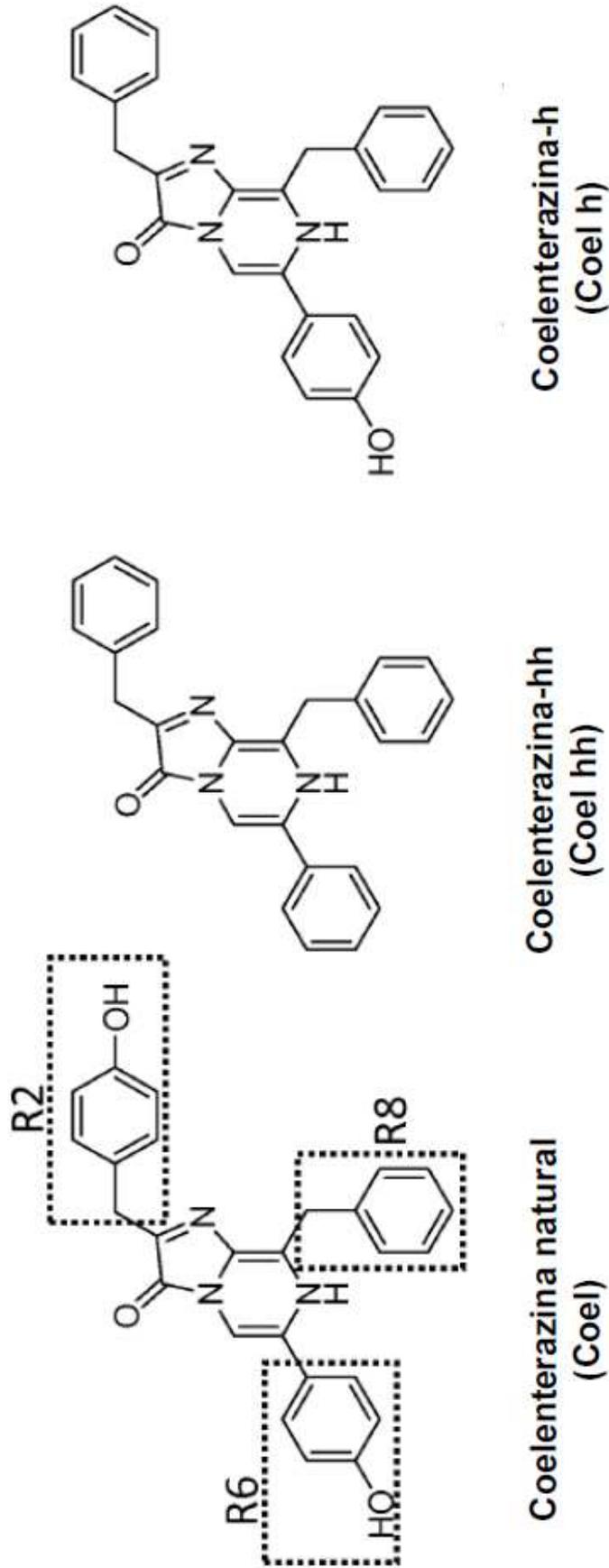


FIG. 1

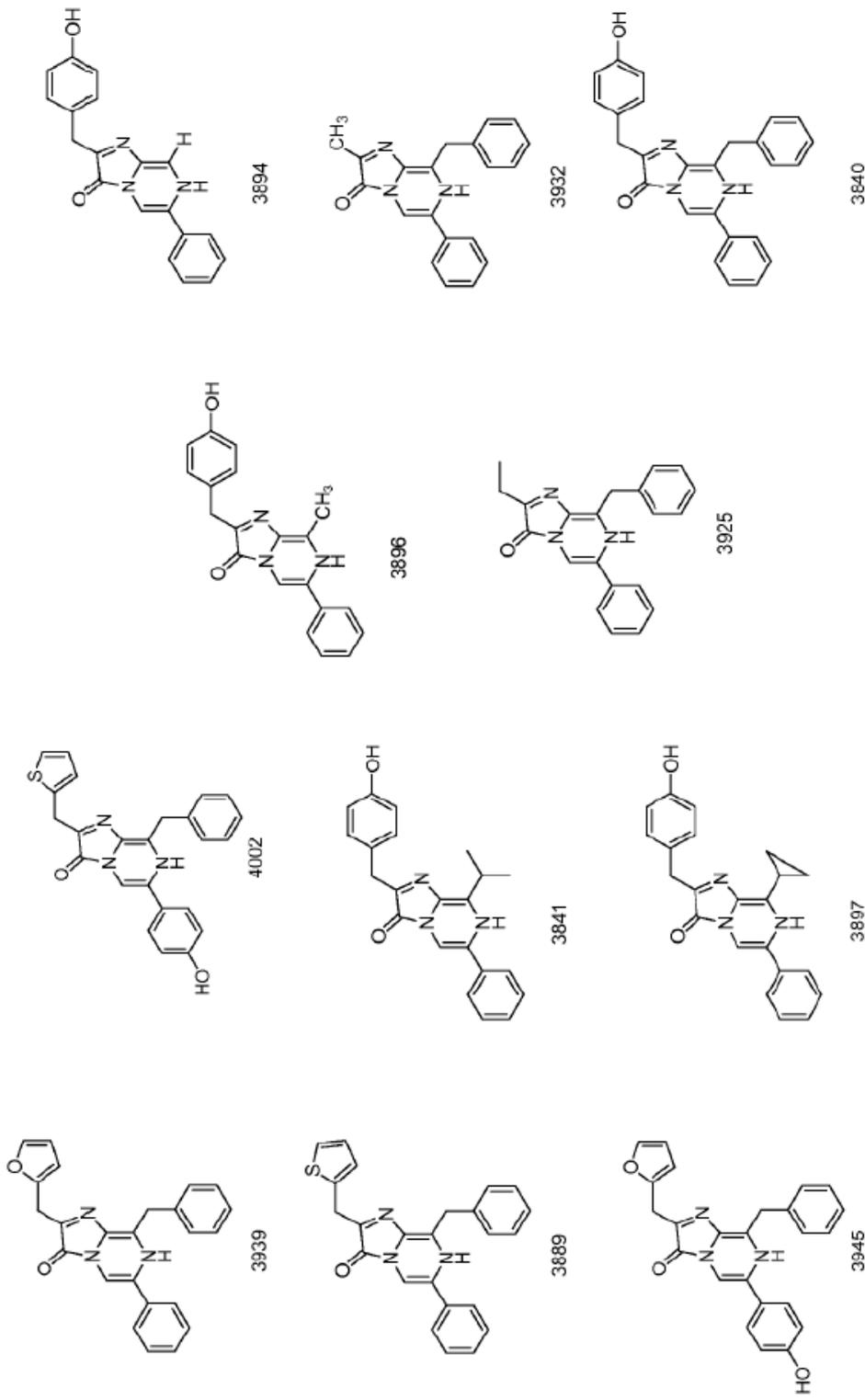


FIG. 2

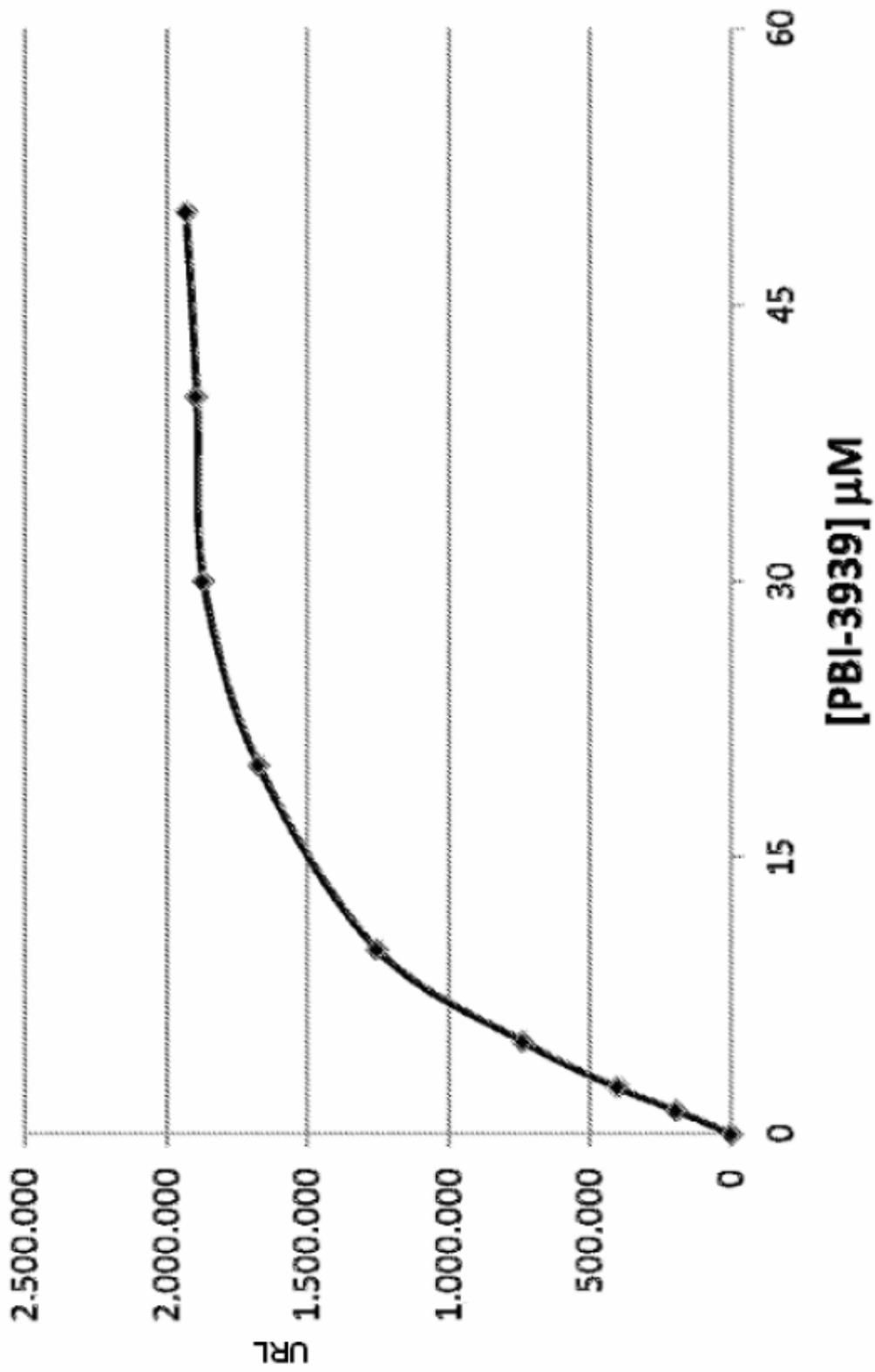


FIG. 3

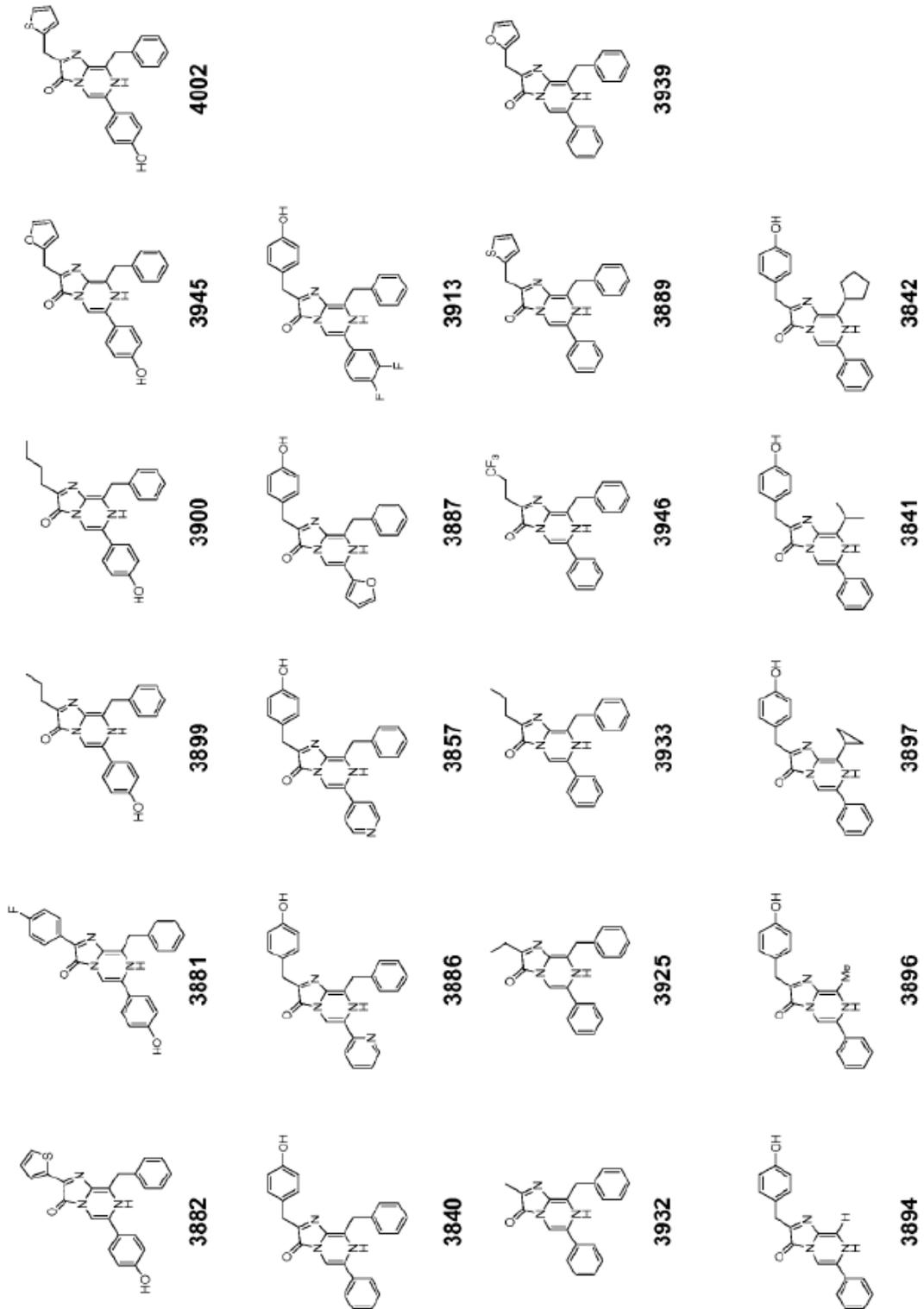
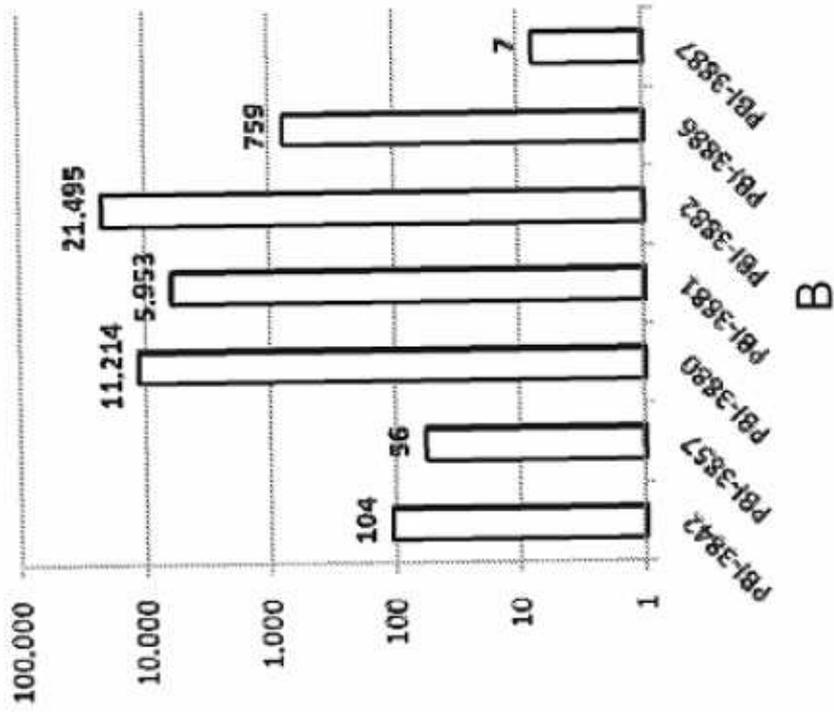


FIG. 4



Veces por debajo de la colenterazina natural

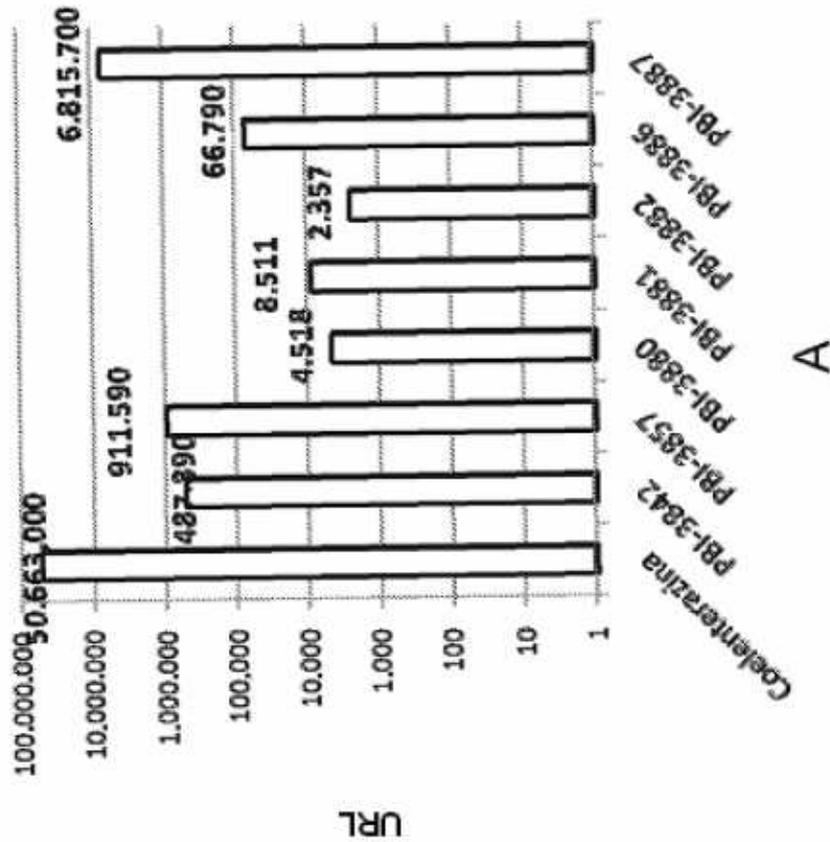


FIG. 5

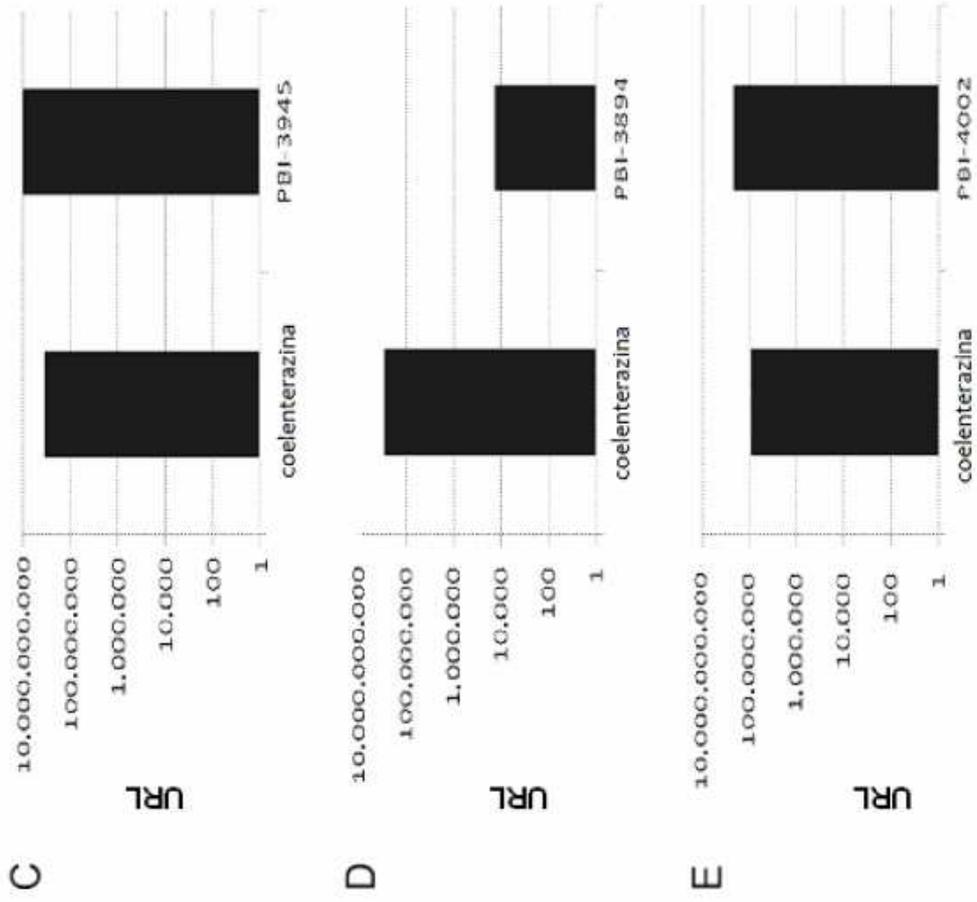


FIG. 5

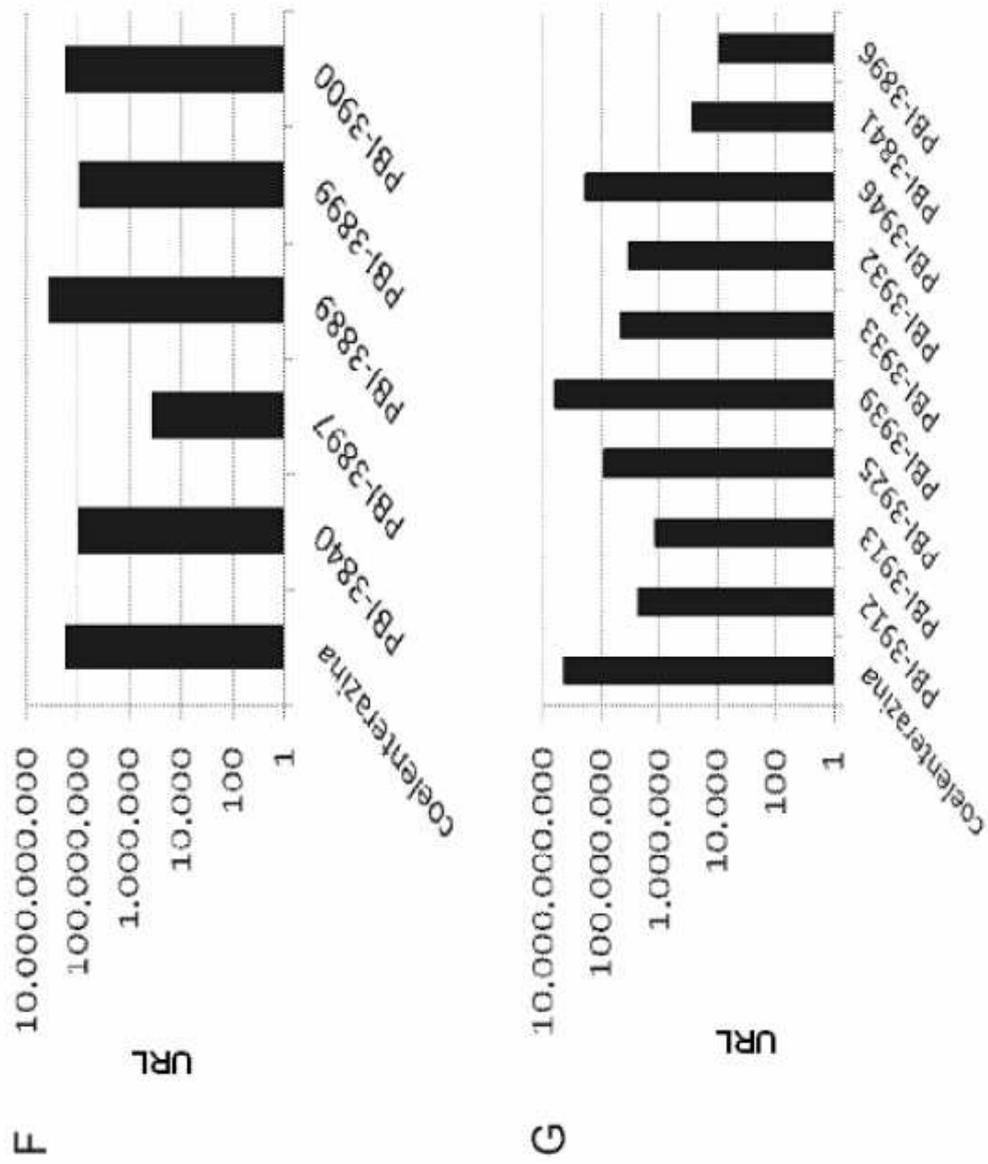


FIG. 5

POSICIÓN	Ción (secuencia de aa)	h	h/h	z-me	PBI-3840	PBI-3897	PBI-3885	PBI-3899	PBI-3900
15	02F2 (G15R)	0,04	0,024	0,004	0,008	0,003	0,021	0,003	0,011
18	40H11 (Q18L)	0,38	0,26	0,51	0,28	4,46	0,53	0,17	0,43
20	16C5 (Q20R)	5,66	1,96	1,88	4,72	6,50	1,61	4,92	2,41
22	14C1 (L22I)	0,17	0,63	0,47	0,34	0,08	0,43	0,49	0,66
27	11E8 (L27V)	0,34	1,74	1,88	0,35	0,03	2,03	0,28	2,22
34	18F8 (F54S)	0,21	0,40	1,78	0,13	0,55	1,62	0,18	0,69
54	29H7 (F54I)	11,30	1,71	1,48	24,59	18,11	2,32	10,57	2,99
58	30C4 (V58I)	0,27	0,89	1,00	0,96	0,21	1,15	0,65	1,02
72	04G7 (L72Q)	4,46	1,25	1,15	9,36	5,65	1,13	4,04	1,53
75	28B2 (M75K)	4,16	1,57	2,30	5,43	4,92	2,38	4,03	2,11
77	18C4 (F77I)	1,62	0,55	1,22	7,82	2,06	1,33	2,67	0,85
77	42E4 (F77C)	0,13	0,46	0,99	3,43	0,20	1,27	0,56	0,58
77	50D12 (F77I)	1,48	0,52	1,15	7,75	1,87	2,20	2,46	0,78
89	35D11 (K89E)	3,02	0,59	1,26	5,27	3,39	1,41	2,32	0,95
90	10F2 (I90T)	2,20	0,48	0,66	0,00	3,90	0,84	1,36	0,55
92	04A12 (L92H)	0,89	0,39	0,61	7,31	3,72	14,25	0,53	0,89
109	43F9 (V109F)	0,48	0,33	0,97	0,36	1,49	24,83	0,94	0,56
127	30D6 (V127A)	0,23	0,50	0,54	0,26	0,81	1,00	0,57	0,42
139	2788 (D139G)	0,01	0,03	0,14	0,00	0,03	0,16	0,00	0,02
164	25A1 (C164S)	2,47	1,79	1,53	2,74	3,37	1,63	2,87	2,05
14-89	25F2 (A14V,K89E)	3,05	0,81	3,22	5,43	3,82	6,21	1,58	2,32
27-33	47D8 (L27M,K33N)	0,59	1,71	2,05	0,85	0,95	0,37	2,12	1,33
49-72	26F1 (E49K,L72Q)	6,19	1,48	1,35	10,72	6,90	9,99	1,32	4,76
54-66	48G3 (F54I, S66T)	7,33	1,06	0,11	16,39	11,27	8,28	1,42	6,63
54-67	3588 (F54S,G67S)	0,33	0,75	2,49	0,19	0,78	0,87	2,25	0,27
55-117	05H8 (D55G,I117F)	0,24	0,53	0,62	0,00	0,25	0,22	0,65	0,21
56-93	46A11 (I56V,H93R)	0,35	0,61	1,53	0,22	0,42	0,18	1,50	0,36
68-75	04E2 (F68S,M75K)	3,43	1,20	1,53	4,37	3,91	4,12	1,62	3,24
77-126	2789 (F77T,I126R)	0,87	0,15	0,69	4,87	0,80	1,00	0,79	1,14
77-39	33E2 (F77T,T39I)	0,95	0,34	0,69	6,30	1,32	1,64	0,74	0,47
89-148	50E7 (K89E,S148T)	1,61	0,48	0,65	3,74	2,23	3,20	0,94	1,59
90-77	02D10 (I90V,F77T)	2,05	0,70	1,17	17,39	6,32	10,88	1,05	2,37
106-164	17E6 (M106K,C164S)	4,14	2,46	2,52	3,77	5,06	7,72	2,71	3,80
13-58-169	47G12 (E23K,V58L,A159V)	0,06	0,44	0,49	1,49	0,10	0,01	0,68	0,58
33-76-89	17C5 (K33N,I76N,K89E)	1,27	0,68	2,02	1,33	2,22	1,12	2,24	1,07
68-90-145	04D10 (F68S,I90V,P145L)	4,17	1,40	1,65	0,00	6,09	5,96	1,72	3,82
59-109-113-136	61H10 (I69T,V109F,P113T,L136M)	0,06	0,06	0,26	0,04	0,46	8,09	0,25	0,10

FIG. 6A

POSICIÓN	Cion (secuencia de aa)	Colenterazina	H	h,h	v	PBI-3912	PBI-3913	PBI-3925	PBI-3997	PBI-3899
15	03F2 (G15R)	0,003	0,040	0,018	0,022	0,005	0,019	0,005	0,002	0,003
18	40H11 (Q18L)	0,20	0,18	0,30	0,11	0,13	0,14	0,06	3,24	0,09
20	16C5 (Q20R)	4,08	1,30	1,14	5,25	5,27	5,34	4,83	3,33	3,32
22	14C1 (L22I)	0,13	0,56	0,40	0,13	0,10	0,11	0,21	0,06	0,39
27	11E8 (L27V)	0,16	1,01	0,95	0,22	0,07	0,08	0,26	0,02	0,45
54	18F8 (F54S)	0,16	0,37	1,44	0,55	0,17	0,22	0,26	0,38	0,14
54	29H7 (F54I)	10,34	1,45	1,06	8,28	18,52	15,79	18,92	11,15	9,62
58	30E4 (V58I)	0,17	0,63	0,69	0,20	0,19	0,21	0,83	0,13	0,43
72	04G7 (L72Q)	2,96	1,02	0,69	1,03	5,81	5,81	5,65	7,42	3,09
75	28B2 (M75K)	2,93	1,35	1,53	1,06	3,98	3,89	3,86	4,73	2,93
77	18C4 (F77T)	1,01	0,53	0,85	1,31	0,78	0,74	7,08	1,69	2,30
77	42E4 (F77C)	0,10	0,34	0,70	0,61	0,03	0,04	0,88	0,01	0,41
77	50D12 (F77T)	0,88	0,46	0,72	1,21	0,62	0,60	5,94	1,41	1,92
89	35D11 (K89E)	2,17	0,53	0,89	0,76	3,64	3,98	3,51	3,89	1,77
90	10F2 (I90T)	1,86	0,39	0,49	1,71	10,44	11,10	3,76	3,61	1,20
92	04A12 (L92H)	0,65	0,08	0,27	27,76	4,48	2,79	5,01	6,72	0,60
109	43F9 (V109F)	0,36	0,20	0,76	0,84	0,73	0,60	1,04	18,04	0,31
127	30D6 (V127A)	0,16	0,31	0,30	0,16	0,32	0,45	0,50	0,43	0,15
139	27B8 (D139G)	0,00	0,02	0,08	0,10	0,02	0,04	0,01	0,00	0,00
164	25A1 (C164S)	3,10	1,71	1,47	3,91	3,04	3,29	3,43	4,33	3,14
14-89	25F2 (A14V,K89E)	3,31	0,75	1,16	1,34	5,26	5,90	5,28	4,68	2,46
27-33	47D8(L27M,K33N)	0,52	1,41	1,46	1,55	0,41	0,41	1,21	0,17	1,05
49-72	26F1 (E49K,L72Q)	3,61	1,09	0,76	2,24	6,83	6,59	6,42	6,33	3,40
54-66	48G3 (F54I,S66T)	10,15	1,40	1,01	7,67	17,73	14,90	18,29	10,14	9,44
54-67	35B8 (F54S,G67S)	0,23	0,46	1,73	1,28	0,23	0,29	0,32	0,42	0,18
55-117	05H8 (D55G,I117F)	0,18	0,38	0,46	0,44	0,12	0,14	0,10	0,14	0,16
56-93	46A11 (I56V,H93R)	0,24	0,39	0,96	0,88	0,10	0,11	0,21	0,11	0,24
68-75	04E2 (F68S,M75K)	2,39	1,01	1,04	0,74	3,01	3,04	3,61	3,58	2,47
77-126	27B9 (F77T,I126R)	0,34	0,15	0,37	0,51	0,28	0,24	2,16	0,58	0,74
77-39	33E2 (F77T,T39I)	0,50	0,24	0,35	0,67	0,42	0,38	3,27	0,96	0,96
89-148	50E7 (K89E,S148T)	2,97	0,66	1,15	1,50	4,57	5,01	4,36	3,91	2,28
90-77	02D10 (I90V,F77T)	1,44	0,63	0,80	3,79	2,80	2,47	24,43	7,82	2,14
106-164	17E6 (M106K,C164S)	2,71	1,50	1,52	4,80	2,79	2,92	2,93	3,47	2,48
23-58-169	47G12 (E23K,V58L,A169V)	0,05	0,41	0,39	0,31	0,03	0,03	1,24	0,01	0,48
33-76-89	17C5 (K33N,I76N,K89E)	1,53	0,63	1,74	2,16	0,86	0,84	1,38	0,91	1,03
68-90-145	04D10 (F68S,I90V,P145L)	2,63	0,88	0,95	2,74	4,40	4,42	5,96	4,82	2,48
59-109-113-136	43H10 (I59T,V109F,F113T,L136M)	0,08	0,07	0,29	0,20	0,23	0,22	0,41	7,52	0,07

FIG. 6B

POSICIÓN	Clon (secuencia de aa)	coel	h	h,h	Z-me	PBI-3889	PBI-3939	PBI-3993	PBI-3932	PBI-3946	PBI-3897	PBI-3841	PBI-3896	PBI-3925
15	03F2 (G15R)	0,003	0,041	0,021	0,005	0,025	0,019	0,003	0,009	0,003	0,002	0,003	0,013	0,004
18	40H11 (Q18L)	0,21	0,34	0,48	0,19	0,43	0,29	0,09	0,08	0,09	3,86	4,08	61,25	0,09
20	16CS (Q20R)	2,84	1,04	0,02	3,91	0,86	1,15	2,79	4,70	2,18	2,70	3,59	3,78	3,81
22	14C1 (L22I)	0,12	0,52	0,39	0,30	0,33	0,29	0,20	0,15	0,20	0,06	0,09	0,12	0,20
27	11E8 (L27V)	0,25	3,64	1,48	0,40	1,53	1,44	0,47	0,52	0,61	0,03	0,04	0,09	0,40
54	18F8 (F54S)	0,2	0,6	1,6	0,1	1,4	1,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,5	0,3
54	29H7 (F54I)	6,77	1,18	0,78	1,57	0,50	5,38	17,81	3,69	8,04	6,14	9,69	12,97	
58	30E4 (V58I)	0,17	0,66	0,72	0,62	0,80	0,91	0,63	0,90	0,48	0,12	0,14	0,27	0,83
72	04G7 (L72Q)	4,07	1,27	0,93	7,23	1,08	1,27	5,03	7,66	3,14	6,40	7,30	6,20	6,85
75	28B2 (M75K)	3,25	1,44	1,68	3,97	1,86	2,01	3,77	4,33	3,33	3,09	3,85	3,41	4,15
77	18C4 (F77I)	0,86	0,48	0,74	4,98	0,96	0,81	3,37	4,84	1,81	1,32	0,56	0,91	5,04
77	42E4 (F77C)	0,07	0,30	0,65	1,89	0,77	0,46	0,50	2,18	0,34	0,02	0,02	0,08	0,63
77	50D12 (F77I)	0,87	0,50	0,76	4,89	0,99	0,85	3,45	4,92	1,86	1,30	0,55	0,88	5,14
89	35D11 (K89E)	2,17	0,60	0,88	3,39	0,97	1,02	2,28	3,65	2,09	3,17	2,95	2,56	3,01
90	10F2 (I90T)	1,68	0,37	0,51	2,60	0,72	0,62	2,08	4,64	1,35	2,99	1,93	4,51	3,57
92	04A12 (L92H)	0,59	0,03	0,24	5,44	0,23	0,11	1,86	3,25	0,88	8,81	23,30	22,13	3,53
109	43F9 (V109F)	0,25	0,20	0,65	0,11	0,73	0,64	0,64	0,71	0,44	13,07	4,80	1,20	0,85
127	30D6 (V127A)	0,22	0,40	0,46	0,15	0,48	0,52	0,55	0,75	0,62	0,50	0,55	0,53	0,66
139	27B8 (D139G)	0,00	0,02	0,11	0,01	0,10	0,09	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,04	0,01
164	25A1 (C164S)	2,10	1,30	1,12	1,71	1,28	1,30	2,30	2,26	2,11	3,14	5,76	1,96	2,66
14-89	25F2 (A14V,K89E)	1,93	0,53	0,73	2,80	0,98	1,00	2,15	3,78	1,88	3,07	2,32	2,94	3,01
27-33	47D8 (L27M,K33N)	0,38	1,26	1,37	0,46	1,73	1,79	1,27	0,92	1,46	0,16	0,21	0,25	1,02
49-72	26F1 (E49K,L72Q)	4,26	1,22	0,91	7,26	1,10	1,26	5,21	7,70	3,23	6,66	7,28	6,41	6,91
54-66	48G3 (F54I,S66T)	10,93	1,88	1,21	5,03	0,66	0,76	8,62	28,26	5,88	9,90	7,53	11,93	20,94
54-67	35B8 (F54S,G67S)	0,19	0,59	1,64	0,10	1,44	1,30	0,47	0,30	0,58	0,43	0,51	0,47	0,32
55-117	05H8 (D55G,I117F)	0,17	0,37	0,49	0,08	0,51	0,54	0,15	0,09	0,19	0,12	0,10	0,13	0,10
56-93	46A11 (S56V,H93R)	0,21	0,45	0,59	0,12	0,97	0,80	0,26	0,13	0,14	0,09	0,06	0,15	0,18
68-75	04E2 (F68S,M75K)	2,80	1,14	1,27	4,47	1,50	1,62	3,71	4,35	3,04	3,91	3,46	2,89	4,20
77-126	27B0 (F77T,T126R)	0,55	0,26	0,54	3,68	0,67	0,59	1,91	2,34	1,06	0,67	0,22	0,49	2,58
77-89	38E2 (F77T,I89I)	0,70	0,35	0,51	4,35	0,67	0,53	2,39	4,01	1,20	1,12	0,59	0,67	3,74
89-148	50E7 (K89E,S148T)	2,62	0,76	1,04	3,34	1,21	1,24	2,76	4,62	2,09	2,89	2,61	2,58	3,71
90-77	02D10 (I90V,F77T)	1,55	0,60	0,82	13,12	1,08	0,84	6,71	30,62	1,77	8,13	4,09	12,85	20,94
106-164	17E6 (M106K,C164S)	1,65	1,26	1,11	1,92	1,27	1,29	1,98	1,77	1,82	2,58	4,79	1,60	2,16
23-58-169	47G12 (F23K,V58L,A169V)	0,05	0,42	0,46	1,16	0,62	0,79	0,84	1,54	0,30	0,02	0,03	0,12	1,32
33-76-89	17C5 (K33N,I76N,K89E)	1,11	0,59	1,48	0,93	1,89	1,79	1,30	1,13	1,56	0,74	0,22	0,65	0,99
68-90-145	04D10 (F68S,I90V,P145L)	3,91	1,33	1,45	5,59	1,74	1,99	6,12	8,68	4,09	3,86	3,64	6,08	8,66
59-109-113-136	61-109-105I,V109F,F133I,I136N)	0,06	0,07	0,24	0,03	0,26	0,20	0,25	0,30	0,16	5,44	2,21	0,43	0,36

FIG. 6C

POSICIÓN	Ción (secuencia de aa)	coel.	h, h	PBI-3945
15	03F2 (G15R)	0,002	0,010	0,024
18	40H11 (Q18L)	0,38	0,53	0,39
20	16C5 (Q20R)	2,58	0,82	0,80
22	14C1 (L22I)	0,12	0,33	0,44
27	11E8 (L27V)	0,21	1,20	1,30
54	18F8 (F54S)	0,59	0,25	0,03
54	29H7 (F54I)	6,20	0,65	1,29
58	30E4 (V58I)	0,18	0,69	0,77
72	04G7 (L72Q)	4,19	1,01	1,49
75	28B2 (M75K)	4,11	2,21	2,06
77	18C4 (F77T)	0,93	0,74	0,33
77	42E4 (F77C)	0,08	0,75	0,28
77	50D12 (F77T)	0,81	0,64	0,29
89	35D11 (K89E)	2,18	0,88	0,61
90	10F2 (I90T)	1,45	0,38	0,32
92	04A12 (L92H)	0,62	0,27	0,03
109	43F9 (Y109F)	0,22	0,54	0,07
127	30D6 (V127A)	0,11	0,22	0,19
139	27B8 (D139G)	0,00	0,08	0,01
164	25A1 (C164S)	0,56	0,61	0,63
14-89	25F2 (A14V, K89E)	1,91	0,66	0,49
27-33	47D8 (L27M, K33N)	0,40	1,24	1,12
49-72	26F1 (E49K, L72Q)	1,17	1,08	1,14
54-66	48G3 (F54I, S66T)	6,17	0,66	1,31
54-67	35B8 (F54S, G67S)	0,13	0,99	0,24
55-117	05H8 (D55G, I117F)	0,11	0,30	0,30
56-93	46A11 (I56V, H93R)	0,15	0,64	0,26
68-75	04E2 (F68S, M75K)	4,11	1,78	1,94
77-126	27B9 (F77T, T126R)	0,49	0,47	0,13
77-39	33E2 (F77T, T39I)	0,58	0,44	0,20
89-148	50E7 (K89E, S148T)	2,06	0,85	0,59
90-77	02D10 (I90V, F77T)	1,85	1,01	0,56
106-164	17E6 (M106K, C164S)	2,16	1,30	1,35
23-58-169	47G12 (E23K, V58L, A169V)	0,04	0,37	0,47
33-76-89	17C5 (K33N, I76N, K89E)	1,31	1,75	0,60
68-90-145	04D10 (F68S, I90V, P145L)	3,01	1,11	1,07
59-109-113-136	41H10 (I59T, V109F, P113T, L136M)	0,05	0,20	0,02

FIG. 6D

Clon	18	20	54	59	72	77	89	92	109	113	127	136	164
QC#1 (Q20R, L92H, F77C)		X				X		X					
QC#3 (F77C)						X							
QC#5 (L92H)								X					
QC#6 (F54I, F77C)			X			X							
QC#7 (Q20R, F54I, F77C)		X	X			X							
QC#8 (Q20R, F54I)		X	X										
QC#9 (F54I, F77C, L92H)			X			X		X					
QC#10 (Q20R, F54I, F77C, L92H)		X	X			X		X					
QC#13 (Q20R, Y109F)		X							X				
QC#14 (L92H, Y109F)								X	X				
QC#15 (Y109F)									X				
QC#16 (F54I, L92H, Y109F)			X					X	X				
QC#20 (F54I, Y109F)			X						X				
QC#22 (Q18L, L92H, Y109F)									X	X			
QC#27 (Q18L, F54I, L92H, Y109F)			X						X	X			
QC#32 (Q18L, I59T, L92H, Y109F, P113T, V127A, K136M)	X							X	X	X	X	X	
QC#36 (Q20R, F54I, L72Q, K89E, C164S)		X	X		X		X						X
QC#37 (F54I, L72Q, K89E, C164S)			X		X		X						X
QC#38 (F54I, C164S)			X										X
QC #1 C2 (Q18L, Y109F)	X								X				
QC #1 B4 (Q18L, F54I)	X		X										
QC #1 C3 (Q18L, F54I, Y109F)	X		X					X					
QC#1 A7 (F54I, K89E, C164S)			X				X						X
QC#1 A11 (Q20R, F54I, L72Q, K89E)		X	X		X		X						
QC#1 B9 Q20R, F54I, L72Q, C164S)		X	X		X								X
QC#1 D11 (F54I, L72Q, K89E, C164S)			X		X		X						X

FIG. 7

Muestra	coelenterazina	h	h,h	PBI-3840	PBI-3925	PBI-3912
QC#1 (Q20R, L92H, F77C)	0,17	0,03	0,19	0,74	1,03	0,56
QC#3 (F77C)	0,09	0,36	0,89	0,16	1,06	0,04
QC#5 (L92H)	0,73	0,04	0,38	4,49	6,92	5,64
QC#6 (F54I, F77C)	0,85	0,59	0,91	1,89	3,80	0,41
QC#7 (Q20R, F54I, F77C)	0,72	0,22	0,20	1,85	2,83	1,50
QC#8 (Q20R, F54I)	6,48	0,89	0,34	11,73	21,51	35,04
QC#9 (F54I, F77C, L92H)	0,39	0,07	0,16	0,81	1,58	0,64
QC#10 (Q20R, F54I, F77C, L92H)	0,27	0,05	0,07	0,75	2,24	1,53
QC#13 (Q20R, Y109F)	0,21	0,07	0,25	1,08	1,74	4,18
QC#14 (L92H, Y109F)	0,06	0,00	0,08	0,78	1,84	2,63
QC#15 (Y109F)	0,21	0,15	0,54	0,95	0,68	0,46
QC#16 (F54I, L92H, Y109F)	0,35	0,02	0,05	1,01	3,73	8,75
QC#20 (F54I, Y109F)	4,49	0,82	0,51	9,41	12,43	10,39
QC#22 (Q18L, L92H, Y109F)	0,05	0,01	0,05	0,15	0,06	0,14
QC#27 (Q18L, F54I, L92H, Y109F)	0,08	0,01	0,10	0,68	0,59	1,06
QC#32 (Q18L, I59T, L92H, Y109F, P113T, V127A, K136M)	0,003	0,001	0,007	0,022	0,015	0,020
QC#36 (Q20R, F54I, L72Q, K89E, C164S)	0,99	0,14	0,06	1,34	1,86	16,93
QC#37 (F54I, L72Q, K89E, C164S)	2,01	0,30	0,14	3,16	4,63	23,45
QC#38 (F54I, C164S)	3,39	0,65	0,48	5,25	4,56	9,48
C1A4E	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

FIG. 8A

Muestra	Coef.	h	h,h	2-me	PBI-3889	PBI-3939	PBI-3933	PBI-3932	PBI-3946	PBI-3841	PBI-3896	PBI-3925
QC#1 (Q20R, L92H, F77C)	0,13	0,02	0,11	1,62	0,15	0,12	0,45	3,87	0,18	0,25	0,17	0,58
QC#3 (F77C)	0,07	0,25	0,55	1,14	0,63	0,38	0,41	1,79	0,28	0,04	0,04	0,55
QC#5 (L92H)	0,51	0,03	0,24	4,99	0,23	0,10	1,68	2,88	0,80	25,89	23,26	3,28
QC#6 (F54I, F77C)	0,69	0,48	0,67	22,92	0,31	0,07	0,51	35,10	0,44	0,08	0,15	2,55
QC#7 (Q20R, F54I, F77C)	0,54	0,18	0,15	22,57	0,09	0,03	0,39	32,08	0,21	0,39	0,41	2,24
QC#8 (Q20R, F54I)	5,32	0,79	0,28	28,12	0,49	0,11	2,80	40,88	1,43	26,40	43,55	17,18
QC#9 (F54I, F77C, L92H)	0,26	0,05	0,10	3,69	0,13	0,09	0,55	5,63	0,22	0,21	0,23	1,03
QC#10 (Q20R, F54I, F77C, L92H)	0,20	0,03	0,05	5,91	0,07	0,05	0,45	11,18	0,19	0,54	0,45	1,58
QC#13 (Q20R, Y109F)	0,26	0,10	0,31	1,05	0,37	0,29	0,66	3,37	0,25	19,06	74,46	1,82
QC#14 (L92H, Y109F)	0,10	0,003	0,11	1,18	0,11	0,06	0,52	2,24	0,07	13,47	65,50	1,64
QC#15 (Y109F)	0,29	0,22	0,74	0,38	0,83	0,69	0,68	0,74	0,47	6,43	1,61	0,89
QC#16 (F54I, L92H, Y109F)	0,44	0,02	0,06	6,00	0,11	0,06	0,46	9,48	0,03	5,53	269,14	3,50
QC#20 (F54I, Y109F)	4,22	0,90	0,50	5,86	1,19	0,61	3,68	14,10	1,82	44,89	15,18	12,45
QC#22 (Q18L, L92H, Y109F)	0,06	0,01	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,03	0,01	14,10	242,95	0,04
QC#27 (Q18L, F54I, L92H, Y109F)	0,13	0,02	0,12	0,33	0,15	0,12	0,30	0,24	0,10	0,60	561,32	0,40
QC#32 (Q18L, I59T, L92H, Y109F, P113T, V127A, K136M)	0,004	0,001	0,011	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	16,29	51,72	0,02
QC#36 (Q20R, F54I, L72Q, K89E, C164S)	0,78	0,14	0,07	23,49	0,02	0,002	0,09	28,30	0,06	64,90	49,30	2,04
QC#37 (F54I, L72Q, K89E, C164S)	1,87	0,32	0,17	26,86	0,08	0,01	0,32	33,42	0,22	71,56	37,60	5,30
QC#38 (F54I, C164S)	4,51	0,92	0,67	11,22	0,49	0,06	1,15	12,46	1,13	22,07	11,03	6,46
C1A4E	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

FIG. 8B

Muestra	Coef	h/h	PBI-3939	PBI-3945	PBI-3840	PBI-3932	PBI-3925	PBI-9894	PBI-3896
CC C2 (Q18, Y109F)	0,01	0,06	0,04	0,04	0,03	0,01	0,01	19,87	24,80
CC B4 (Q18, F54)	5,71	1,84	1,23	1,19	6,04	8,23	7,02	67,33	719,58
CC C3 (Q18, F54, Y109F)	0,18	0,52	0,65	0,22	0,49	0,13	0,46	407,08	454,48
CC E6 (Q18, E9T, Y109F, P113T, V127A, K136M)	0,0004	0,01	0,01	0,002	0,01	0,01	0,00	3,88	9,03
CC A7 (F54, K88E, C164S)	2,63	0,21	0,01	0,28	4,05	17,21	4,86	11,82	23,95
CC A11 (Q20R, F54, L72Q, K88E)	3,76	0,13	0,02	0,31	3,21	94,34	15,76	46,29	127,88
CC B9 (Q20R, F54, L72Q, C164S)	1,67	0,10	0,005	0,10	1,89	25,28	3,37	13,58	42,27
CC D11 (F54, L72Q, K88E, C164S)	1,95	0,13	0,01	0,16	2,45	27,69	4,84	13,38	33,69
CC F6 (F54, F73)	0,67	0,76	0,06	0,36	1,24	39,37	3,14	0,52	1,32
CC F7 (Q20R, F54, F73D)	0,51	0,15	0,03	0,07	1,01	32,09	2,26	1,67	1,30
CC F9 (F54, F73C, L92H)	0,22	0,10	0,09	0,06	0,33	4,97	1,01	0,26	0,32
CC F8 (Q20R, F54)	6,37	0,35	0,14	0,93	8,42	46,87	21,22	13,40	33,57
CC F13 (Q20R, Y109F)	0,18	0,26	0,25	0,02	0,79	2,54	1,58	6,85	49,23
CC F14 (L92H, Y109F)	0,04	0,07	0,04	0,001	0,29	1,35	1,43	4,53	37,03
CC F16 (F54, L92H, Y109F)	0,30	0,05	0,05	0,01	0,46	7,07	3,42	19,64	157,70
CC F20 (F54, Y109F)	4,25	0,56	0,62	1,04	6,93	13,08	11,84	8,73	10,47
CC F22 (Q18, L92H, Y109F)	0,04	0,05	0,04	0,01	0,09	0,03	0,05	38,41	138,45
CC F27 (Q18, F54, L92H, Y109F)	0,07	0,08	0,10	0,01	0,28	0,17	0,42	392,98	283,85
CC F32 (Q18, E9T, L92H, Y109F, P113T, V127A, K136M)	0,003	0,01	0,01	0,0002	0,02	0,01	0,02	11,79	33,46
CC F36 (Q20R, F54, L72Q, K88E, C164S)	0,92	0,06	0,002	0,05	1,07	24,56	2,12	10,40	35,04

FIG. 9

Clon.	18	20	54	71	77	90	92	109	127
QC#2 1 (Q20R, F77C, I90V, I92H, V127A)		X			X	X	X		X
QC#2 2 (Q20R, G71D, F77C, I90V, I92H, V127A)		X		X	X	X	X		X
QC#2 3 (Q20R, G71D, F77C, I92H, V127A)		X		X	X		X		X
QC#2 6 (F54I, G71D, F77C, I92H, V127A)			X	X	X		X		X
QC#2 7 (F54I, G71D, F77C, I90V, I92H)			X	X	X		X		X
QC#2 8 (F54I, G71D, F77C, I90V, I92H, V127A)			X	X	X		X		X
QC#2 11 (Q20R, F54I, G71D, F77C, I90V, I92H, V127A)		X	X	X	X		X		X
QC#2 16 (G71D, I90V, I92H, Y109F, L127A)				X		X	X	X	X
QC#2 18 (G71D, I92H, Y109F, L127A)				X			X	X	X
QC#2 21 (Q20R, F54I, G71D, F77C, I90V, I92H, V127A)		X	X	X	X		X		X
QC#2 26 (Q18L, G71D, F77Y, I90V, I92H, Y109F, V127A)	X			X	X		X	X	X
QC#2 31 (Q18L, F54I, G71D, F77Y, I90V, I92H, Y109F, V127A)	X		X	X	X		X	X	X
QC#2 41 (G71D, F77C, I90V, I92H, V127A)				X	X		X		X
QC#2 44 (G71D, F77C, I90V, V127A)				X	X				X
QC#2 A3 (Q20R, G71D, F77C, I92H)		X		X	X		X		
QC#2 C6 (F54I, G71D, F77C, I92H)			X	X	X		X		
QC#2 A7 (Q20R, F54I, G71D, F77C, I92H, V127A)		X	X	X	X		X		X
QC#2 C10 (I90V, I92H, Y109F, V127A)						X	X	X	X
QC#2 E1 (F54I, I90V, I92H, Y109F, V127A)			X			X	X	X	X
QC#2 E2 (F54I, G71D, I90V, I92H, Y109F)			X	X		X	X		
QC#2 F4 (Q18L, G71D, F77Y, I92H, Y109F, V127A)	X			X	X		X	X	X
QC#2 F4 (Q18L, F77Y, I90V, I92H, Y109F, V127A)	X				X		X	X	X
QC#2 E7 (Q18L, F54I, F77Y, I90V, I92H, Y109F, V127A)	X		X		X		X	X	X
QC#2 F8 (Q18L, F54I, I90V, I92H, Y109F, V127A)	X		X				X	X	X
QC#2 F7 (Q18L, F54I, G71D, F77Y, I92H, Y109F, V127A)	X		X	X	X		X	X	X
QC#2 H11 (G71D, F77C)				X	X				
LE1 (I90V, I92H)						X	X		
LE2 (I90V, Y109F)						X	X	X	X
LE3 (I90V, I92H, Y109F)						X	X	X	X

FIG. 10

Muestra	Coel	h,h	PBI-3939	PBI-3945	PBI-3840	PBI-3932	PBI-3925	PBI-3894	PBI-3896
QC#2 1 (Q20R,F77C,I90V,I92H,V127A)	0,04	0,04	0,05	0,004	0,17	4,04	0,62	0,19	0,13
QC#2 2 (Q20R,G71D,F77C,I90V,I92H,V127A)	0,07	0,05	0,07	0,01	0,24	6,19	0,98	0,26	0,20
QC#2 3 (Q20R,G71D,F77C,I92H,V127A)	0,09	0,07	0,09	0,01	0,30	5,02	0,88	0,34	0,21
QC#2 6 (F54I,G71D,F77C,I92H,V127A)	0,11	0,07	0,08	0,03	0,19	2,43	0,51	0,15	0,11
QC#2 7 (F54I,G71D,F77C,I90V,I92H)	0,40	0,11	0,12	0,09	0,39	13,65	2,15	0,38	0,41
QC#2 8 (F54I,G71D,F77C,I90V,I92H,V127A)	0,11	0,06	0,08	0,03	0,16	4,12	0,68	0,15	0,18
QC#2 11 (Q20R,F54I,G71D,F77C,I90V,I92H,V127A)	0,10	0,03	0,05	0,02	0,17	6,66	1,11	0,40	0,24
QC#2 16 (G71D,I90V,I92H,Y109F,I127A,)	0,11	0,06	0,04	0,001	0,29	1,49	1,51	7,72	55,11
QC#2 18 (G71D,I92H,Y109F,I127A)	0,08	0,04	0,03	0,0005	0,28	1,33	1,29	7,30	48,97
QC#2 21(Q20R,F54I,G71D,F77C,I90V,I92H,V127A)	0,27	0,02	0,02	0,004	0,31	7,57	2,49	30,02	160,54
QC#2 26 (Q18L,G71D,F77Y,I90V,I92H,Y109F,V127A)	0,00	0,01	0,01	0,001	0,00	0,01	0,02	1,38	7,86
QC#2 31 (Q18L,F54I,G71D,F77Y,I90V,I92H,Y109F,V127A)	0,01	0,03	0,03	0,004	0,01	0,05	0,06	8,04	77,32
QC#2 41 (G71D,F77C,I90V,I92H,V127A)	0,05	0,07	0,08	0,01	0,12	2,50	0,37	0,10	0,07
QC#2 44 (G71D,F77C,I90V,V127A)	0,17	0,15	0,15	0,03	0,15	2,92	0,41	0,18	0,10
QC#2 A3 (Q20R,G71D,F77C,I92H)	0,23	0,20	0,22	0,03	0,52	6,75	1,11	0,39	0,24
QC#2 C6 (F54I,G71D,F77C,I92H)	0,44	0,18	0,18	0,13	0,60	12,27	2,43	0,50	0,30
QC#2 A7 (Q20R,F54I,G71D,F77C,I92H,V127A)	0,13	0,05	0,06	0,02	0,28	6,93	1,25	0,32	0,22
QC#2 C10 (I90V,I92H,Y109F,V127A)	0,06	0,04	0,02	0,0004	0,22	1,08	1,05	4,33	34,52
QC#2 E1 (F54I,I90V,I92H,Y109F,V127A)	0,18	0,04	0,03	0,004	0,25	2,74	1,66	6,96	49,09
QC#1 E2 (F54I,G71D,I90V,I92H,Y109F)	0,39	0,06	0,04	0,01	0,24	9,71	3,63	25,77	185,63
QC#2 E4 (Q18L,G71D,F77Y,I92H,Y109F,V127A)	0,0005	0,009	0,008	0,0005	0,001	0,009	0,004	0,58	3,48
QC#2 F4(Q18L,F77Y,I90V,I92H,Y109F,V127A)	0,0002	0,0057	0,0062	0,0003	0,0013	0,0069	0,0048	0,56	4,18
QC#2 E7 (Q18L,F54I,F77Y,I90V,I92H,Y109F,V127A)	0,003	0,013	0,015	0,002	0,006	0,020	0,024	3,17	36,43
QC#2 E8 (Q18L,F54I,I90V,I92H,Y109F,V127A)	0,06	0,04	0,05	0,002	0,13	0,05	0,11	145,44	331,26
QC#2 F7 (Q18L,F54I,G71D,F77Y,I92H,Y109F,V127A)	0,01	0,03	0,03	0,004	0,01	0,03	0,04	3,22	30,50
QC#2 H11 (G71D,F77C)	0,07	0,69	0,61	0,24	0,13	3,46	1,02	0,16	0,10
C1A4E	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

FIG. 11

Muestra	Coel.	hh	PBI-3939	PBI-3945	PBI-3889	PBI-3840	PBI-3932	PBI-3925	PBI-3894	PBI-3896	PBI-3897
C1A4E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
I90V	1,49	0,77	1,21	0,51	1,12	2,86	22,13	14,69	8,48	2,30	6,43
Y109F	0,13	0,42	0,35	0,15	0,42	0,58	0,37	0,41	1,05	0,35	12,70
LE2 (I90V, Y109F)	0,31	0,29	0,26	0,06	0,33	1,80	10,20	6,09	5,15	3,04	60,24
QC #27(Q18L/L92H/Y109F/FS4I)	0,15	0,08	0,08	0,01	0,06	0,23	0,12	0,20	196,86	140,68	13,83
QC#2 E7 (Q18L,FS4I,F77Y,I90V,L92H,Y109F,V127A)	0,002	0,02	0,02	0,0022	0,0076	0,0054	0,02	0,02	1,83	6,57	31,17
QC#2 F4(Q18L,F77Y,I90V,L92H,Y109F,V127A)	0,0008	0,005	0,0016	0,0004	0,0021	0,0021	0,01	0,05	0,24	0,80	7,04
QC#1 A11 (Q20R, F54I, L72Q, K89E)	3,50	0,12	0,02	0,16	0,08	3,51	82,84	11,19	59,12	24,00	42,51

FIG. 12

Muestra	POSICIÓN	Secuencia	COLENTERAZINA	H,H	PBI-3897	PBI-3896	PBI-3894
29H3	18	L18I	1,17	0,32	0,94	2,37	3,25
25A11	21	V21L	0,06	0,11	0,53	0,55	0,19
4F3	67	G67S	1,75	0,63	1,37	1,24	1,06
24B12	68	F68Y	1,88	0,88	1,52	1,62	1,44
29C4	72	L72Q	1,69	0,77	1,37	2,33	2,38
3H11	75	M75K	2,33	1,09	1,90	2,19	1,90
3F10	76	I76F	0,50	0,81	1,27	0,17	0,08
27E 4	90	I90T	0,24	0,17	0,76	0,10	0,04
1B6	92	H92R	0,10	0,46	0,98	0,06	0,02
47H12	22-74	L22F-E74K	0,03	0,12	0,29	0,02	0,03
11F10	158-1	F11,V158I	2,49	2,53	2,37	1,67	1,40
48D5	11-109	R11Q,F109Y	6,24	2,74	0,39	1,04	0,17
18A8	18-98	L18I, V98F	0,64	0,19	0,54	1,25	1,56
43G9	21-106	V21M,M106I	0,02	0,04	0,05	0,23	0,49
33A5	31-102	F31I, V102M	0,73	0,68	0,67	1,06	1,16
11G9	32-92	Q32H,H92R	0,10	0,47	1,02	0,06	0,01
9D7	45-76	V45E,I76V	1,66	0,71	1,33	1,72	1,80
33H2	92-159	H92R,T159S	0,05	0,37	0,58	0,04	0,01
1G5	92-170	H92R,G170R	0,58	N/A	1,50	0,16	0,31
19C10	18-49-86	L18Q,E49D,H86R	3,29	0,15	0,52	0,05	0,05
44H1	21-47-51	V21M, S47P, G51E	0,01	0,02	0,02	0,10	0,22
14C2	46-106-168	L46Q, M106I, L168F	1,77	0,97	1,52	1,51	1,33
24D7	48-99-76	G48R,I99V,I76F	0,38	0,63	1,04	0,10	0,05
18E 8	55-92-96	D55E,H92Q,I96A	1,40	3,78	2,41	0,39	0,36
7D9	74-92-99	E74I,H92R,I99T	0,14	0,36	0,77	0,04	0,01
8C2	21-68-69-142	V21M,F68I,Q69H,L142V	0,01	0,02	0,02	0,11	0,22
QC #27 HT7			1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Posiciones en común con biblioteca de C-1A5E
18
22
68
72
75
90
92
106
109

FIG. 13

Secuencia	Clon	21	68	72	75	76	90	92	158
F68Y, L72Q, M75K, V158I	QC27 #1		X	X	X				X
I90T, H92R	QC27 #2						X	X	
F68Y, L72Q, M75K, I90T, H92R, V158I	QC27 #3		X	X	X		X	X	X
V21L, I76F, I90T, H92R	QC27 #4	X				X	X	X	
V21L, I76F	QC27 #5A	X				X			
V21L, F68Y, L72Q, M75K, I90T	QC27 #7A	X	X	X	X		X		
V21L, I76F, H92R	QC27 #8	X				X		X	
V21L, F68Y, L72Q, M75K, H92R, V158I	QC27 #9A	X	X	X	X			X	X
V21L, F68Y, L72Q, M75K, I76F, I90T, H92R, V158I	QC27 #10	X	X	X	X	X	X	X	X
F68Y, L72Q, M75K, H92R	QC27 #12A		X	X	X			X	
V21L, H92R	QC27 #13	X						X	
F68Y, L72Q, M75K, H92R, V158I	QC27 #14A		X	X	X			X	X
V21L, F68Y, L72Q, M75K, I90T, H92R, V158I	QC27 #5	X	X	X	X		X	X	X
V21L, I90T, I76F	QC27 #6	X				X	X		
V21L, F68Y, L72Q, M75K, I76F, V158I	QC27 #9B	X	X	X	X	X			X

FIG. 14

Muestra	Cambio de aa	Coelenterazina	h,h	PBI-3897	PBI-3841	PBI-3896	PBI-3894
QC27 #1	F68Y, L72Q, M75K, V158I	2,59	3,95	2,90	2,90	5,19	6,72
QC27 #2	I90T, H92R	0,0189	0,17	0,19	0,19	0,02	0,00
QC27 #3	F68Y, L72Q, M75K, V158I, I90T, H92R	0,1212	0,77	0,88	0,92	0,10	0,02
QC27 #4	V21L, I76F, I90T, H92R	0,0006	0,00	0,06	0,08	0,04	0,00
QC27 #6A	V21L, I76F	0,0060	0,07	0,26	0,20	0,12	0,03
QC27 #7A	V21L, F68Y, L72Q, M75K, I90T	0,0370	0,40	1,76	1,54	1,09	0,16
QC27 #8	V21L, I76F, H92R	0,0730	0,21	0,50	0,59	0,28	0,11
QC27 #9A	V21L, F68Y, L72Q, M75K, H92R, V158I	0,0041	0,08	0,81	1,35	0,32	0,03
QC27 #10	V21L, F68Y, L72Q, M75K, I76F, I90T, H92R, V158I	0,0049	0,01	0,33	0,48	0,20	0,02
QC27 #12A	F68Y, L72Q, M75K, H92R	0,2767	2,64	2,82	3,17	0,31	0,09
QC27 #13	V21L, H92R	0,0007	0,01	0,12	0,20	0,05	0,00
QC27 #14A	F68Y, L72Q, M75K, H92R, V158I	0,2283	2,38	2,51	2,71	0,26	0,07
QC27 #5	V21L, F68Y, L72Q, M75K, I90T, H92R, V158I	0,0013	0,02	0,15	0,25	0,07	0,01
QC27 #6	V21L, I90T, I76F	0,0014	0,00	0,09	0,05	0,03	0,00
QC27 #9B	V21L, F68Y, L72Q, M75K, I76F, V158I	0,0530	0,43	1,14	1,19	0,93	0,32
QC27 ctrl.		1	1	1	1	1	1

FIG. 15

Muestra	Posición	Cambio de aa	Coelenterazina	H	HH	PBI-3841	PBI-3897
30D12	22	L22F	0,08	0,01	0,08	0,28	0,26
26D4	36	V36M	1,70	1,40	2,19	1,21	1,08
40B10	76	I76F	3,66	0,54	0,57	1,65	1,97
5C3	128	T128A	0,19	0,26	0,45	0,43	0,47
22C2	128-154	T128S,T154S	0,24	0,33	0,52	0,43	0,46
22G9	135-152	N135Y,R152H	0,09	0,13	0,16	0,20	0,24
39H11	18-145	L18I,P145Q	42,10	3,20	18,30	2,51	2,37
36C11	18-99	L18V,I99T	125,68	2,64	24,99	2,15	2,17
3E 2	67-159	G67D,T159I	0,39	0,51	0,63	0,77	0,80
48C5	46-51-138	L46Q,G51R,I138S	0,43	0,49	0,96	0,87	0,95
3C10	51-112-113	G51V,R112C,P113H	0,24	0,31	0,72	0,93	0,67
QC279a HT			1	1	1	1	1

FIG. 16

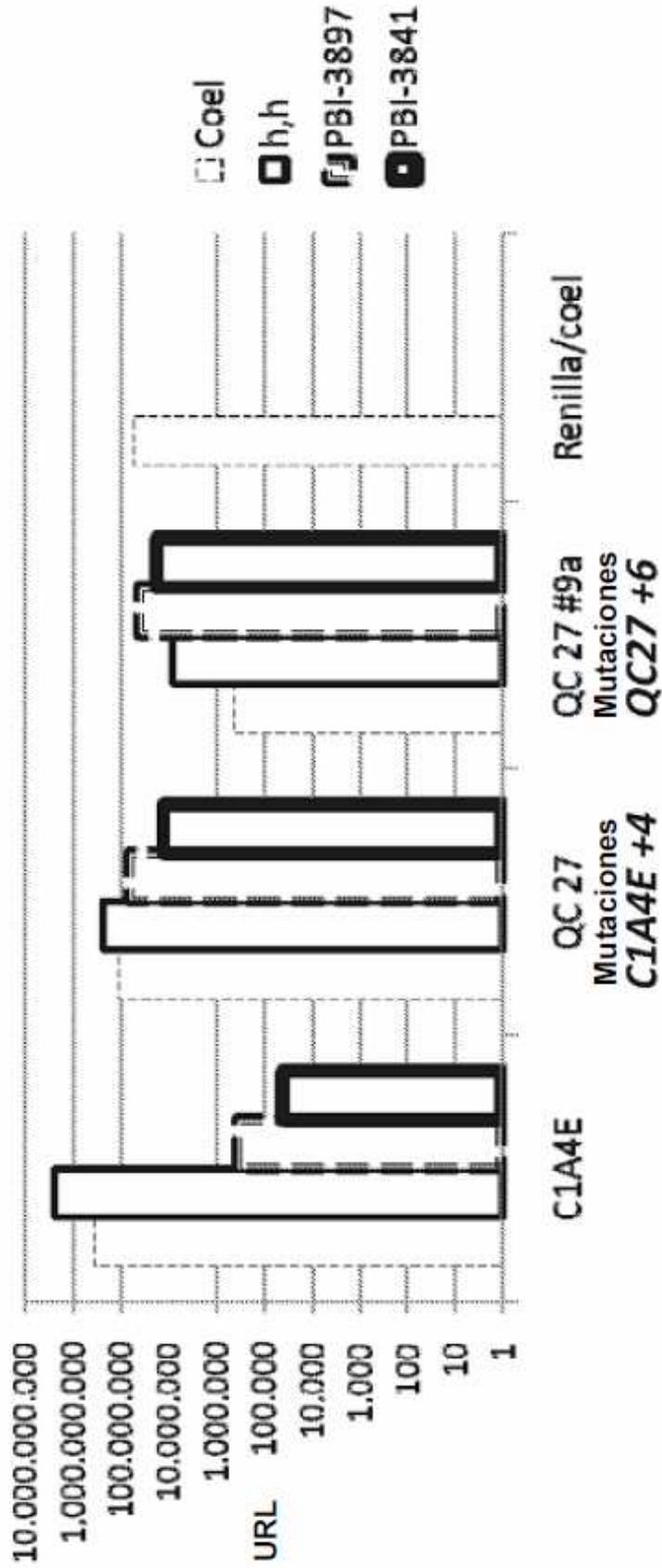


FIG. 17

Muestra	Posición	Cambio de aa	Coelenterazina	h,h	PBI-3939	PBI-3945	PBI-3889	PBI-4002
IV 29H12	19	D19N	0,002	0,03	0,04	0,15	0,03	0,11
IV 47E11	20	Q20P	0,054	1,05	1,36	1,22	1,22	1,12
IV 36E11	38	V38I	0,169	0,96	1,26	1,18	1,23	1,09
IV 21D1	44	I44F	0,128	0,67	0,65	0,39	0,73	0,38
IV 588	76	I76N	0,208	0,32	0,39	0,50	0,36	0,44
IV 50G8	77	Y77N	0,141	0,86	0,23	0,61	0,62	0,85
IV 27E6	95	G95S	0,106	0,73	0,70	0,61	0,78	0,62
IV 2G6	95	G95D	0,004	0,07	0,07	0,33	0,06	0,30
IV 27B7	110	F110I	0,022	0,13	0,18	0,44	0,17	0,37
IV 26H7	149	L149I	0,266	0,94	0,82	0,90	0,89	0,94
IV 21A4	152	R152S	0,242	0,78	0,83	0,63	0,99	0,60
IV 5C2	38-43	V38F,K43N	0,008	0,45	0,51	0,56	0,46	0,51
IV 43D3	49-32	E49G,Q32P	0,170	0,93	1,23	1,15	1,20	1,07
IV 20E12	60-119	I60V,V119M	0,289	0,38	0,44	0,62	0,43	0,57
IV 26B6	18-69-124	Q18H,Q69H,K124M	0,006	0,29	0,39	0,29	0,40	0,26
IV 23F3	33-43-94	K33N,K43N,Y94F	0,004	0,24	0,25	0,34	0,21	0,34
IV+HT7			1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

FIG. 18

Muestra	Posición	AA	Coef.	H	H/H	PBI-3939	PBI-3945	PBI-3889	PBI-4002
34B9	18 Q18L		0,22	0,52	0,74	0,92	0,38	1,12	0,48
8E 3	27 L27N		0,19	1,06	1,12	1,35	1,17	1,33	1,11
33C4	28 S28Y		0,07	0,88	0,80	0,78	0,88	0,88	0,80
21C5	33 K33N		0,96	1,41	1,68	1,68	1,36	1,74	1,34
25F10	36 V36E		0,14	0,39	0,46	0,40	0,36	0,60	0,41
25H7	40 P40T		0,008	0,13	0,27	0,47	0,28	0,46	0,23
28A8	135 N135D		0,04	0,50	0,69	0,73	0,51	0,86	0,47
44G12	155 I155T		0,08	0,51	0,85	0,63	0,48	0,87	0,48
46A6	32-6 F6Y,Q32L		0,12	0,61	0,76	0,75	0,57	0,80	0,56
26D5	18-51-86 Q18L,G51R,H86L		0,47	0,95	1,39	1,58	0,62	1,95	0,83
3E 12	6-42-50 F6Y,Q42H,N50K		0,12	0,60	0,84	1,03	0,61	1,04	0,61

FIG. 19

Secuencia	Muestra	19	20	27	32	38	43	49	58	77	95	110	149
Q20P,C82P,E49G,L149I	C1.1		X		X			X					X
Q20P,C82P,E49G,F77,G95D,F110I,L149I	C4.13		X		X			X		X	X	X	X
Q20P,L27,V38I,L149I	C5.16		X	X		X							X
L27,V38I,L149I	C5.19			X		X							X
D19N,Q20P,V38I,L149I	C7.26		X			X							X
V38I,G95D,F110I,L149I	C8.28					X					X	X	X
D19N,Q20P,V38I,G95D,F110I,L149I	C8.29		X			X					X	X	X
L27,V38F,K43N,L149I	C11.40			X		X		X					X
L27,V38F,K43N,V58I,L149I	C11.42			X		X		X	X				X
L27,V38F,K43N,V58I,F110I,L149I	C12.46			X		X		X	X			X	X
Q20P,L27,L149I	C13.50		X	X									X
Q20P,L27,V38I,F110I	C14.51		X	X		X						X	
L27,V38I,F110I,L149I	C14.52			X		X						X	X

FIG. 20

Muestra	Secuencia	Coelenterazina H	H _i H	PBI-3889	PBI-3945	PBI-4002	PBI-3932	PBI-3840
C1.1	Q20P,Q32P,E49G,L149I	0,00006	0,00026	0,00033	0,00069	0,00051	0,00014	0,00008
C4.13	Q20P,Q32P,E49G,F77Y,G95D,F110I,L149I	0,00006	0,00008	0,00009	0,00008	0,00006	0,00013	0,00010
C5.16	Q20P,L27N,V38I,L149I	0,0002	0,0013	0,0003	0,0011	0,0036	0,0001	0,0001
C5.19	L27N,V38I,L149I	0,0010	0,2747	0,0663	0,1595	0,5129	0,0015	0,0003
C7.26	D19N,Q20P,V38I,L149I	0,0001	0,0017	0,0011	0,0020	0,0037	0,0001	0,0000
C8.29	D19N,Q20P,V38I,G95D,F110I,L149I	0,000016	0,000025	0,000036	0,000016	0,000031	0,000040	0,000025
C11.40	L27N,V38F,K43N,L149I	0,00010	0,01172	0,00714	0,01853	0,04124	0,00036	0,00006
C11.42	L27N,V38F,K43N,V58I,L149I	0,0001	0,0016	0,0011	0,0044	0,0040	0,0001	0,0001
C12.46	L27N,V38F,K43N,V58I,F110I,L149I	0,00002	0,00004	0,00005	0,00001	0,00006	0,00006	0,00004
C13.50	Q20P,L27N,L149I	0,0001	0,0124	0,0036	0,0027	0,0109	0,0001	0,0000
C14.51	Q20P,L27N,V38I,F110I	0,00003	0,00010	0,00004	0,00001	0,00008	0,00003	0,00004
C14.52	L27N,V38I,F110I,L149I	0,00007	0,00041	0,00008	0,00006	0,00034	0,00012	0,00008
IVY-HT7		1	1	1	1	1	1	1

FIG. 21

Secuencia	clon	6	18	27	28	33	34	36	40	50	51	135	155
F6Y,Q18L,K33N,N135D	C1.1	X	X			X						X	
F6Y,Q18L,K33N,N135D,I155T	C1.2	X	X			X						X	X
F6Y,K33N,N135D,I155T	C1.3	X				X						X	X
K33N,P40T,N135D,I155T	C2.6					X		X				X	X
F6Y,Q18L,K33N,P40T,N135D,I155T	C2.7	X	X			X		X				X	X
F6Y,K33N,P40T,N135D,I155T	C2.8	X				X		X				X	X
F6Y,Q18L,K33N,V36E,P40T,N50S,G51R,N135D,I155T	C3.13	X	X			X		X	X	X		X	X
F6Y,Q18L,N135D,I155T	C4.16	X	X									X	X
Q18L,N135D,I155T	C4.17		X									X	X
F6Y,Q18L,I27V,S28Y,N135D,I155T	C4.18	X	X	X	X							X	X
F6Y,Q18L,I27V,S28Y,P40T	C5.23	X	X	X	X			X					
Q18L,I27V,S28Y,K33N,V36E,N135D,I155T	C6.26		X	X	X	X		X				X	X
F6Y,Q18L,I27V,S28Y,K33N,V36E,N135D,I155T	C6.28	X	X	X	X	X		X				X	X
F6Y,Q18L,P40T,N135D,I155T	C7.31	X	X						X			X	X
F6Y,Q18L,I27V,S28Y,K33N,P40T,N135D,I155T	C7.33	X	X	X	X			X				X	X
Q18L,P40T,N135D,I155T	C7.34		X						X			X	X
F6Y,Q18L,K33M,I34M,N135D,I155T	C8.36	X	X			X	X					X	X
Q18L,K33M,I34M,N135D,I155T	C8.38		X			X	X					X	X
F6Y,Q18L,K33M,I34M,I55T	C8.40	X	X			X	X						X
F6Y,Q18L,K33M,I34M,P40T,N135D	C9.44	X	X			X	X		X				
F6Y,Q18L,I27V,S28Y,N50S,G51R,N135D	C10.46	X	X	X	X					X	X	X	
F6Y,Q18L,N50S,G51R,N135D,I155T	C10.48	X	X							X	X	X	X
Q18L,N50S,G51R,N135D,I155T	C10.49		X							X	X	X	X
Q18L,I27V,S28Y,N50S,G51R,N135D,I155T	C10.50		X	X	X					X	X	X	X
F6Y,Q18L,I27V,S28Y,N50S,G51R,N135D,I155T	C11.54	X	X	X	X					X	X	X	X

FIG. 22

Muestra	Secuencia	Coeficienteazina	H	HH	PBI-3939	PBI-3945	PBI-3888	PBI-4002	PBI-3952	PBI-3840
Cl.1	F6Y,Q18L,K33N,NL35D	0,0055128	0,130	0,463	0,444	0,127	0,290	0,159	0,0083435	0,017
Cl.2	F6Y,Q18L,K33N,NL35D,I155T	0,0000358	0,0015688	0,0043713	0,0066058	0,0013479	0,0027420	0,0009303	0,0000844	0,0000782
Cl.3	F6Y,K33N,NL35D,I155T	0,0000257	0,0088297	0,036	0,048	0,0083438	0,023	0,0057396	0,0002600	0,0004430
C2.6	K33N,P40T,NL35D,I155T	0,0000039	0,0000288	0,0001711	0,0017877	0,0001365	0,0002859	0,0000858	0,0000035	0,0000025
C2.7	F6Y,Q18L,K33N,P40T,NL35D,I155T	0,0000038	0,0000091	0,0000318	0,0000611	0,0002445	0,0003744	0,0002560	0,0000013	0,0000020
C2.8	F6Y,K33N,P40T,NL35D,I155T	0,0000004	0,0000107	0,0000641	0,0007157	0,0000848	0,0001958	0,0000447	0,0000019	0,0000011
C3.13	F6Y,Q18L,K33N,V36E,P40T,N50S,G51R,NL35D,I155T	0,0000038	0,0000006	0,0000015	0,0000037	0,0000010	0,0000031	0,0000018	0,0000064	0,0000017
C4.16	F6Y,Q18L,NL35D,I155T	0,0000299	0,0046508	0,012	0,017	0,0052284	0,010	0,0037895	0,0000946	0,0002504
C4.17	Q18L,NL35D,I155T	0,0000222	0,0032164	0,0081708	0,011	0,0034948	0,0066376	0,0026360	0,0000717	0,0001691
C4.18	F6Y,Q18L,L27V,S28Y,NL35D,I155T	0,0000038	0,0000325	0,0001094	0,0003355	0,0001157	0,0001447	0,0000548	0,0000060	0,0000025
C5.23	F6Y,Q18L,L27V,S28Y,P40T	0,0000579	0,0002759	0,0000464	0,0004978	0,0017611	0,0002812	0,0013044	0,0000144	0,0000132
C6.26	Q18L,L27V,S28Y,K33N,V36E,NL35D,I155T	0,0000055	0,0000276	0,0001950	0,0004882	0,0000838	0,0003453	0,0000663	0,0003772	0,0000586
C6.28	F6Y,Q18L,L27V,S28Y,K33N,V36E,NL35D,I155T	0,0000016	0,0000067	0,0000451	0,0001166	0,0000200	0,0000805	0,0000158	0,0000852	0,0000157
C7.31	F6Y,Q18L,P40T,NL35D,I155T	0,0000038	0,0000017	0,0000024	0,0000174	0,0000084	0,0000113	0,0000067	0,0000018	0,0000005
C7.33	F6Y,Q18L,L27V,S28Y,K33N,P40T,NL35D,I155T	0,0000034	0,0000007	0,0000013	0,0000017	0,0000006	0,0000011	0,0000006	0,0000016	0,0000009
C7.34	Q18L,P40T,NL35D,I155T	0,0000037	0,0000021	0,0000024	0,0000253	0,0000131	0,0000159	0,0000101	0,0000048	0,0000009
C8.36	F6Y,Q18L,K33M,L34M,NL35D,I155T	0,0000024	0,0000249	0,0000898	0,0001137	0,0000298	0,0000623	0,0000269	0,0000163	0,0000195
C8.38	Q18L,K33M,L34M,NL35D,I155T	0,0000047	0,0000956	0,0003420	0,0004501	0,0001128	0,0003207	0,0001027	0,0000476	0,0000710
C8.40	F6Y,Q18L,K33M,L34M,I155T	0,0002682	0,010	0,015	0,018	0,011	0,015	0,0097708	0,0008447	0,0018540
C9.44	F6Y,Q18L,K33M,L34M,P40T,NL35D	0,0000041	0,0000139	0,0000153	0,0000379	0,0000423	0,0000474	0,0000534	0,0000284	0,0000486
Cl0.46	F6Y,Q18L,L27V,S28Y,N50S,G51R,NL35D	0,0002613	0,016	0,015	0,030	0,026	0,014	0,014	0,0004421	0,0002678
Cl0.48	F6Y,Q18L,N50S,G51R,NL35D,I155T	0,0000054	0,0005384	0,0011439	0,0016621	0,0006785	0,0010704	0,0004835	0,0000176	0,0000290
Cl0.49	Q18L,N50S,G51R,NL35D,I155T	0,0000184	0,0023853	0,0052253	0,0072753	0,0028335	0,0045995	0,0021987	0,0000853	0,0001334
Cl0.50	Q18L,L27V,S28Y,N50S,G51R,NL35D,I155T	0,0000036	0,0000547	0,0001427	0,0004411	0,0002044	0,0001929	0,0000965	0,0000697	0,0000099
Cl1.54	F6Y,Q18L,L27V,S28Y,N50S,G51R,NL35D,I155T	0,0000039	0,0000157	0,0000467	0,0001215	0,0000541	0,0000547	0,0000266	0,0000065	0,0000023

FIG. 23

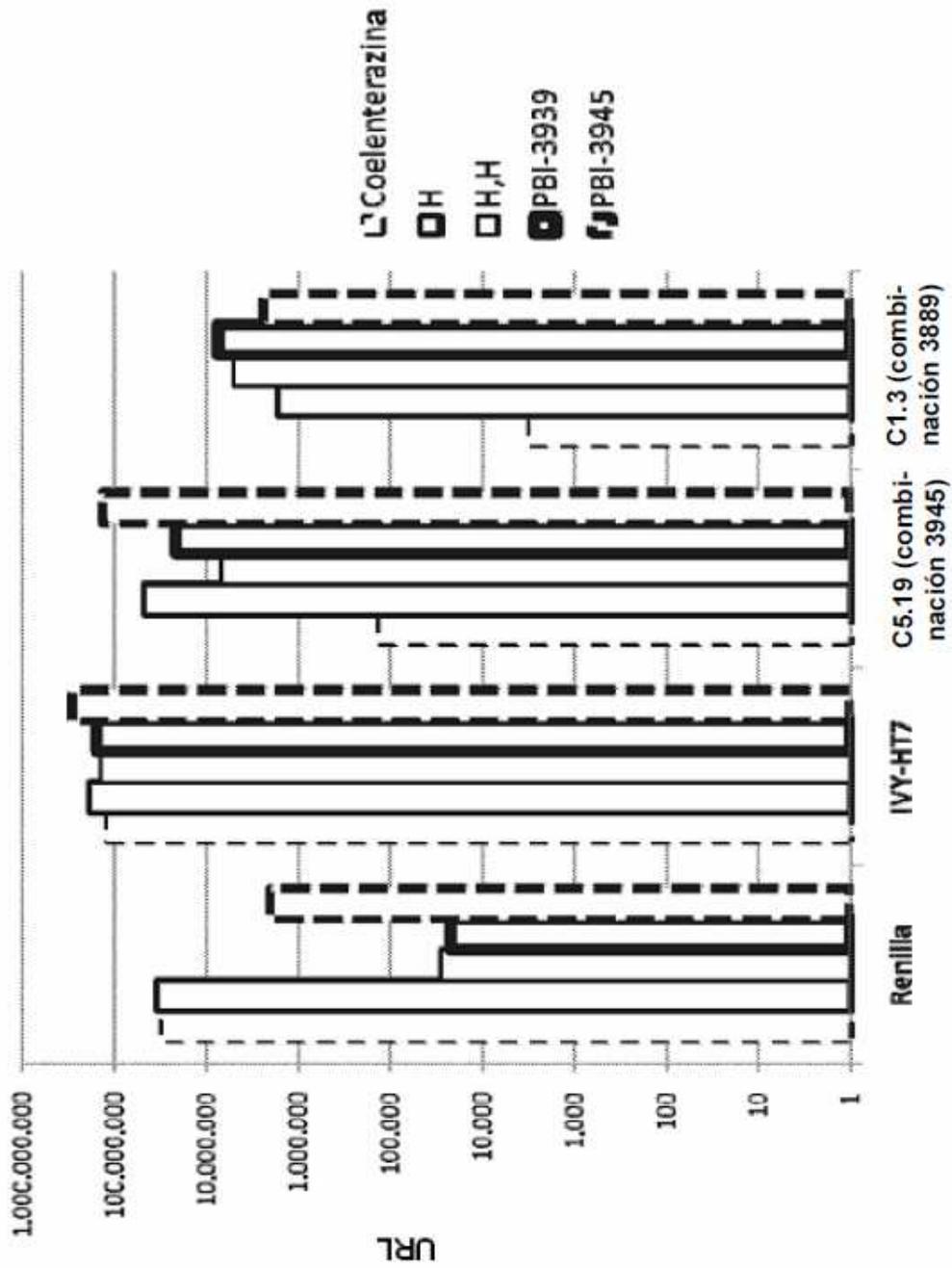


FIG. 24

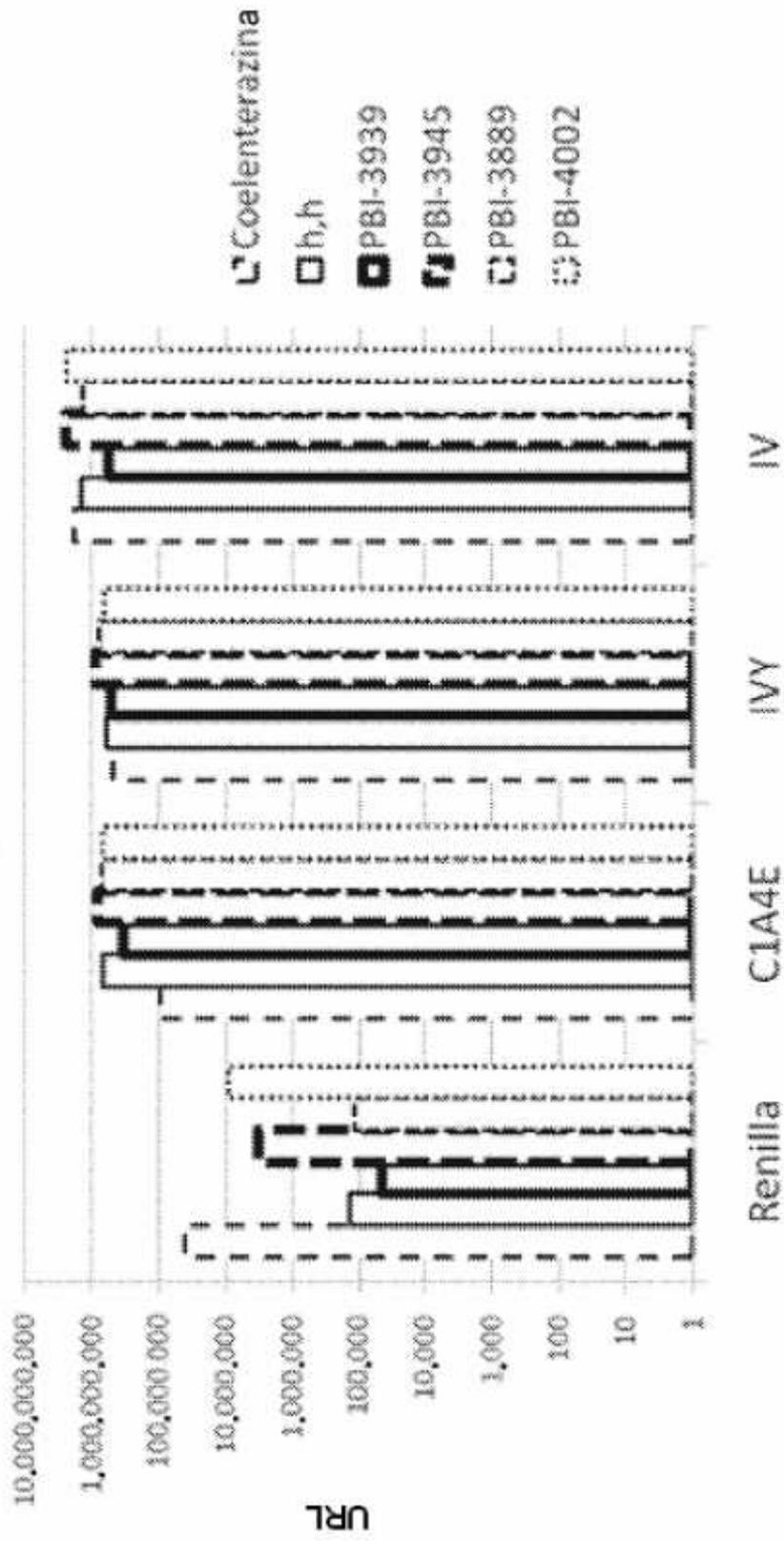


FIG. 25

Secuencia	Clon	1	4	18	27	33	38	68	70	72	75	102
Q18L	1D6		X									
F1J,L2N,V88	8A3	X		X			X					
F1J,L2N	8A7	X		X								
F1J,V88	8E2	X					X					
L2N	8E2				X							
M75K,L72Q,F68,Q18L	9B8		X					X		X	X	
M75K,L72Q,F68,L2N,Q18L,V88	9F6		X	X			X	X		X	X	
F1J,M75K,L72Q,F68,L2N,V88	10A7	X		X			X	X		X	X	
F1J,M75K,L72Q,M70,Q18L	10G10	X	X						X	X	X	
K33N	14A2								X			
F1J,M75K,L72Q,F68,K33N,102E	14G4	X					X	X		X	X	X
E4K,M75K,L72Q,F68,K33N	15C1		X				X	X		X	X	

FIG. 26

Muestra	Secuencia	Coel.	H	HH	PBI-3939	PBI-3945	PBI-3889	PBI-4002
IV		1	1	1	1	1	1	1
1D6	Q18L	0,77	0,92	2,16	4,08	1,04	2,27	1,32
8A3	F1I,L27V,V38I	0,01	0,81	0,87	0,43	0,90	0,48	0,77
8A7	F1I,L27V	0,43	1,55	1,95	1,26	1,50	1,50	1,50
8E 2	F1I,V38I	0,13	0,53	0,61	0,75	0,60	0,64	0,51
8F2	L27V	0,40	1,54	1,87	1,06	1,53	1,37	1,49
9B8	M75K,L72Q,F68Y,Q18L	1,40	1,69	2,52	4,37	1,44	2,35	1,72
9F6	M75K,L72Q,F68Y,L27V,Q18L,V38I	0,09	2,05	1,67	1,11	1,98	1,04	1,62
10A7	F1I,M75K,L72Q,F68Y,L27V,V38I	0,08	1,40	1,17	0,82	1,74	0,89	1,23
10G10	F1I,M75K,L72Q,M70V,Q18L	1,03	1,51	2,30	4,25	1,35	2,33	1,60
14A2	K33N	1,12	1,62	1,93	1,80	1,80	2,23	1,66
14C4	F1I,M75K,L72Q,F68Y,K33N,V102E	1,27	1,33	1,08	1,36	1,53	0,84	1,11
15C1	E4K,M75K,L72Q,F68Y,K33N	2,63	2,61	2,10	2,60	2,94	1,67	2,20

FIG. 27

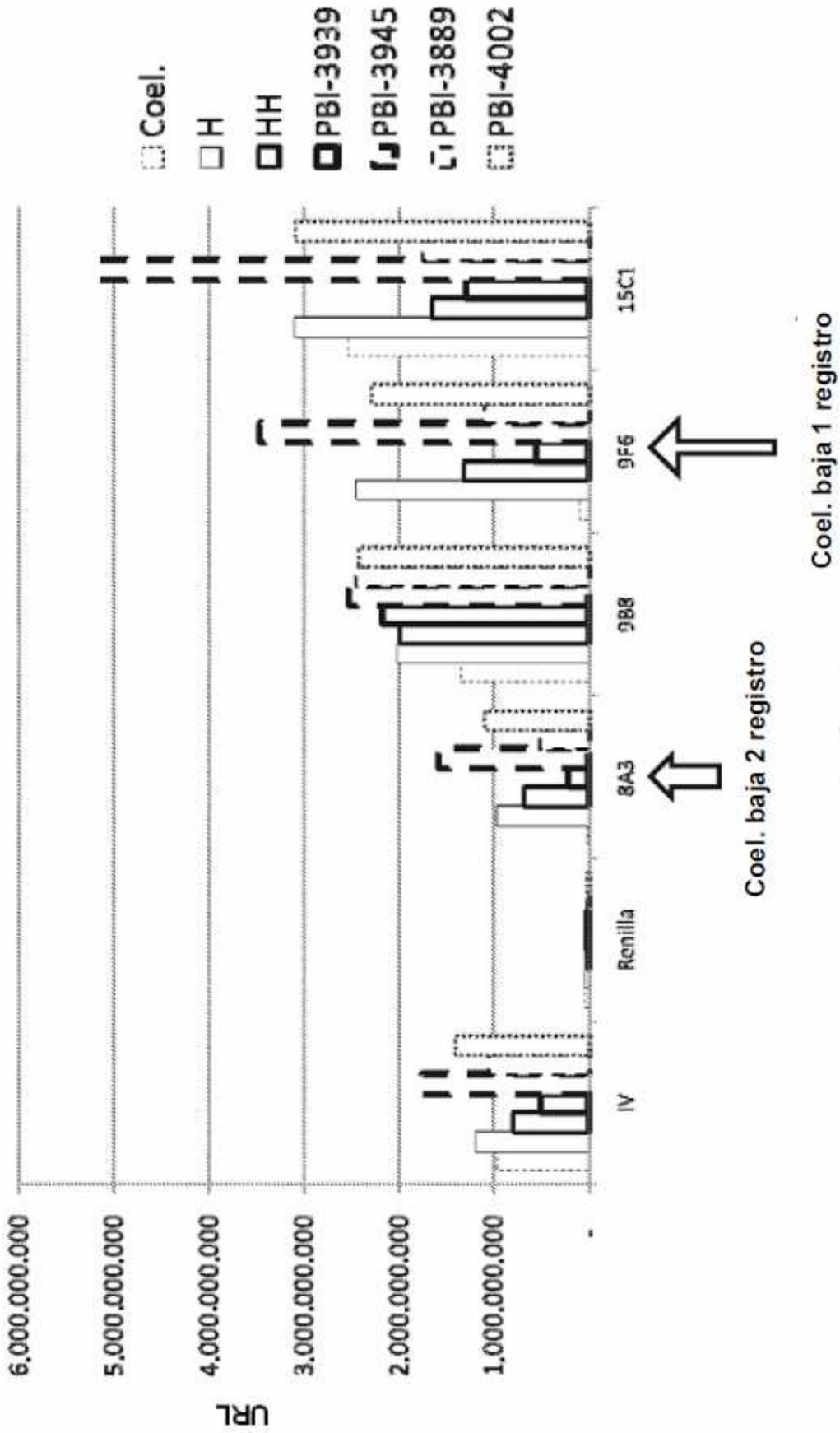


FIG. 28

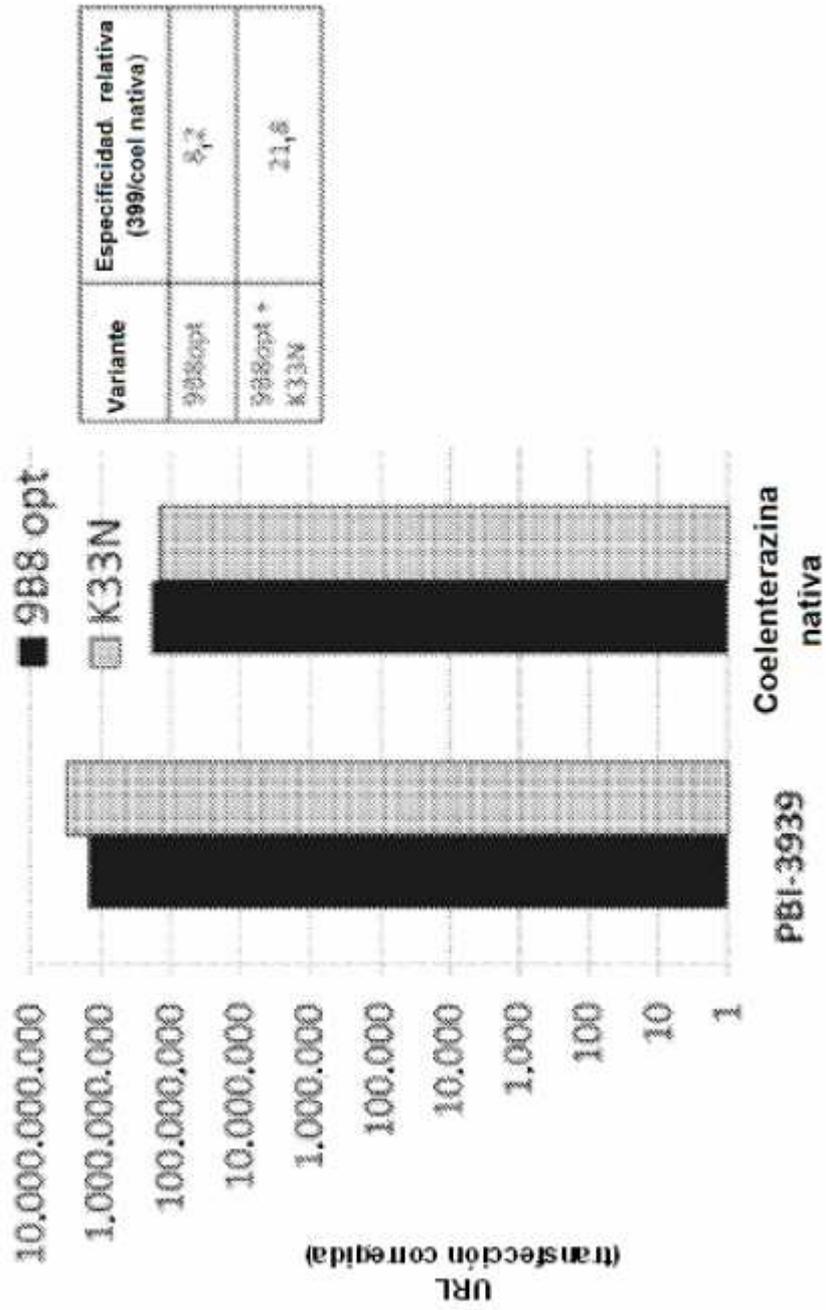


FIG. 29

A		B	
Coelenterazina nativa		Coelenterazina-h	
Aminoácido	Actividad relativa	Aminoácido	Actividad relativa
Ala	1,0	Ser	1,1
Phe	3,2	Ile	1,4
Lys	19,2	Lys	11,6
Arg	26,8	Arg	15,9
		Phe	55,9

C		D	
PBI-3939		Sustitución de aminoácido	
Aminoácido	Actividad relativa	Actividad relativa (en el contexto de OgLuc wt)	Actividad relativa (en el contexto de N166R)
Ser	1,8	L27V	62,2
Glu	4,6	A33N	0,6
Ile	10,0	K43R	1,1
Lys	17,5	M75K	65,7
Arg	26,4	T39T	118,6
Phe	444,4	L72Q	2,0
		F68D	3,0
			45,4
			1,3
			17,1
			467,7
			1,5
			5,0
			5,4

FIG. 30

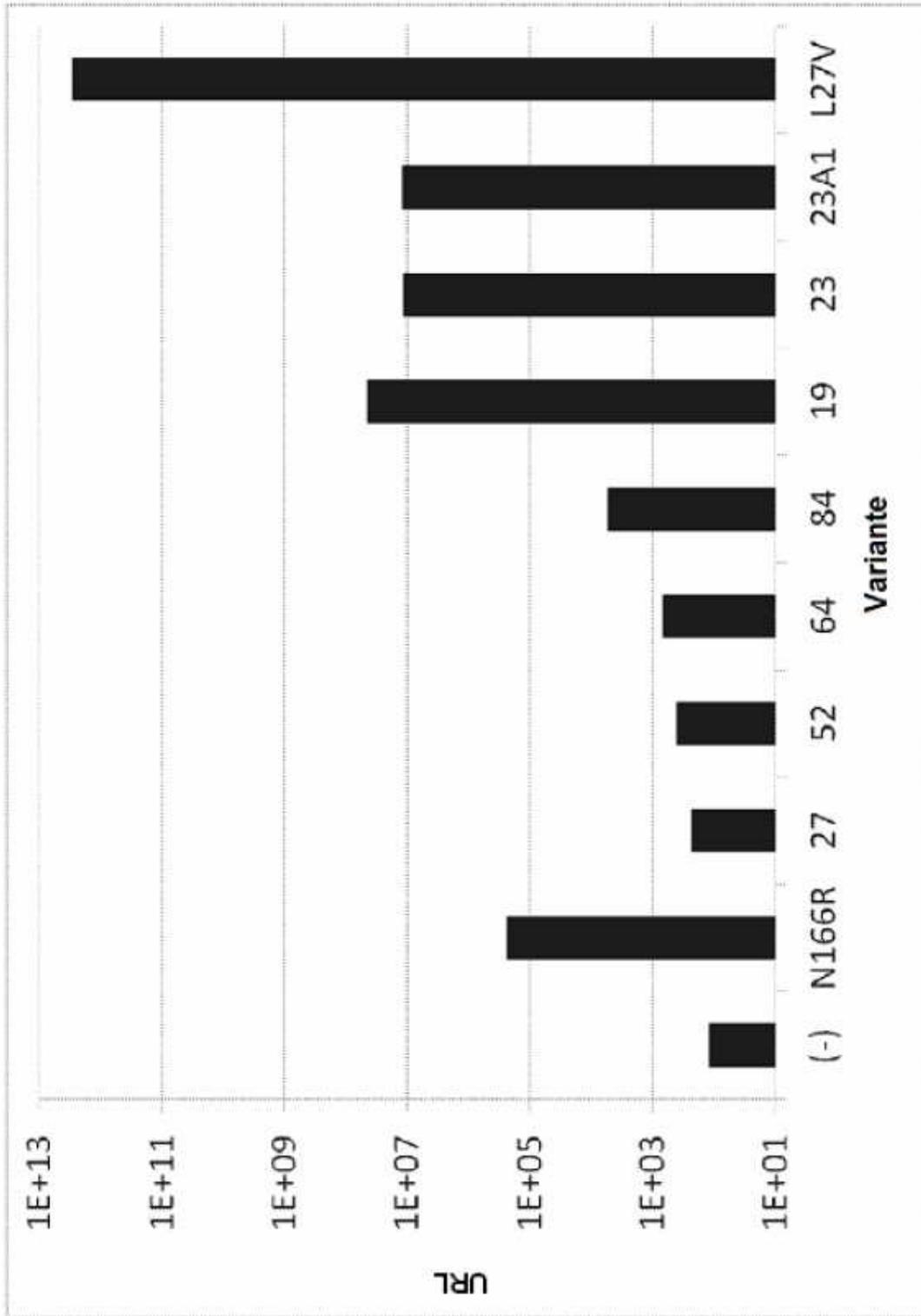


FIG. 31

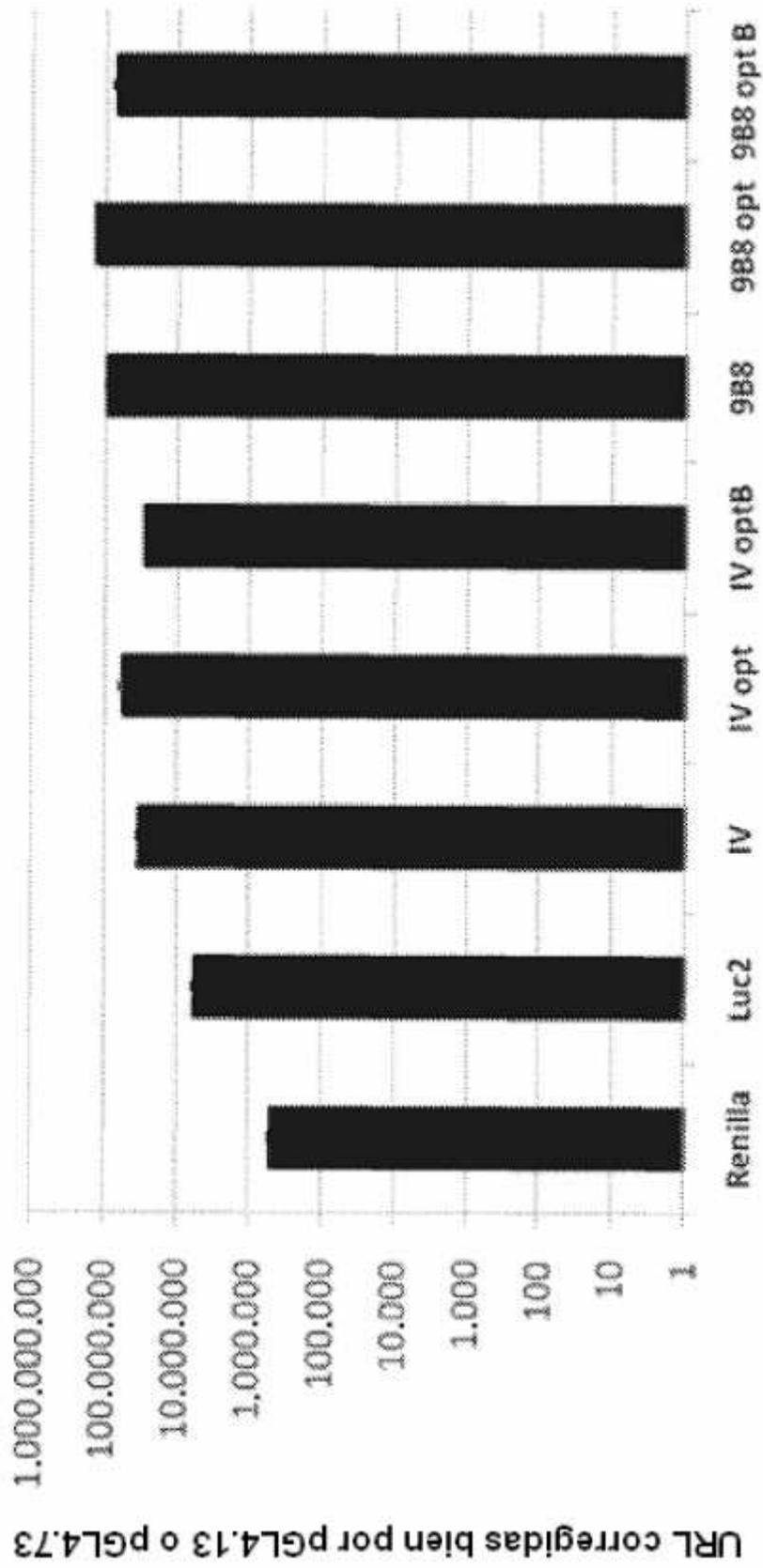


FIG. 32

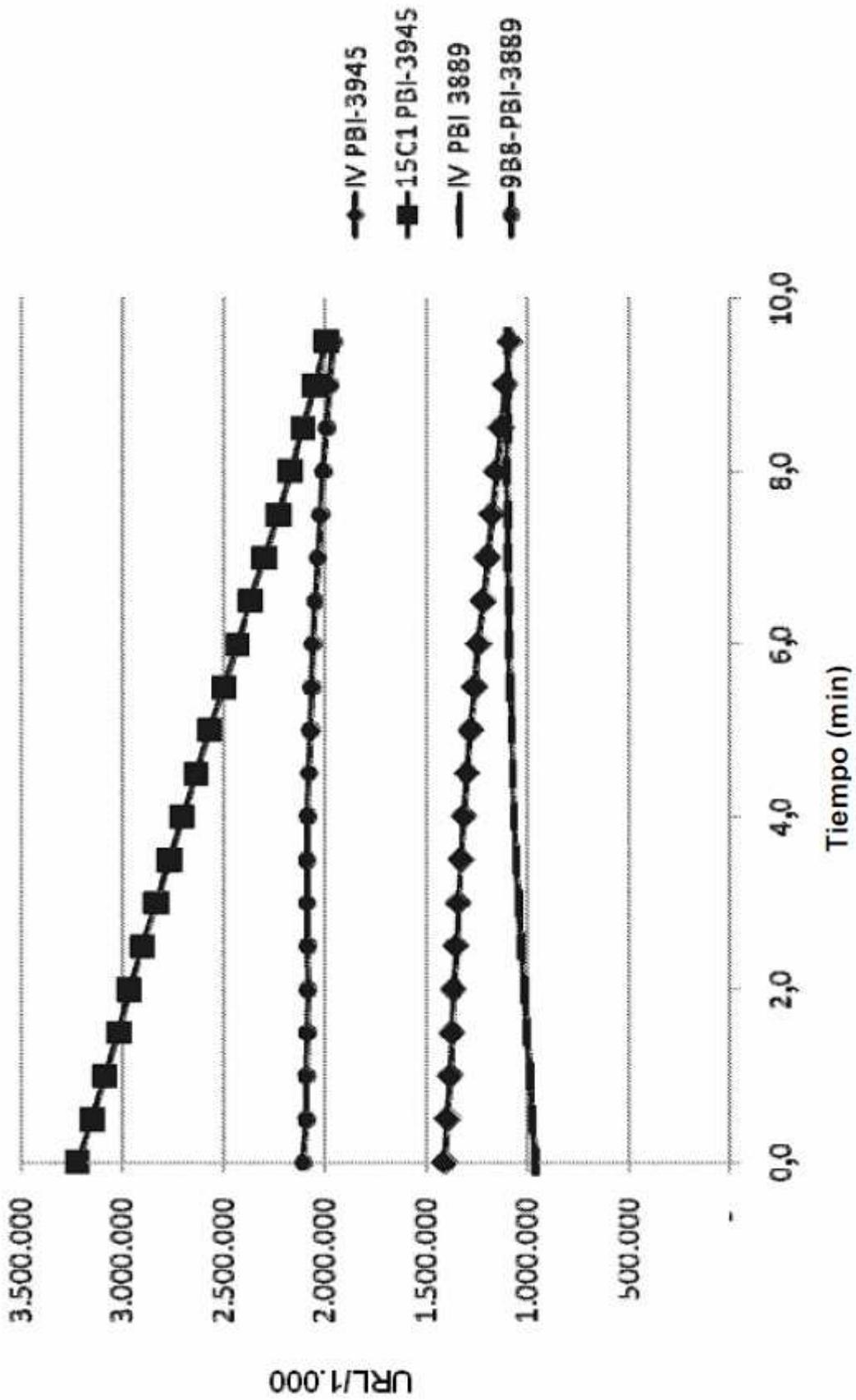


FIG. 33

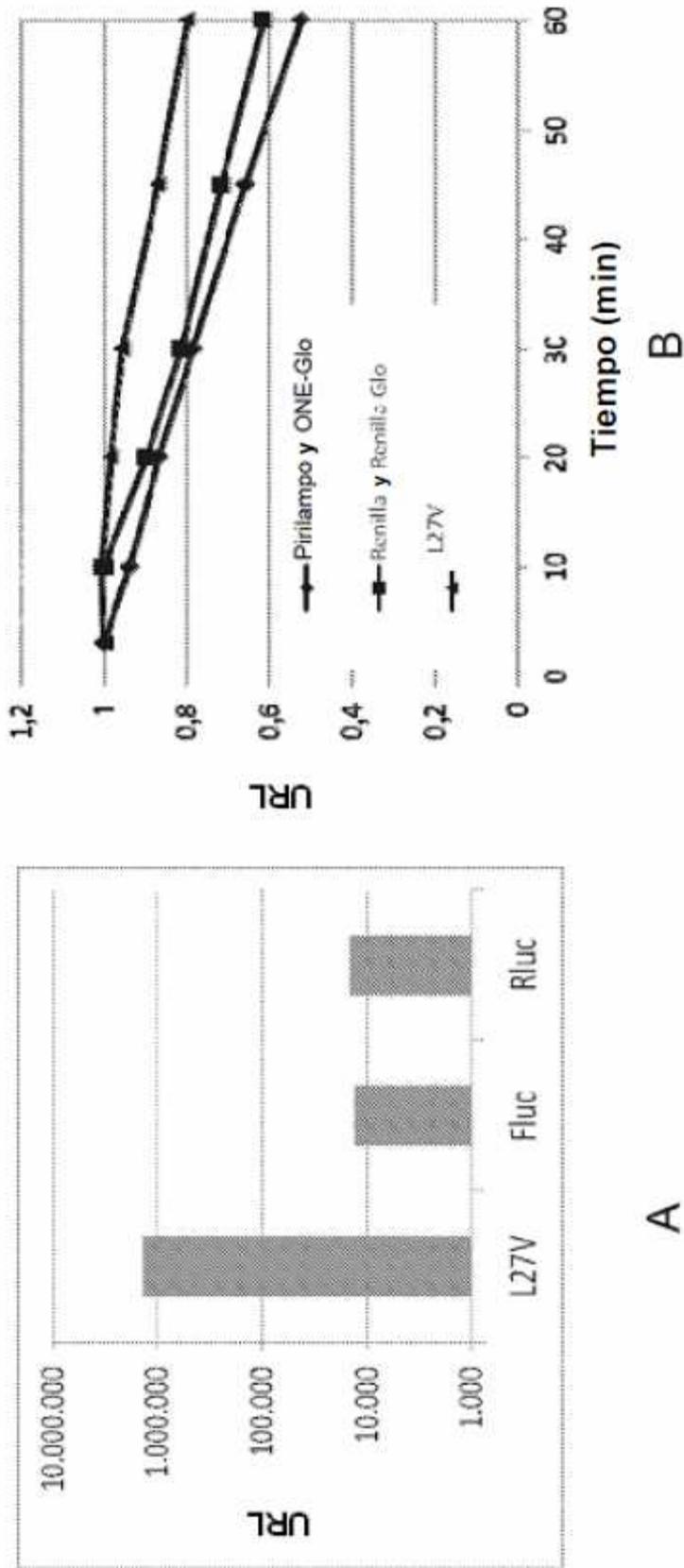


FIG. 34

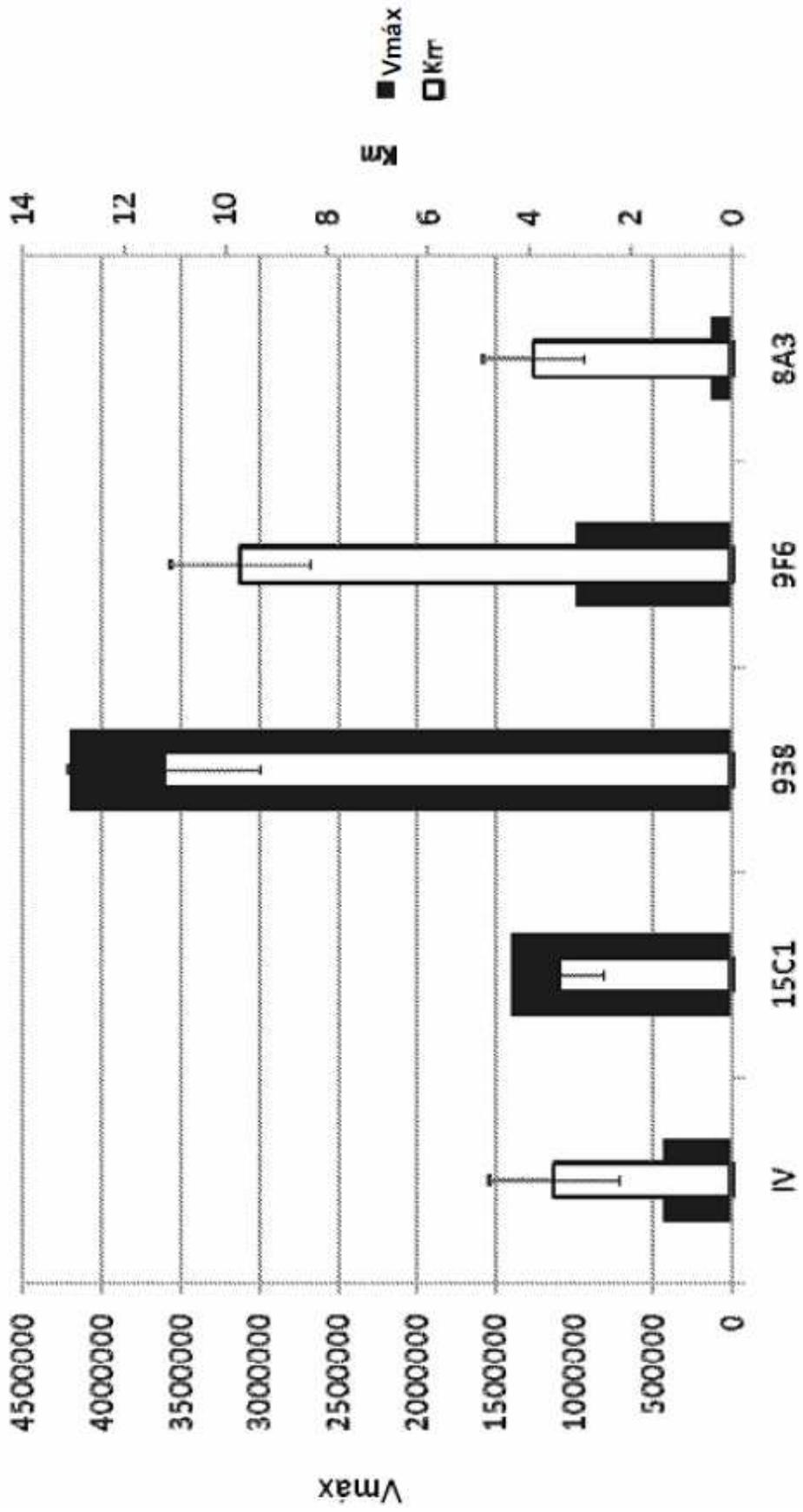
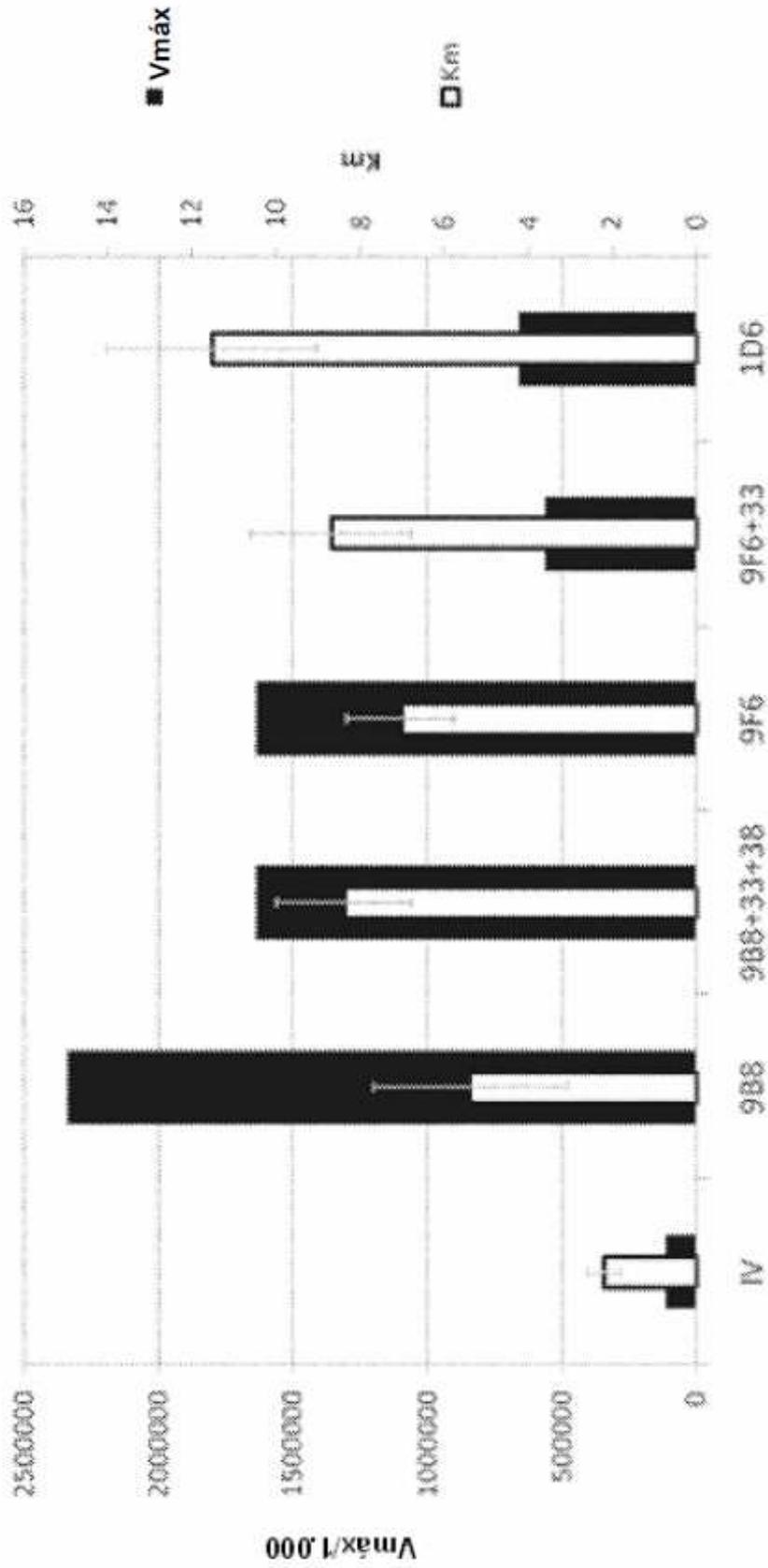
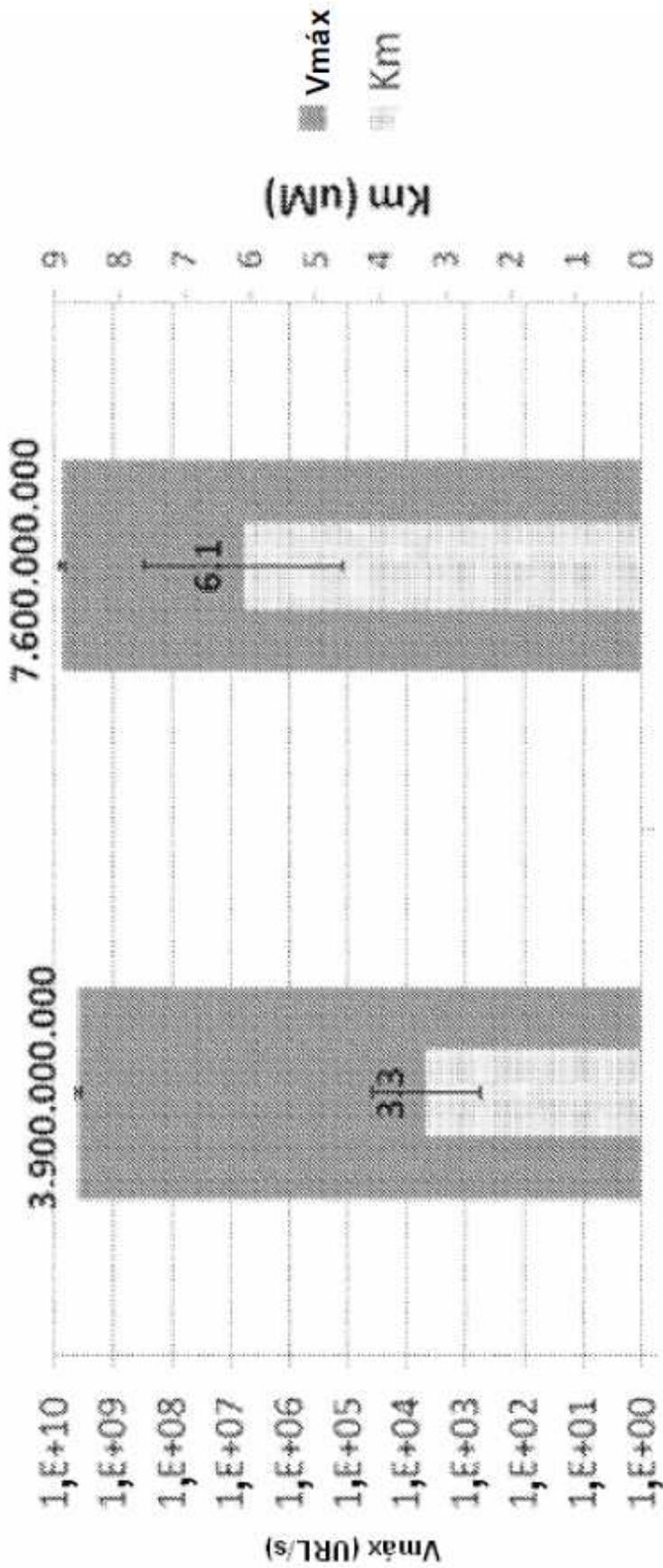


FIG. 35



La posición 33 es K33N
 La posición 38 es V38I

FIG. 36



9B8 opt 9B8 opt+K33N

FIG. 37

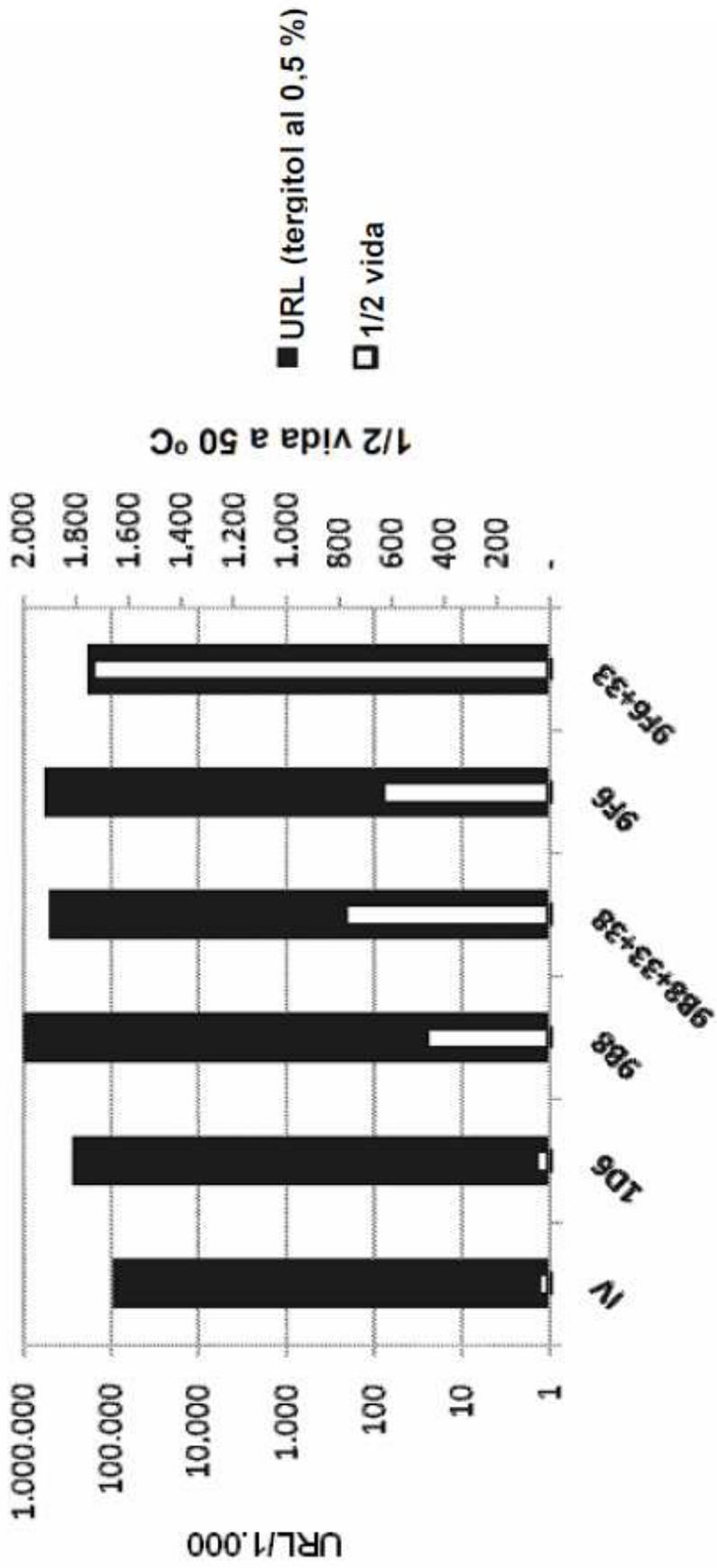


FIG. 38

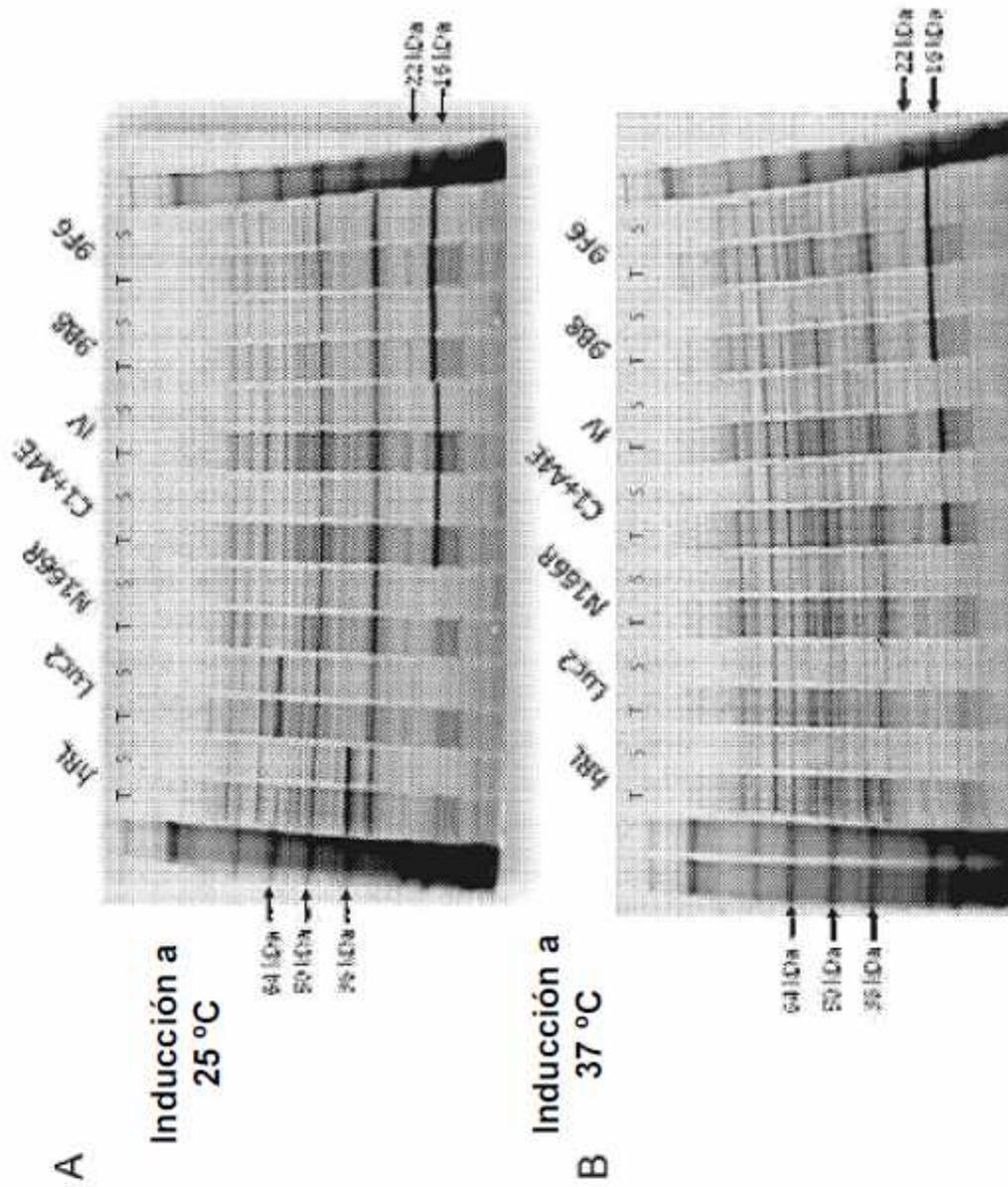


FIG. 39

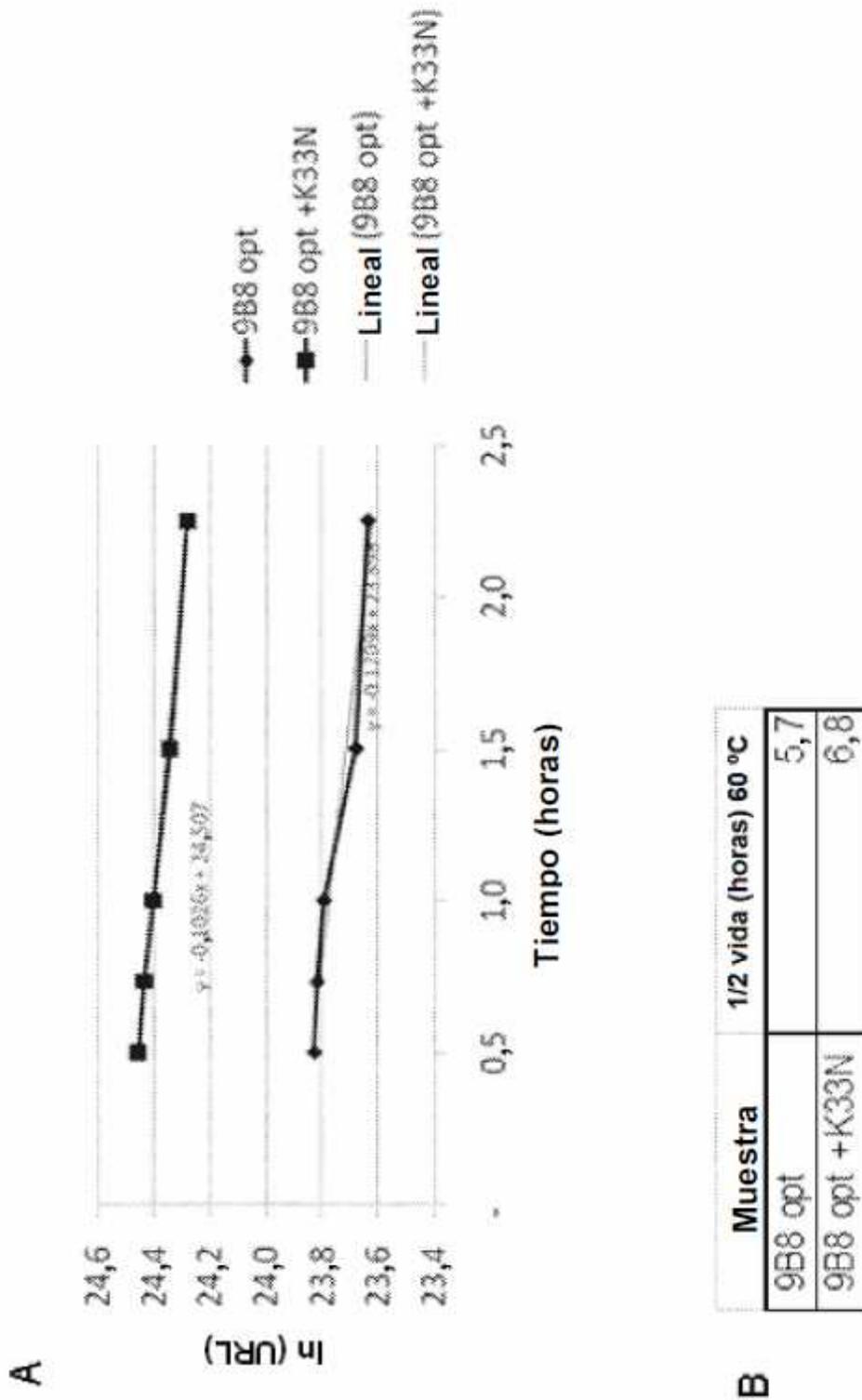


FIG. 40

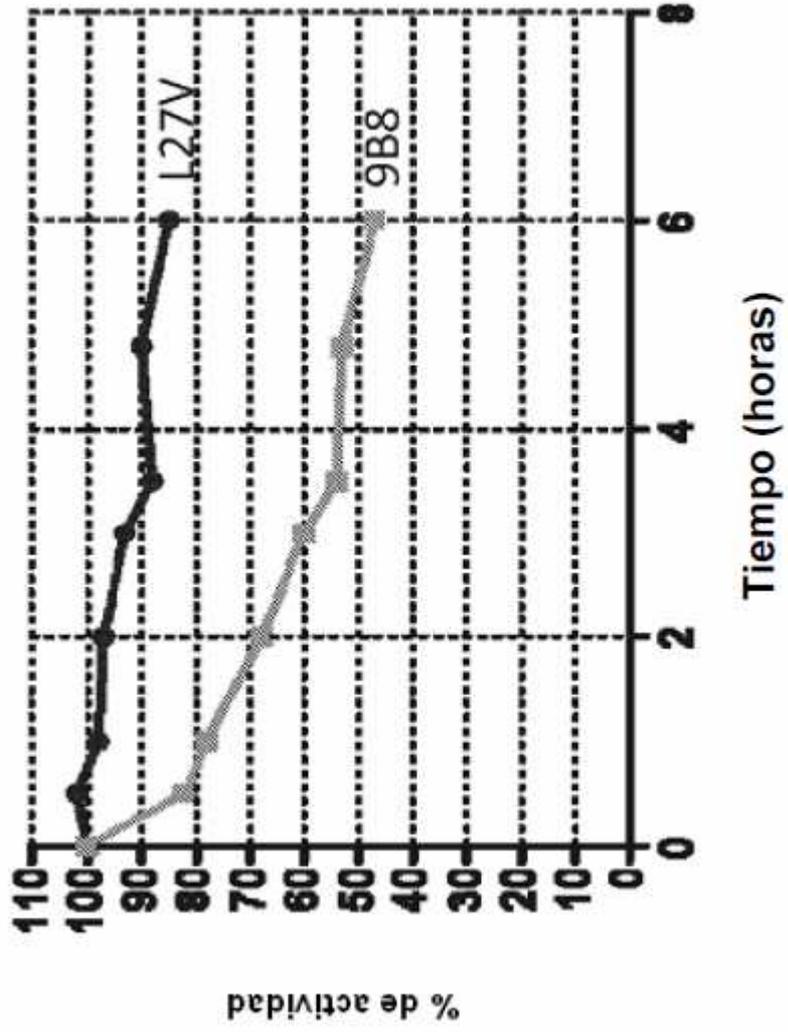


FIG. 41

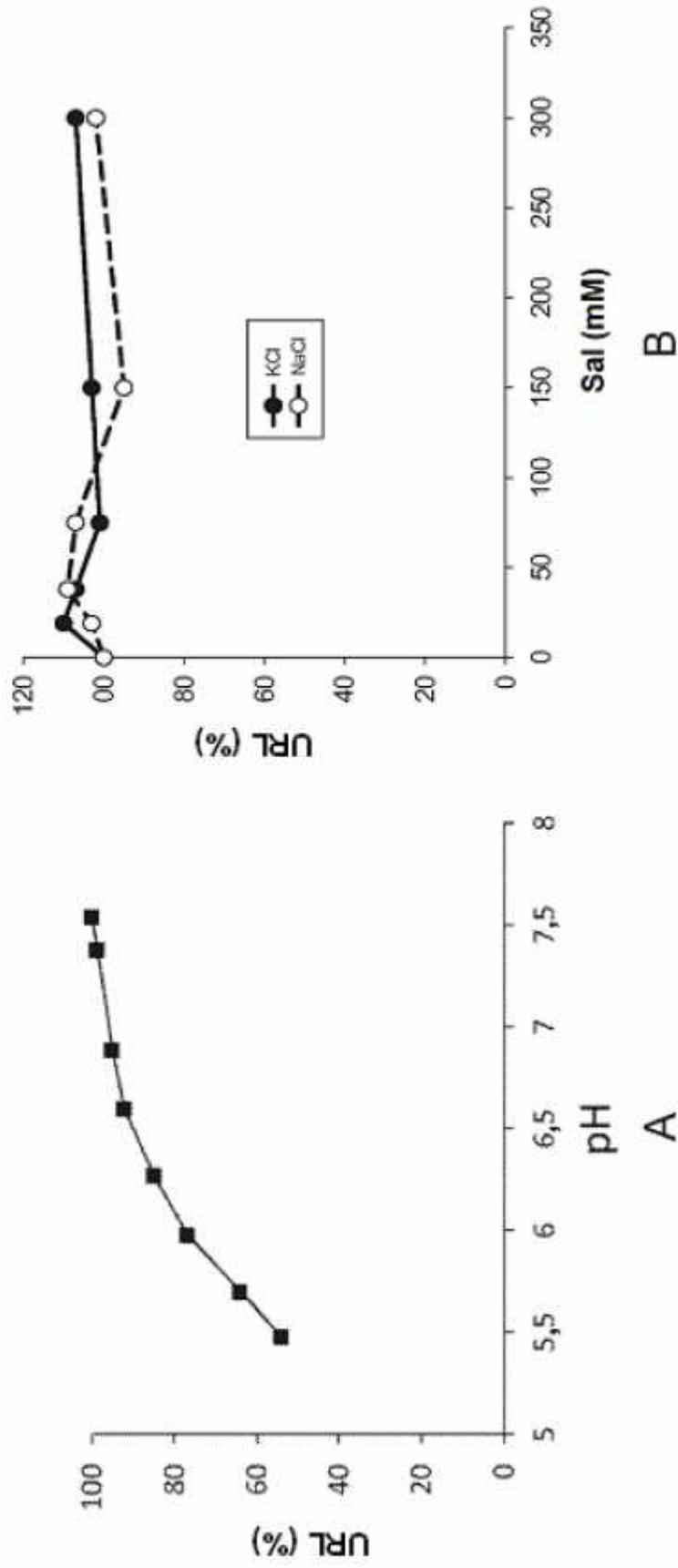


FIG. 42

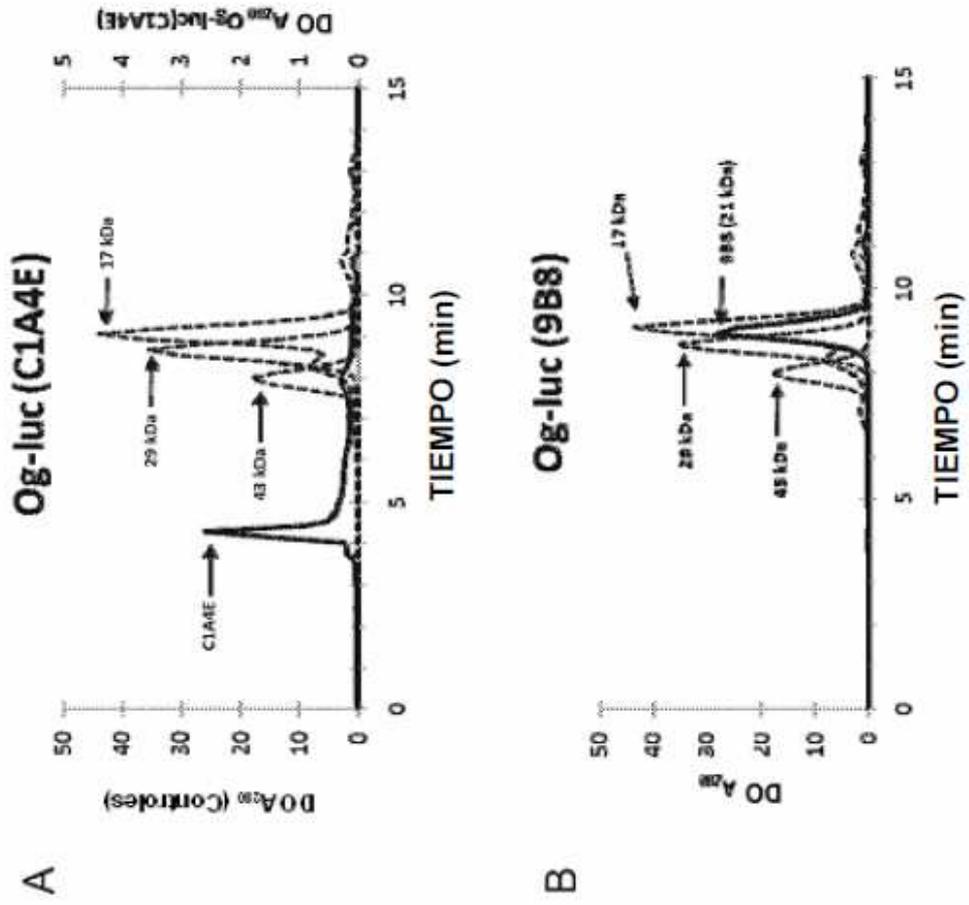


FIG. 43

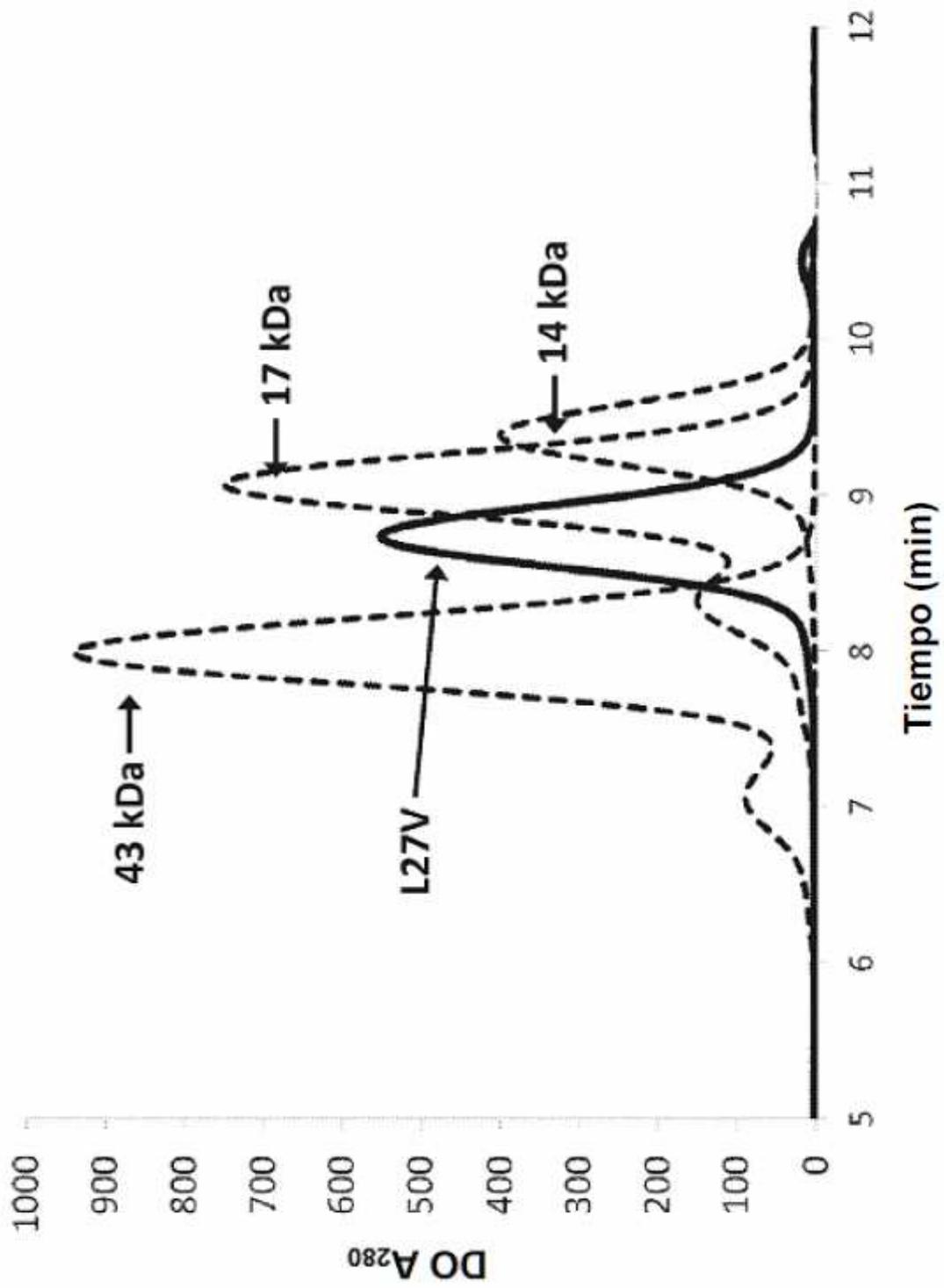


FIG. 44

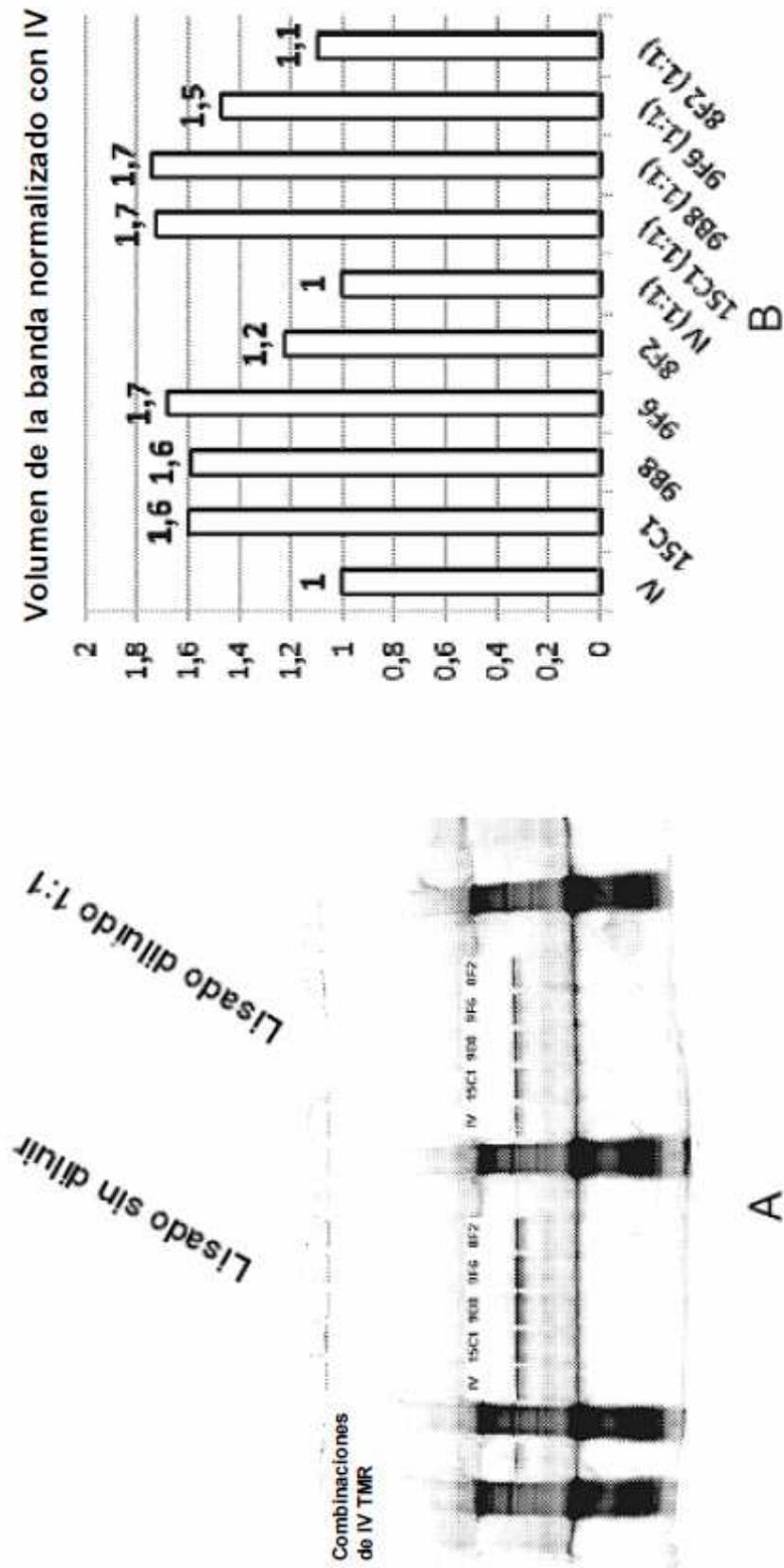


FIG. 45

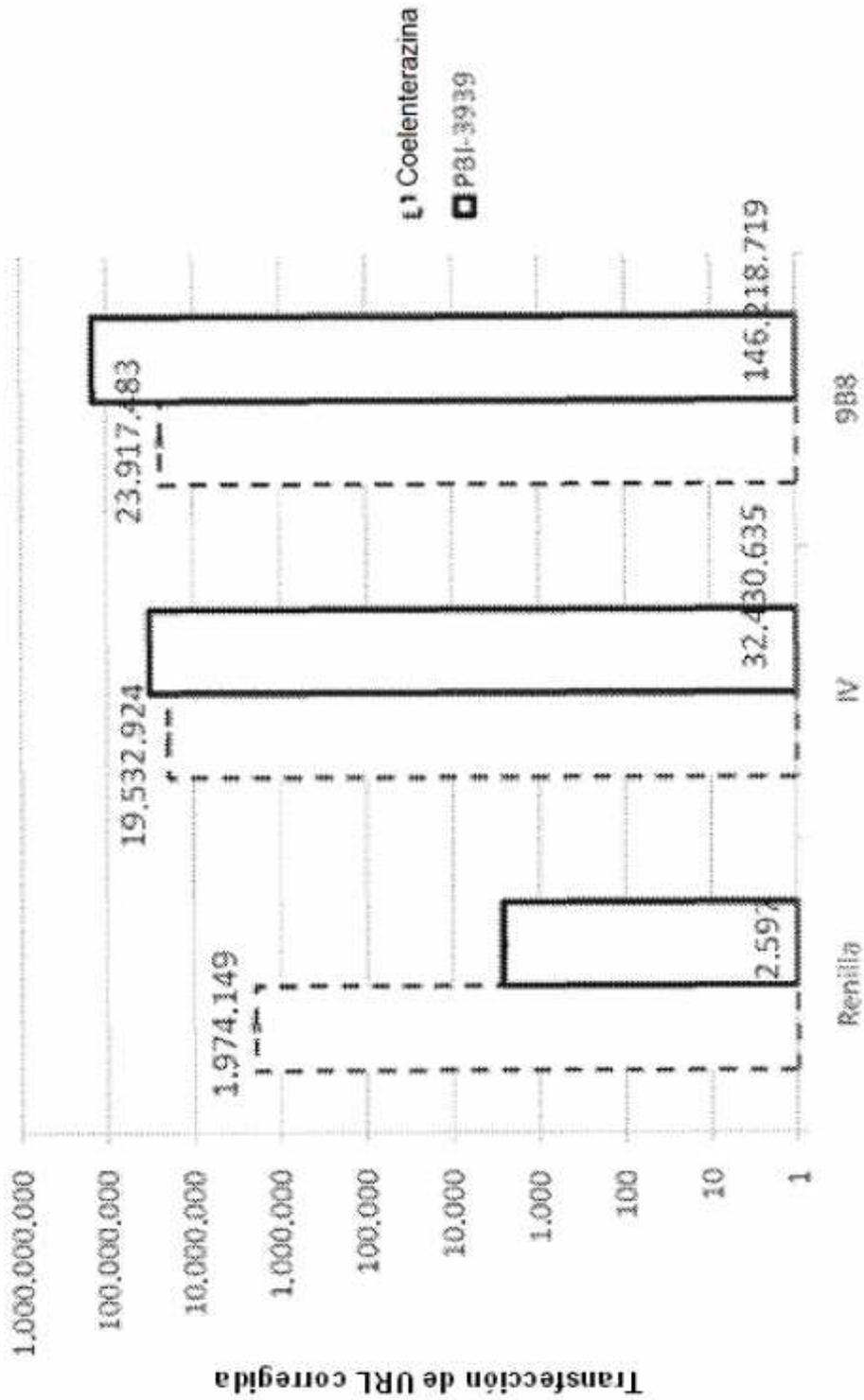


FIG. 47

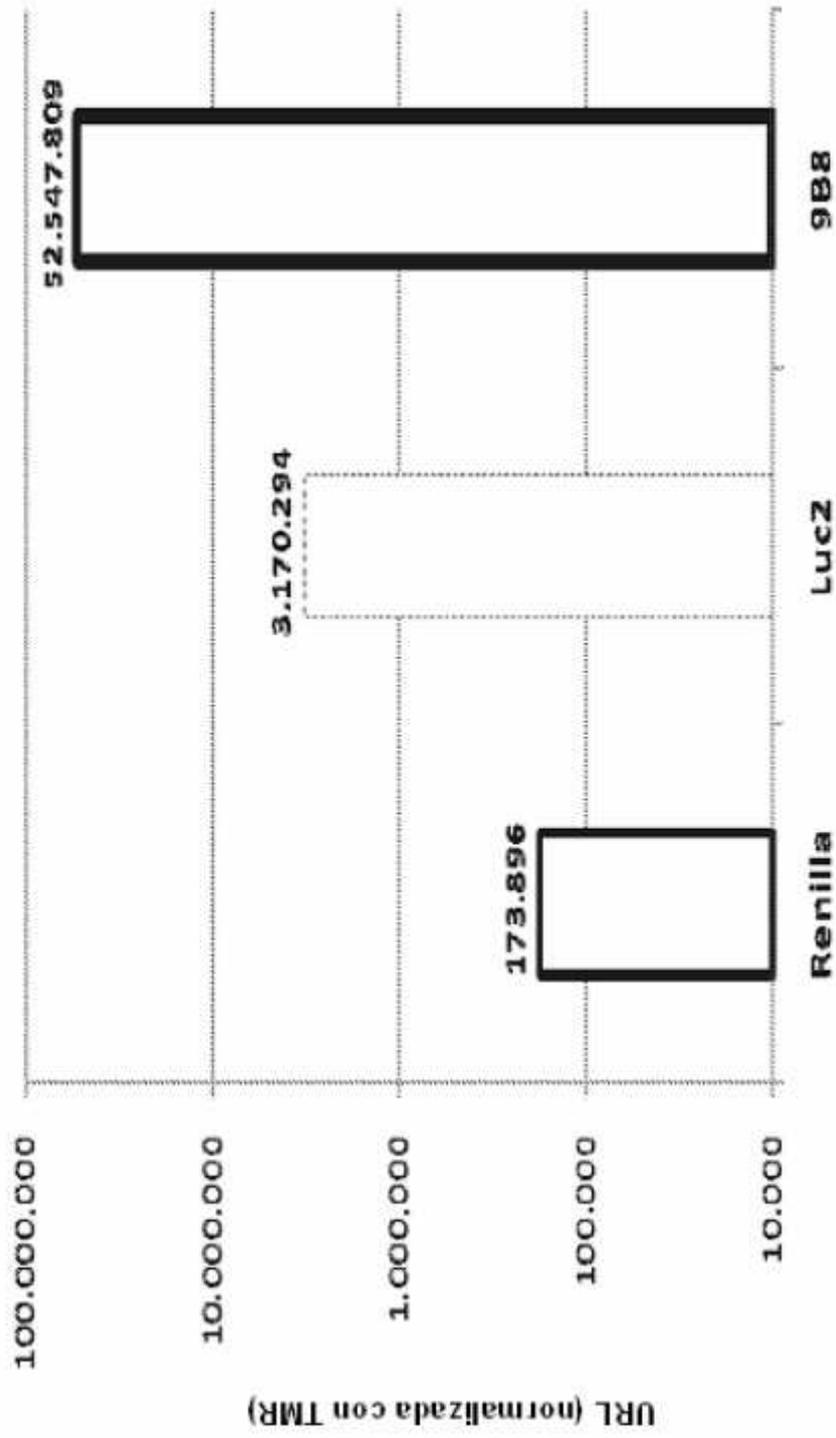
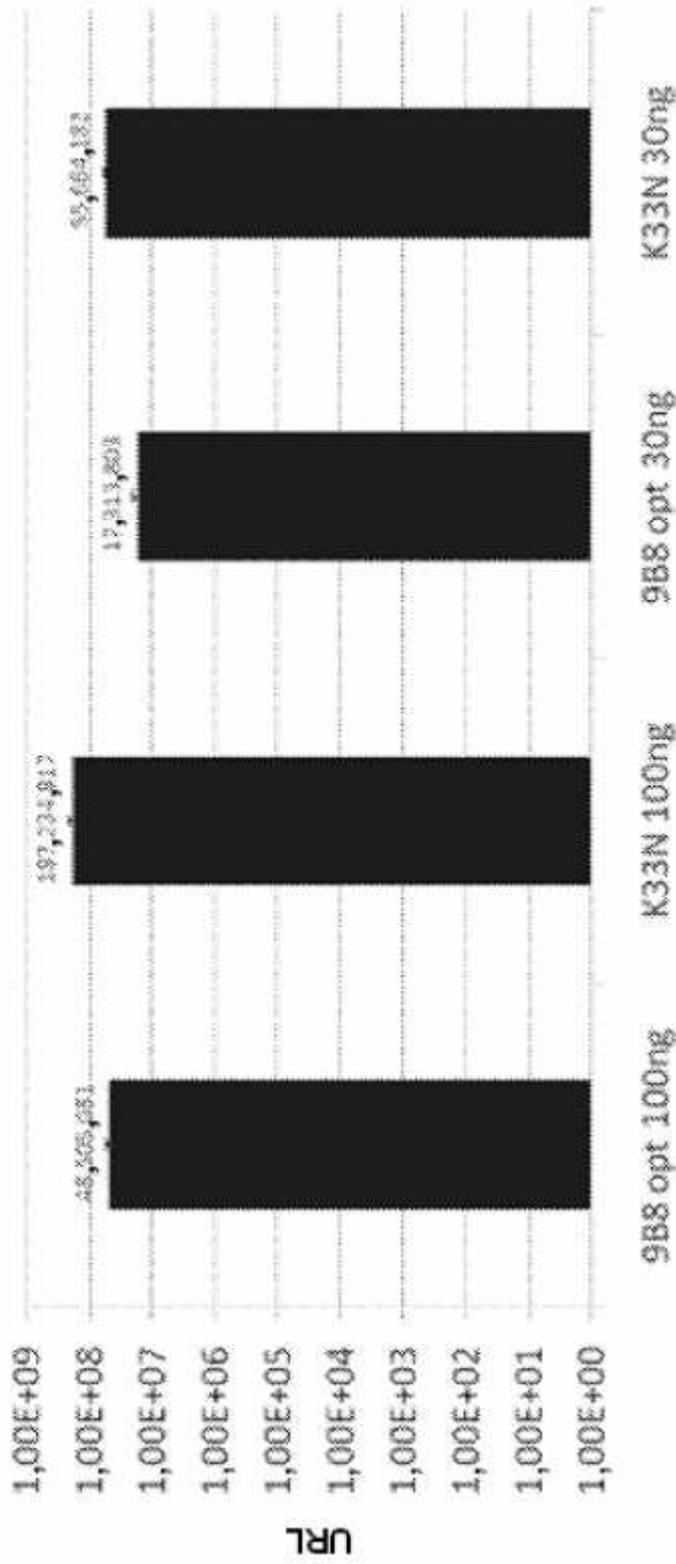


FIG. 48



Variante (cantidad de ADN usada en la transfección)

FIG. 49

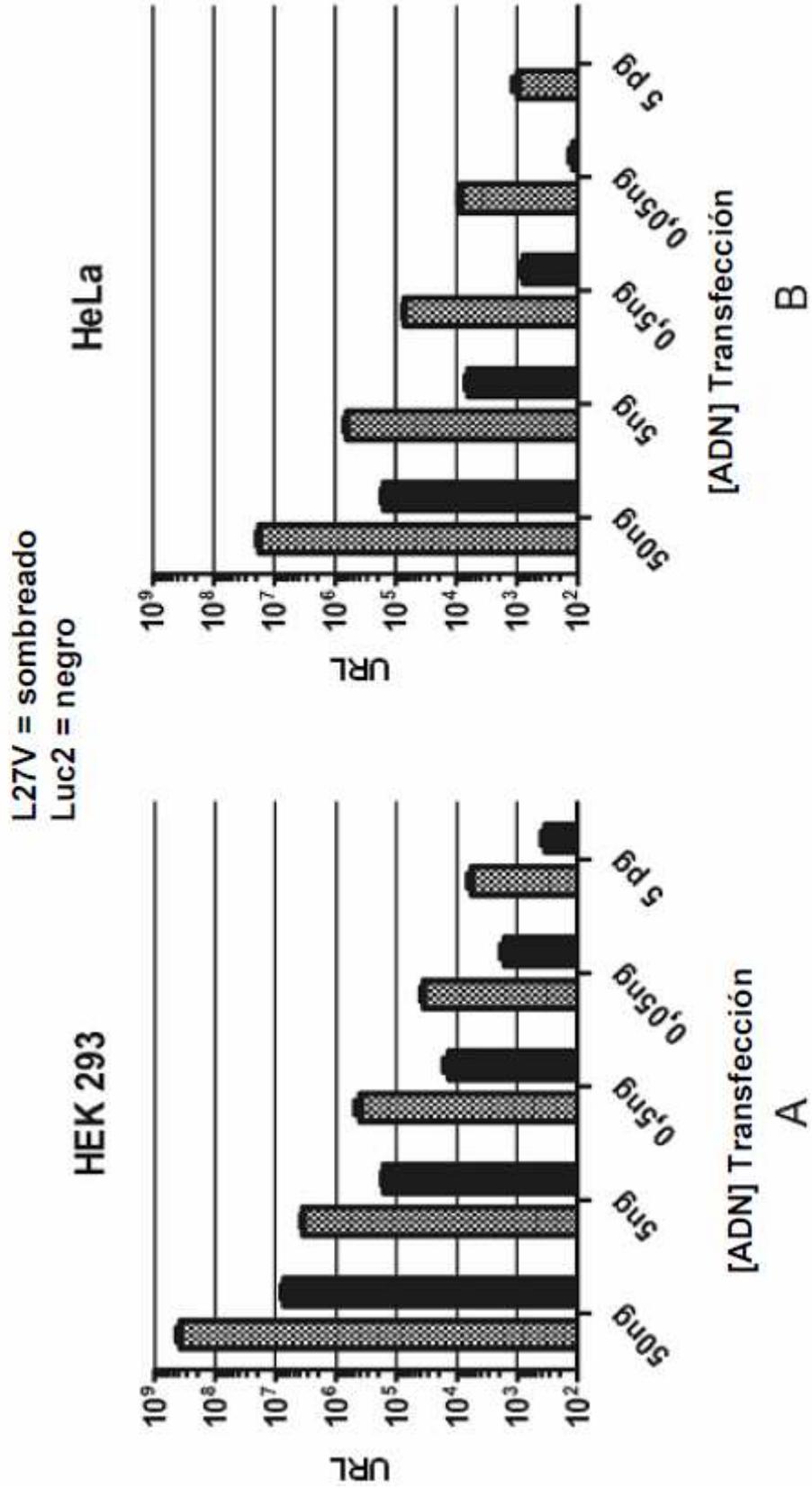


FIG. 50

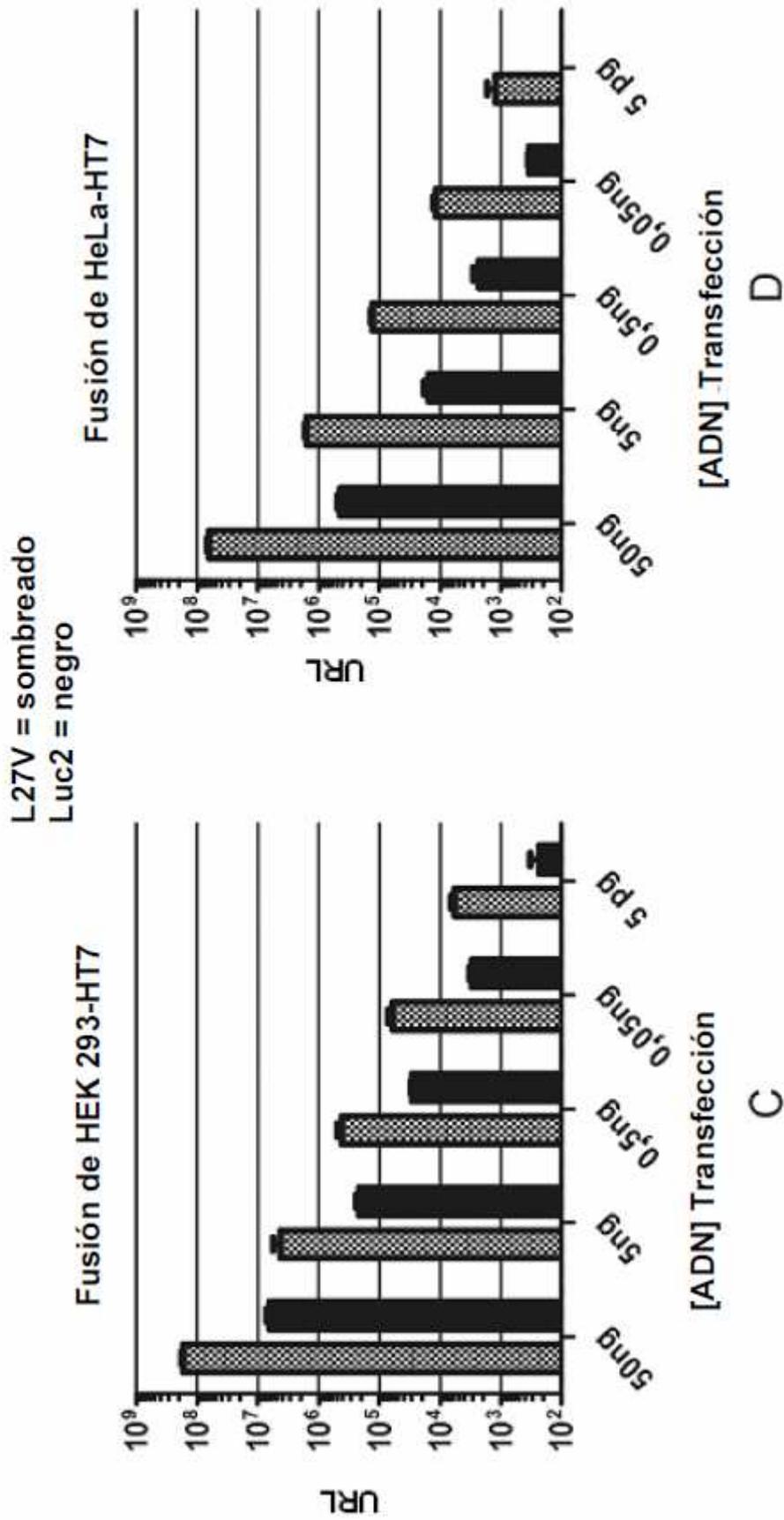


FIG. 50

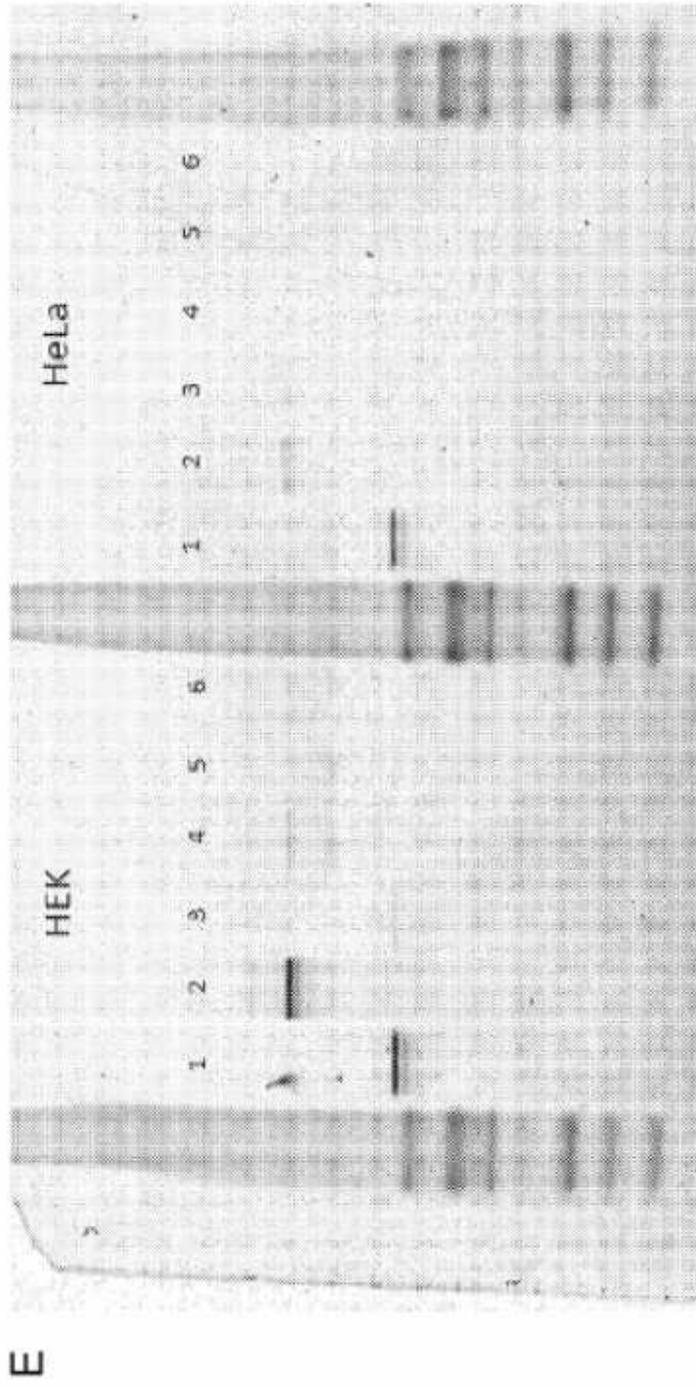


FIG. 50

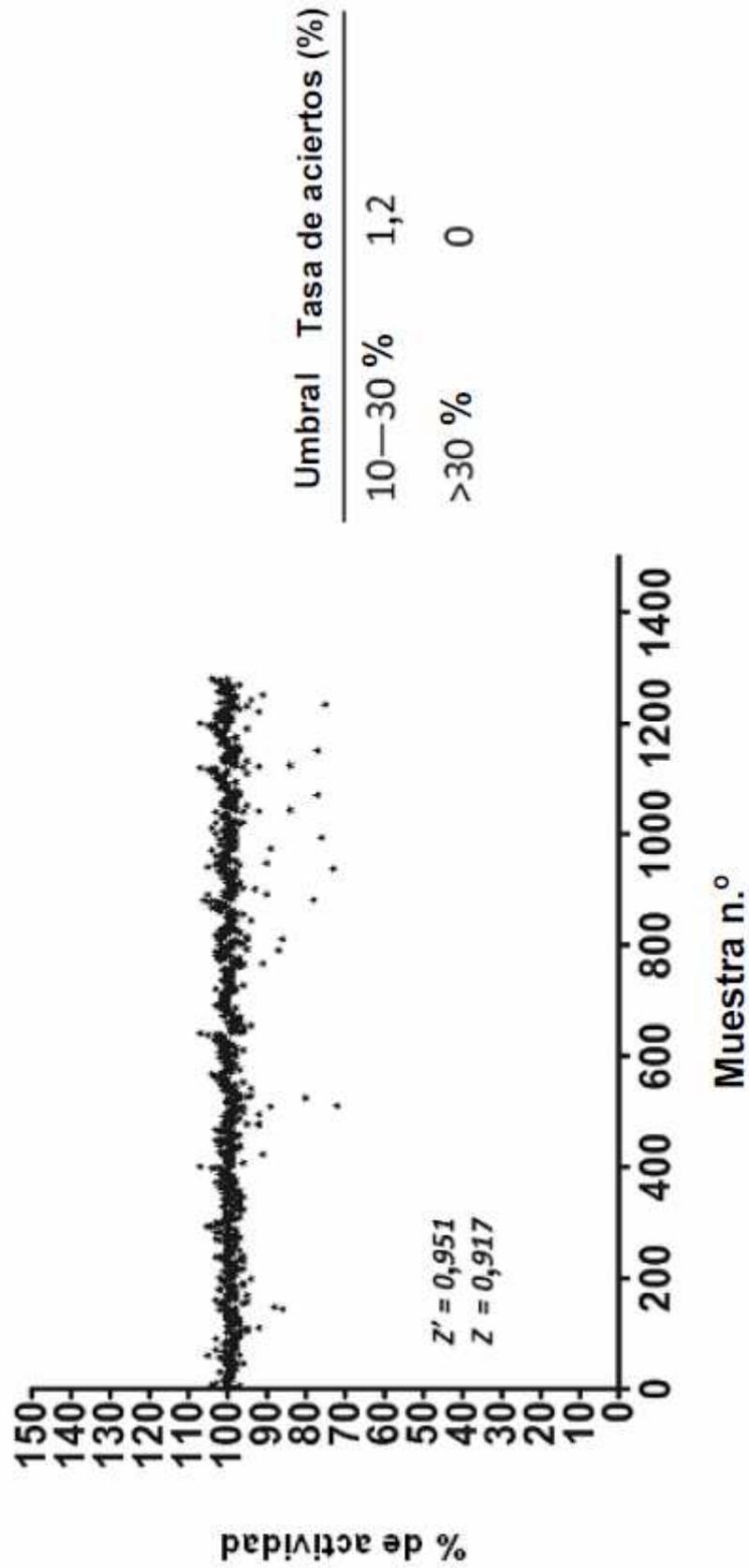


FIG. 51

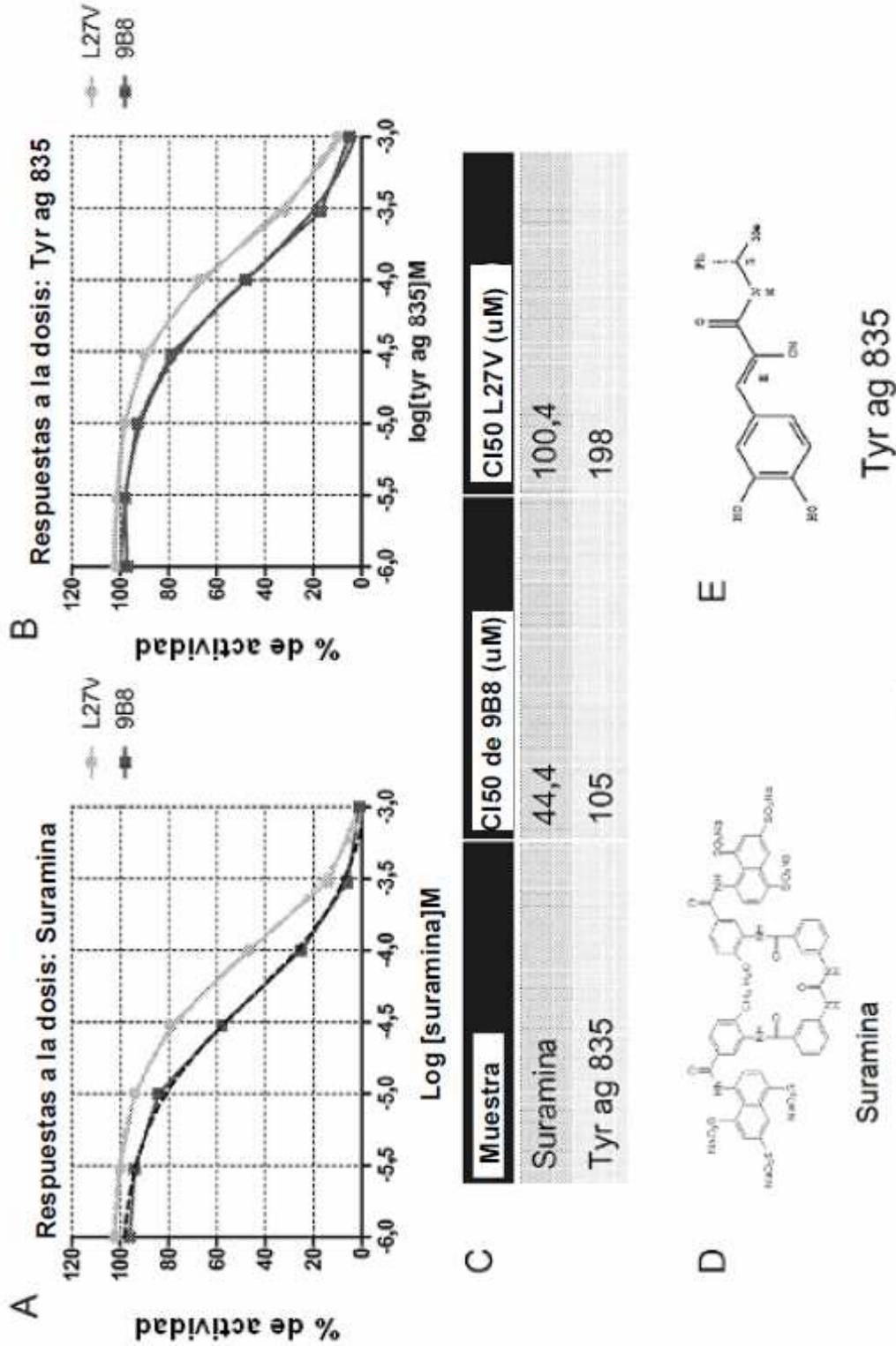


FIG. 52

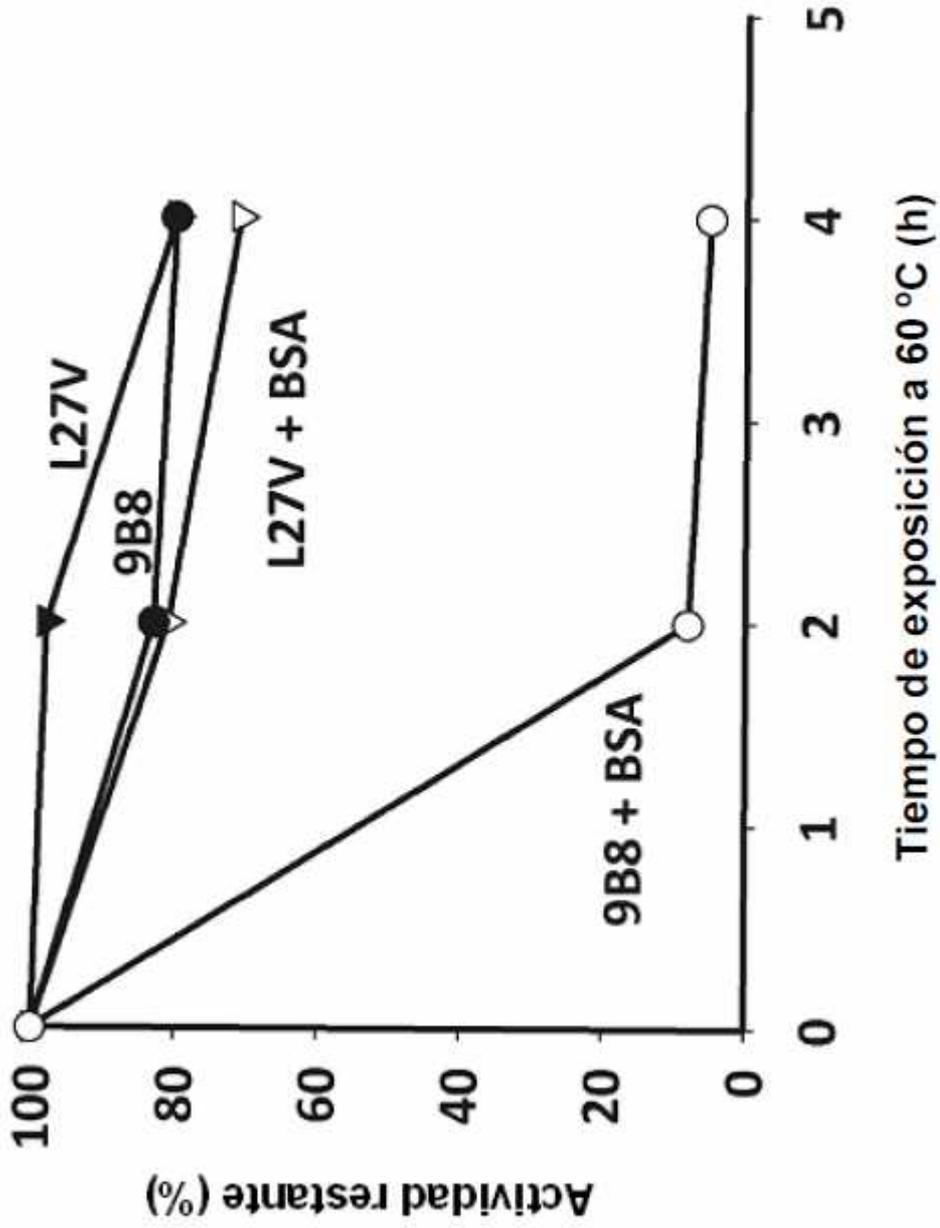


FIG. 53

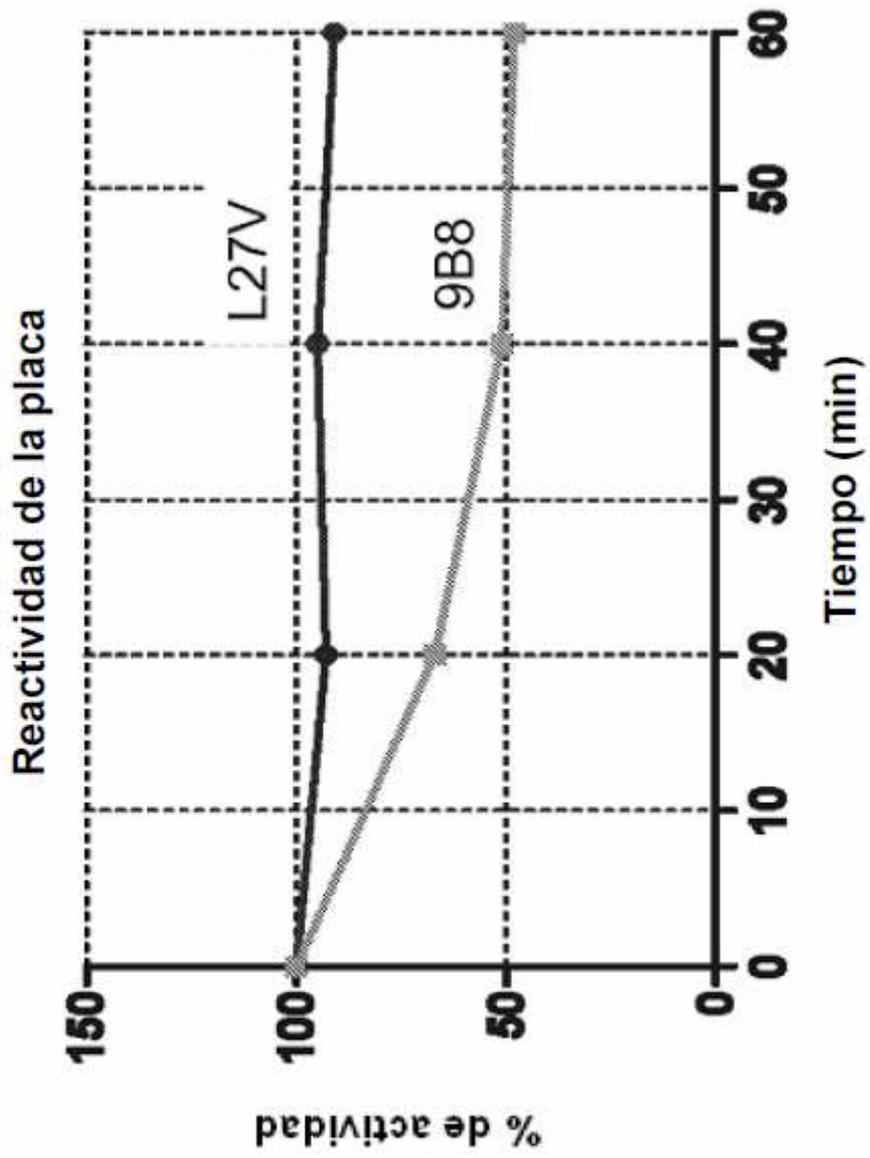


FIG. 54

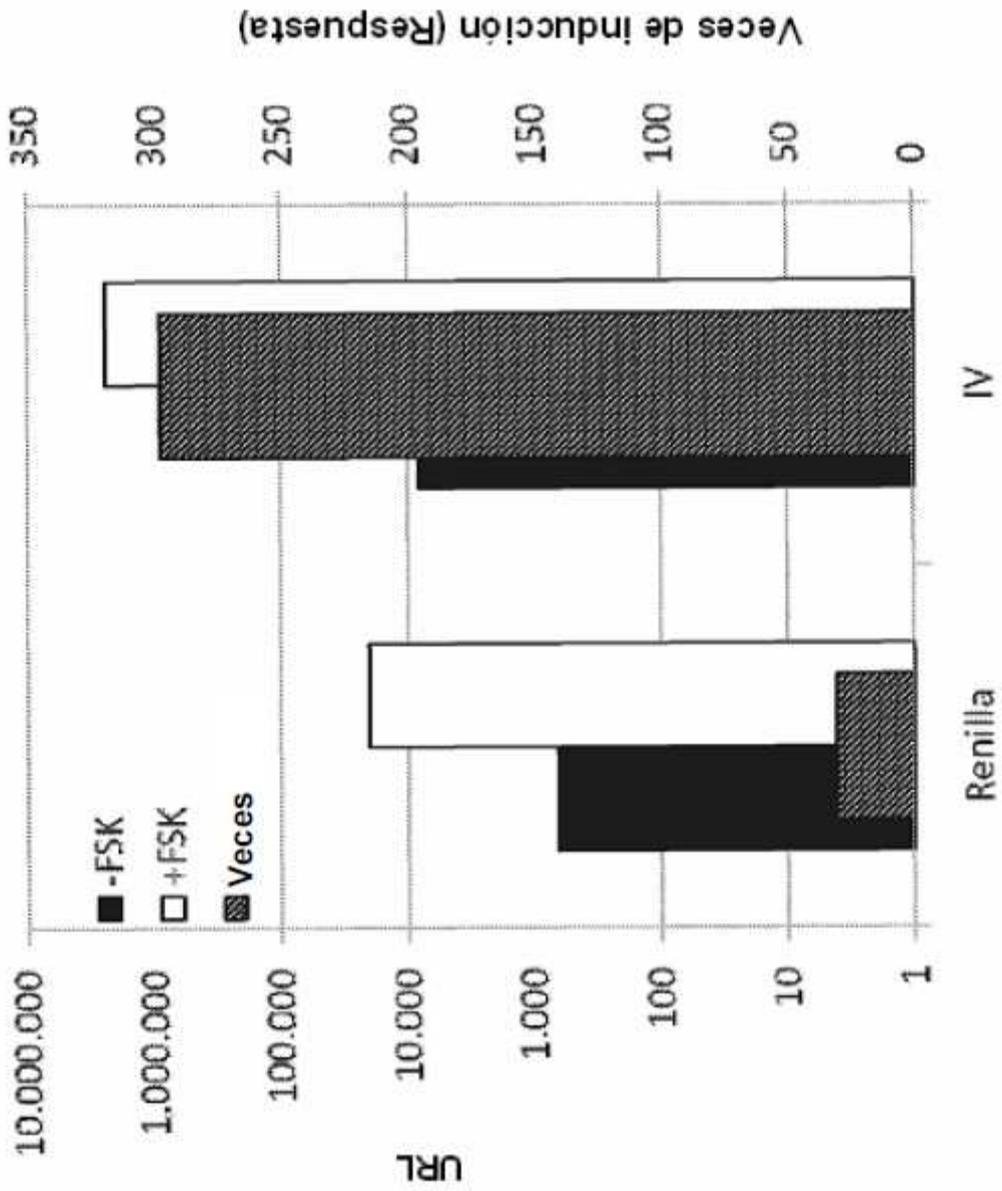


FIG. 55

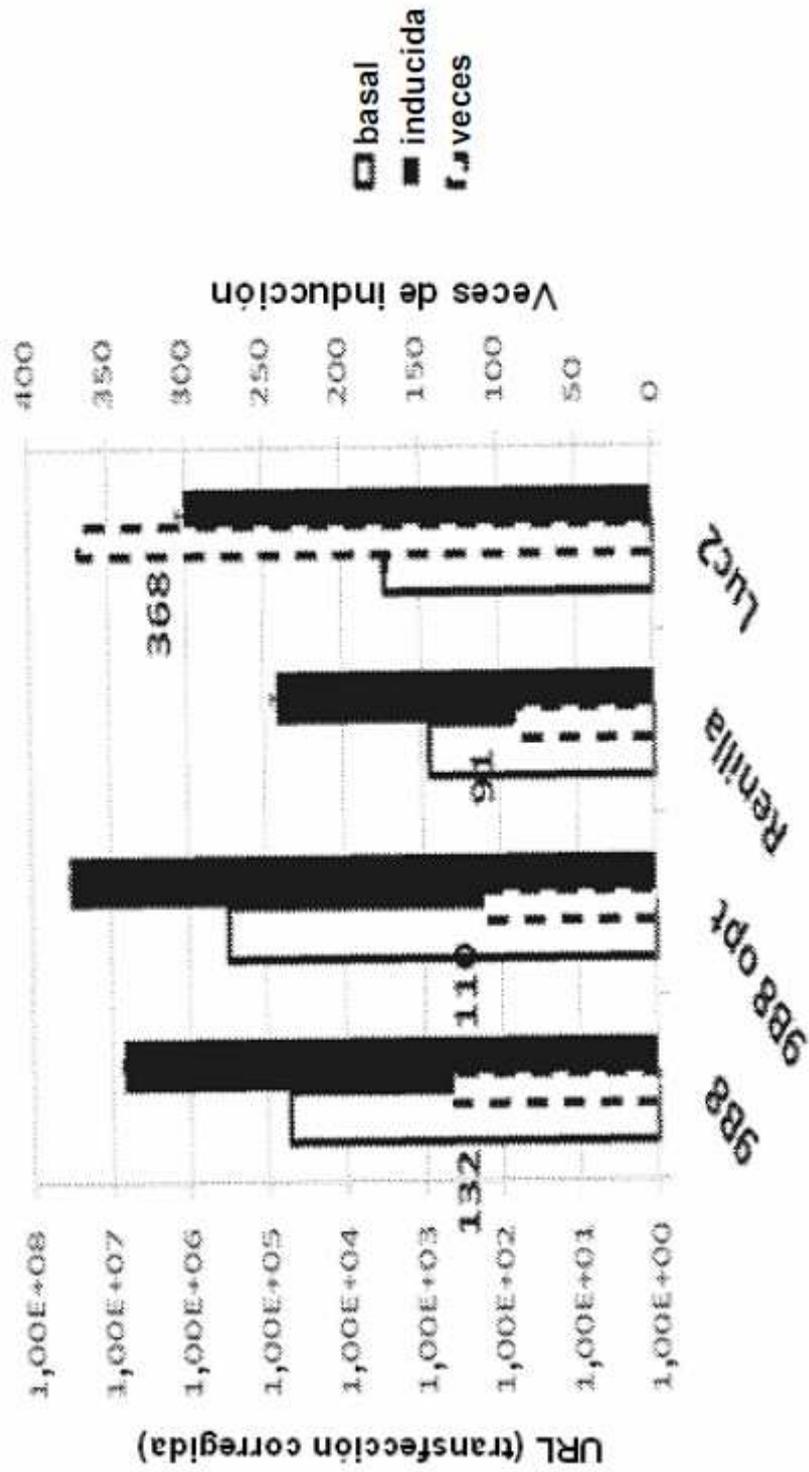
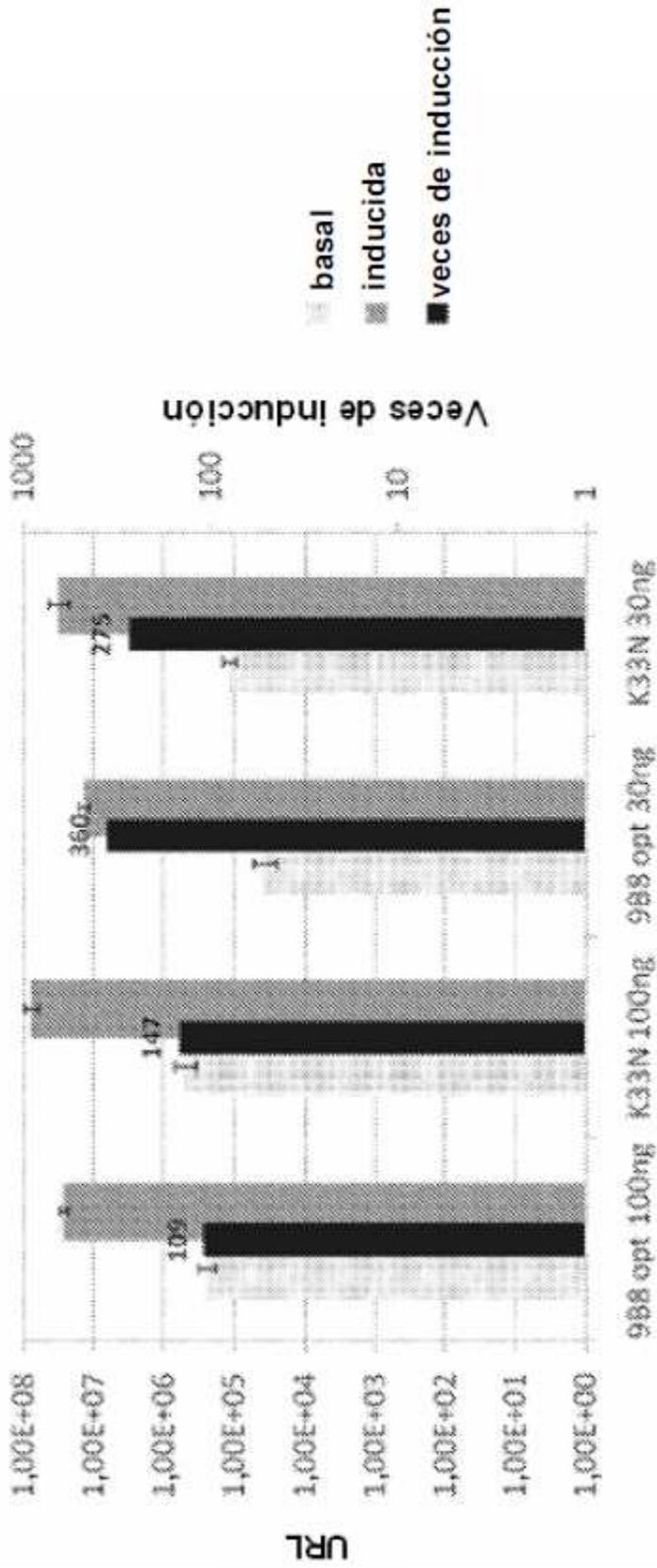


FIG. 56



Variante (cantidad de ADN usada en la transfección)

FIG. 57

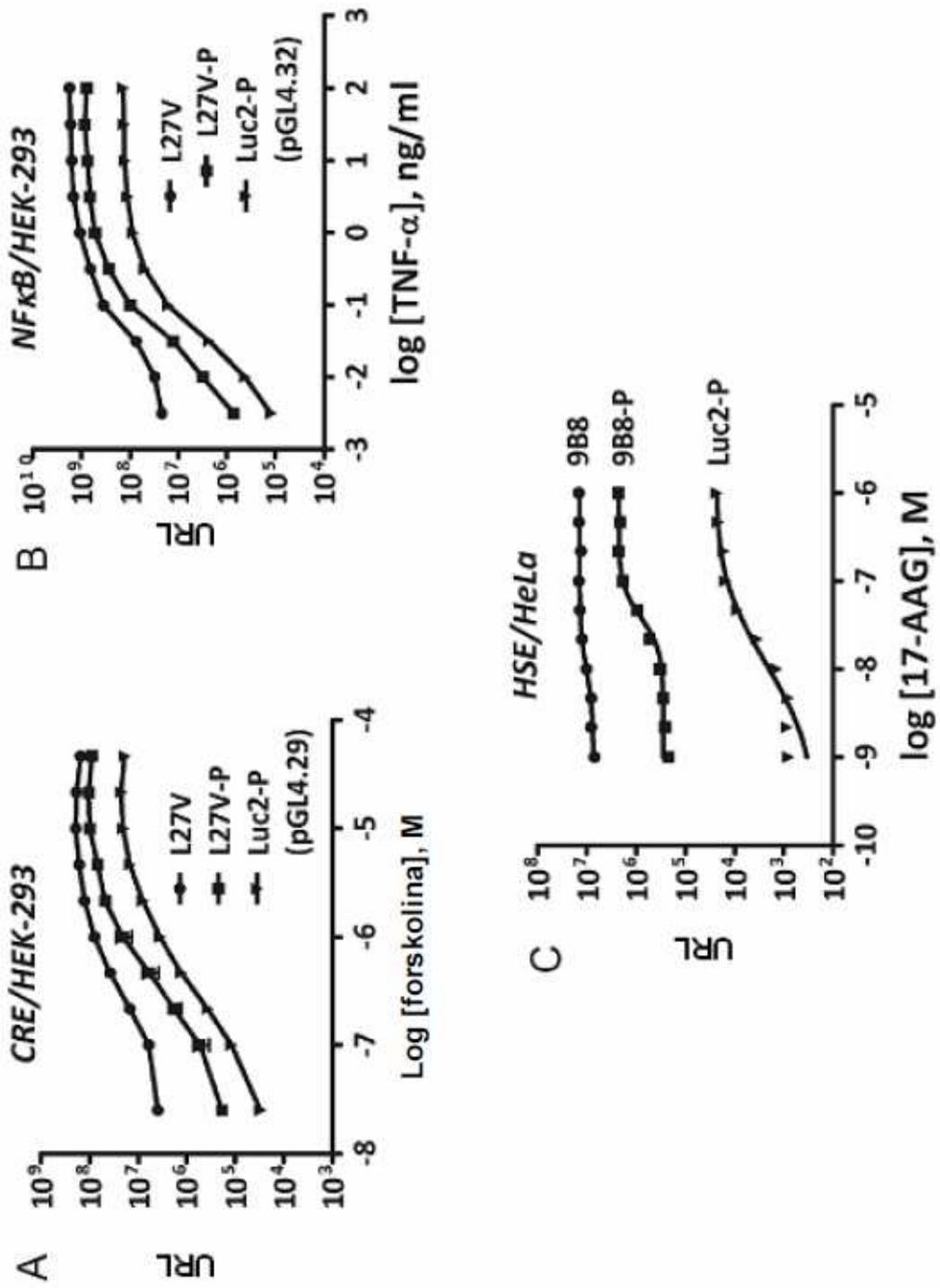


FIG. 58

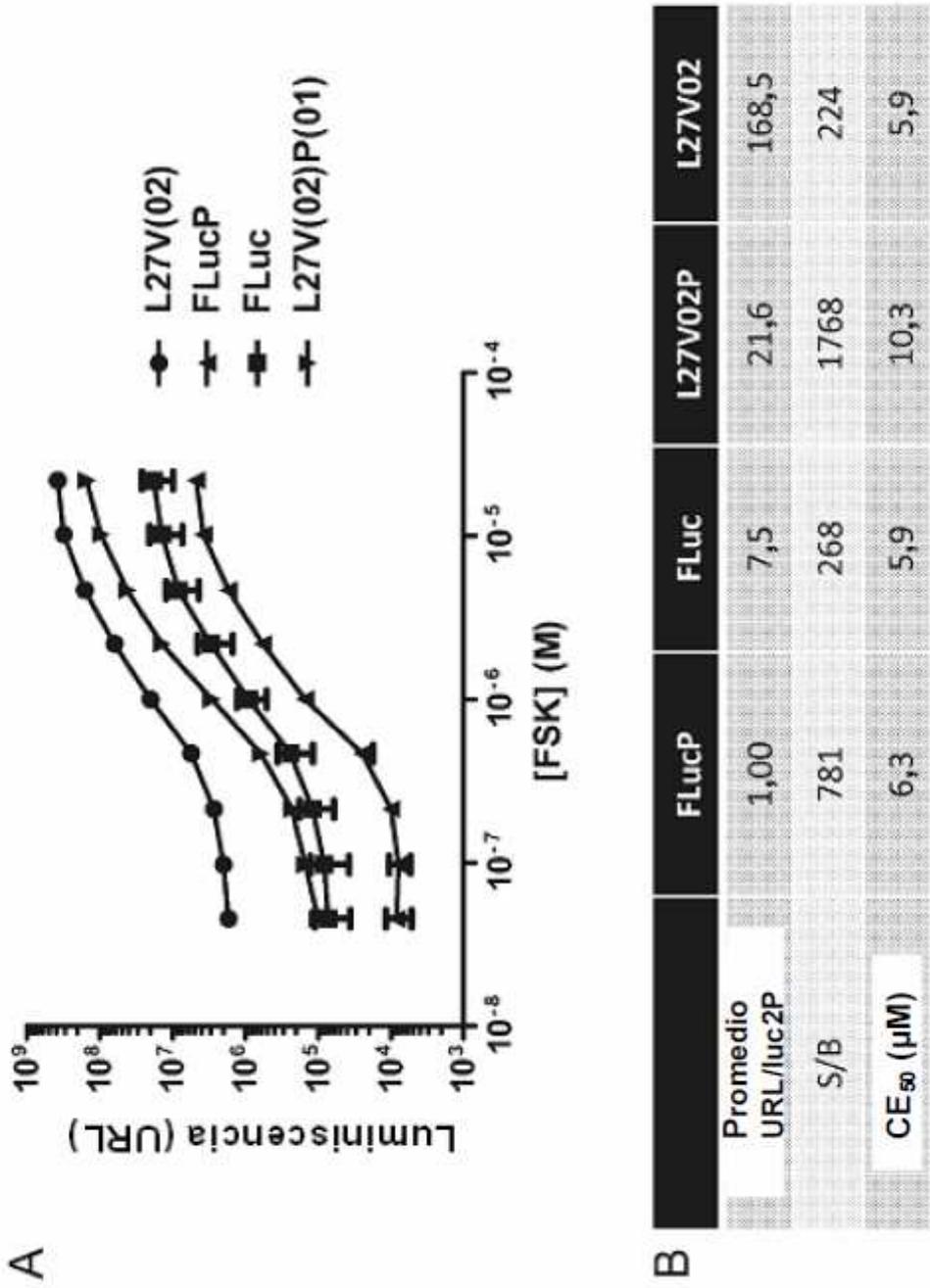


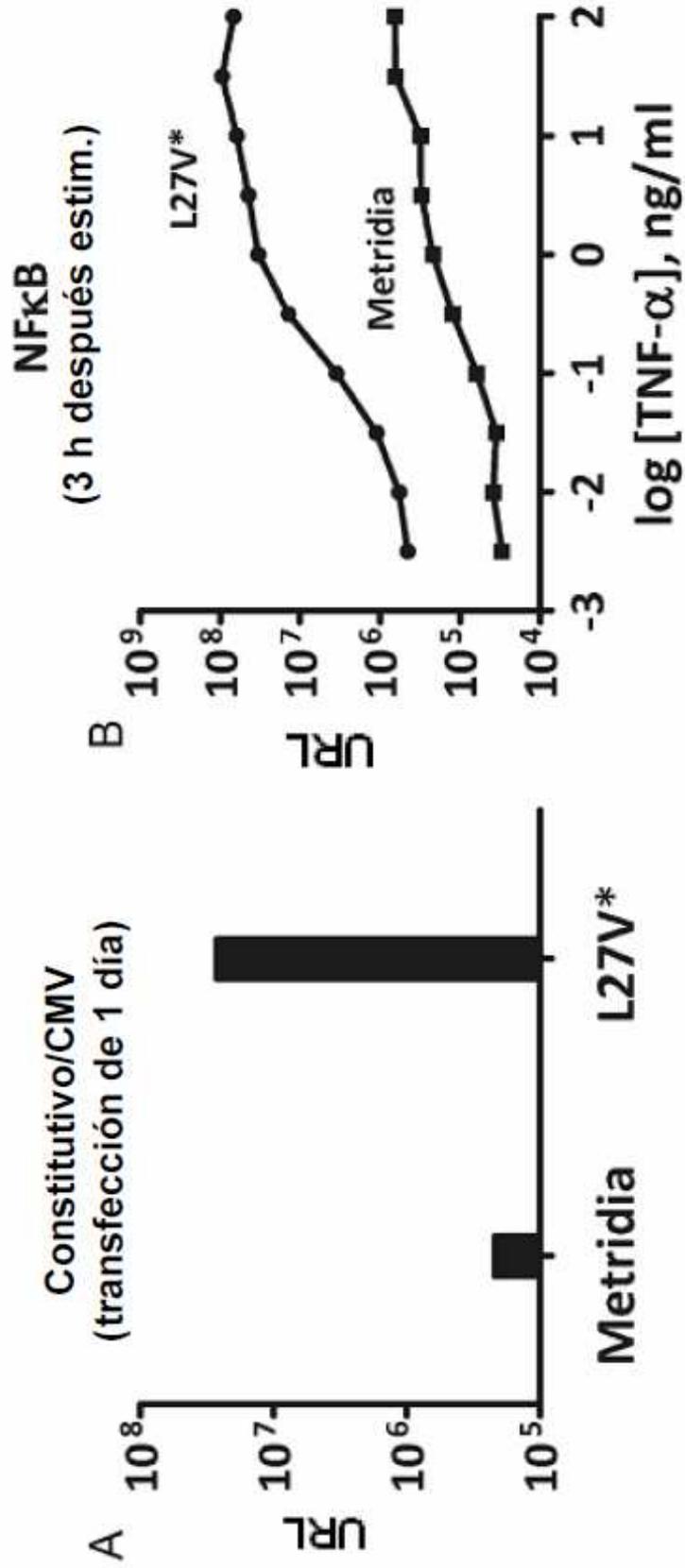
FIG. 59

C

Sistema de Exp	URL Oluc/FLuc	URL OLucP/FLucP	S/B, Oluc	S/B, OLucP	S/B, FLuc	S/B, FLucP
293/CRE	22	22	224	1768	268	781
293/NFkB	75	8	22	514	233	347
Hela/NFkB	14	2	40	47	54	44
HepG2/NFkB	267	5	7	11	11	19
Jurkat/NFkB	16	6	18	15	6	11
Jurkat/CRE	19	4	14	123	28	40
ME180/CRE	56	12	2	6	4	5
ME180/NFkB	149	21	7	19	7	25
HCT116/NFkB	22	16	10	605	4	47
U2OS/NFkB	114	16	15	18	11	20

FIG. 59

HEK-293



* Secuencia señal de IL-6

FIG. 60

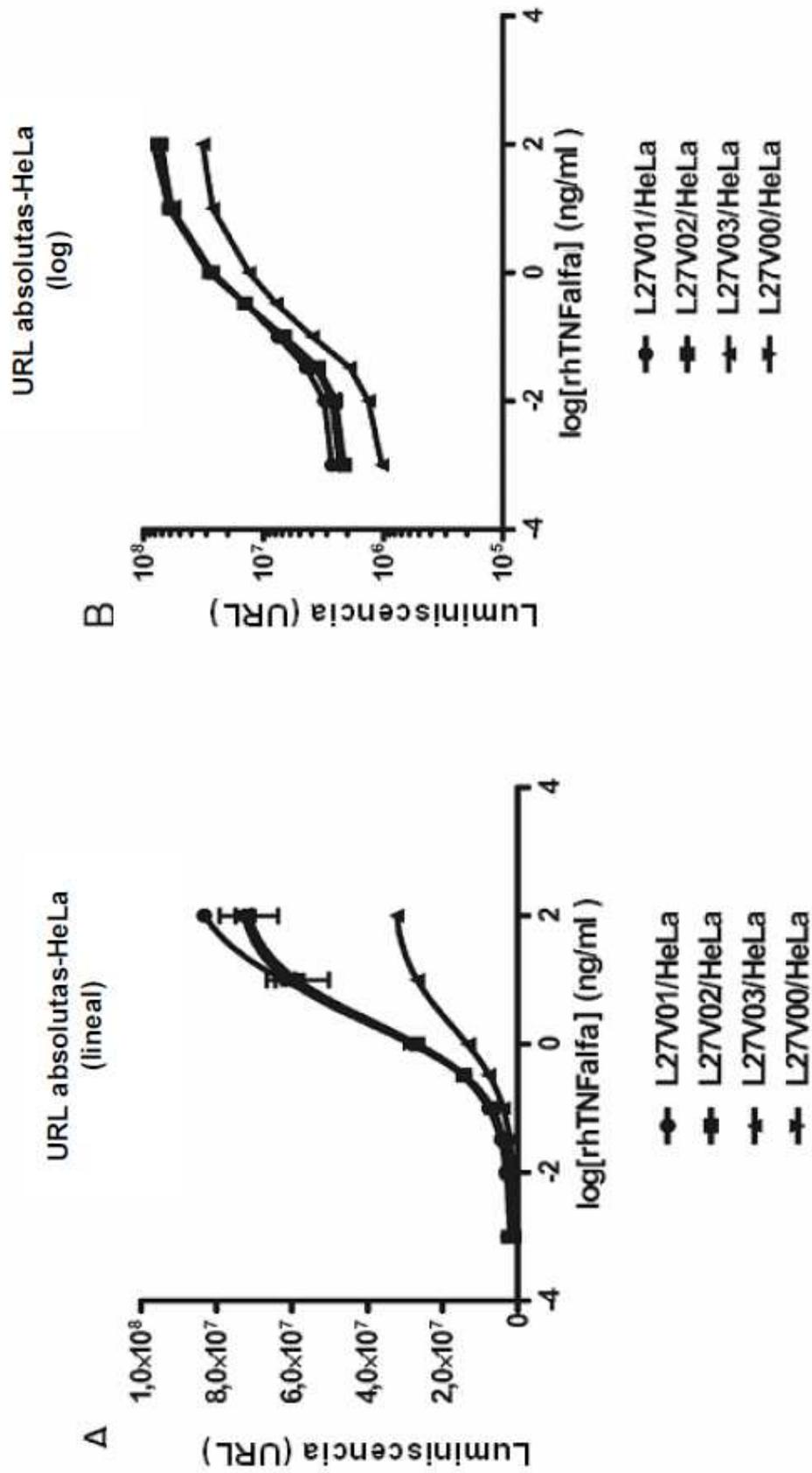


FIG. 61

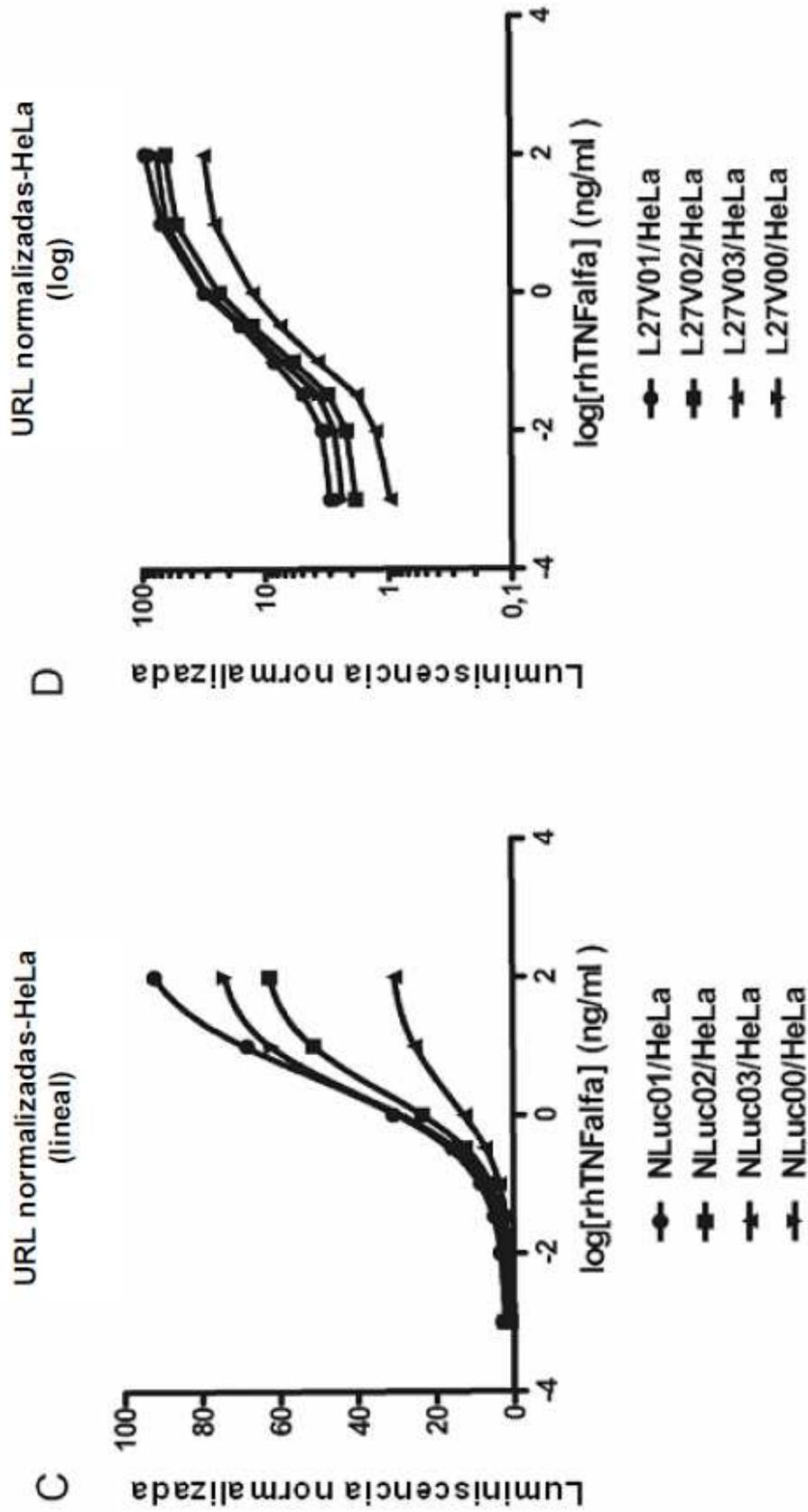


FIG. 61

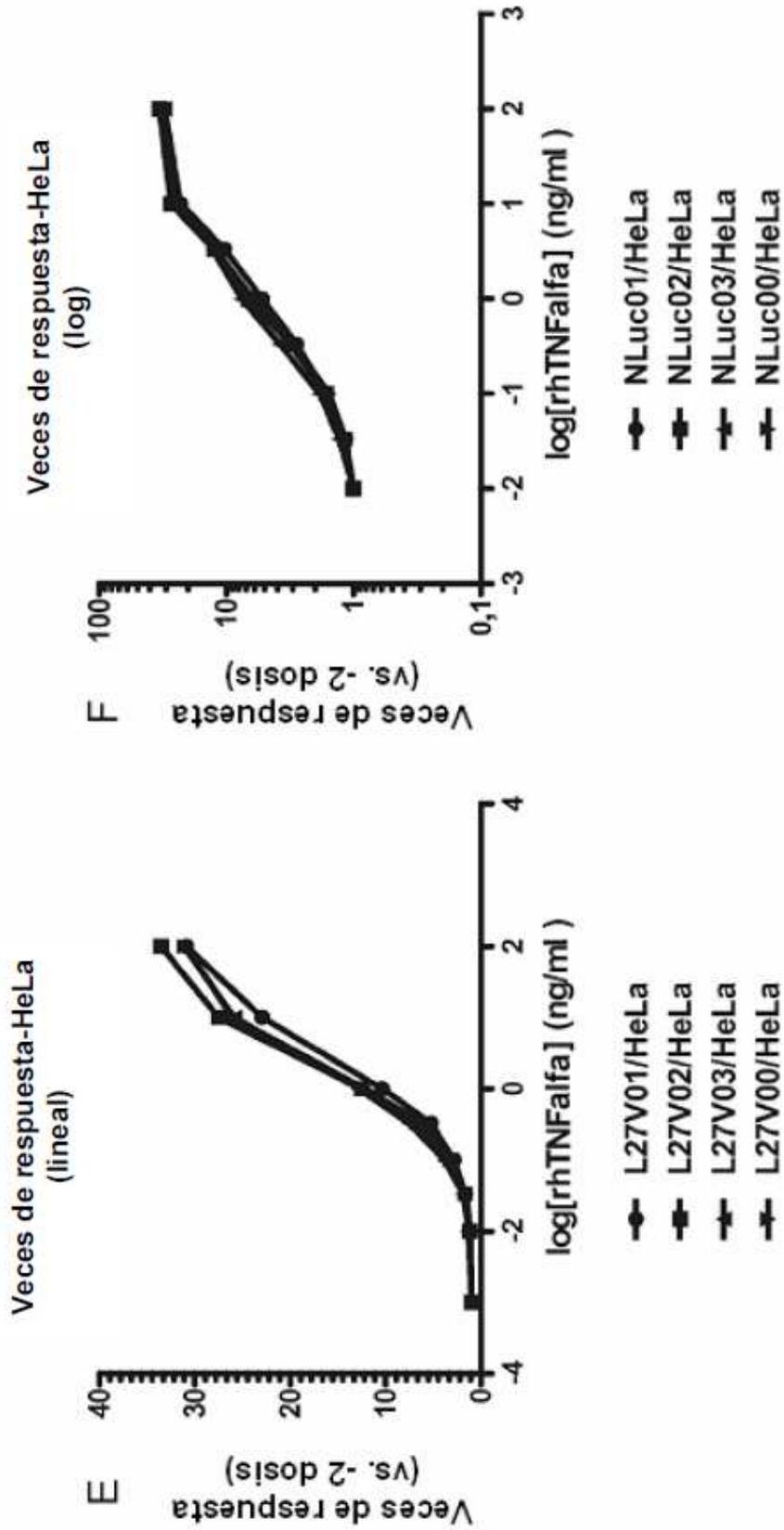


FIG. 61

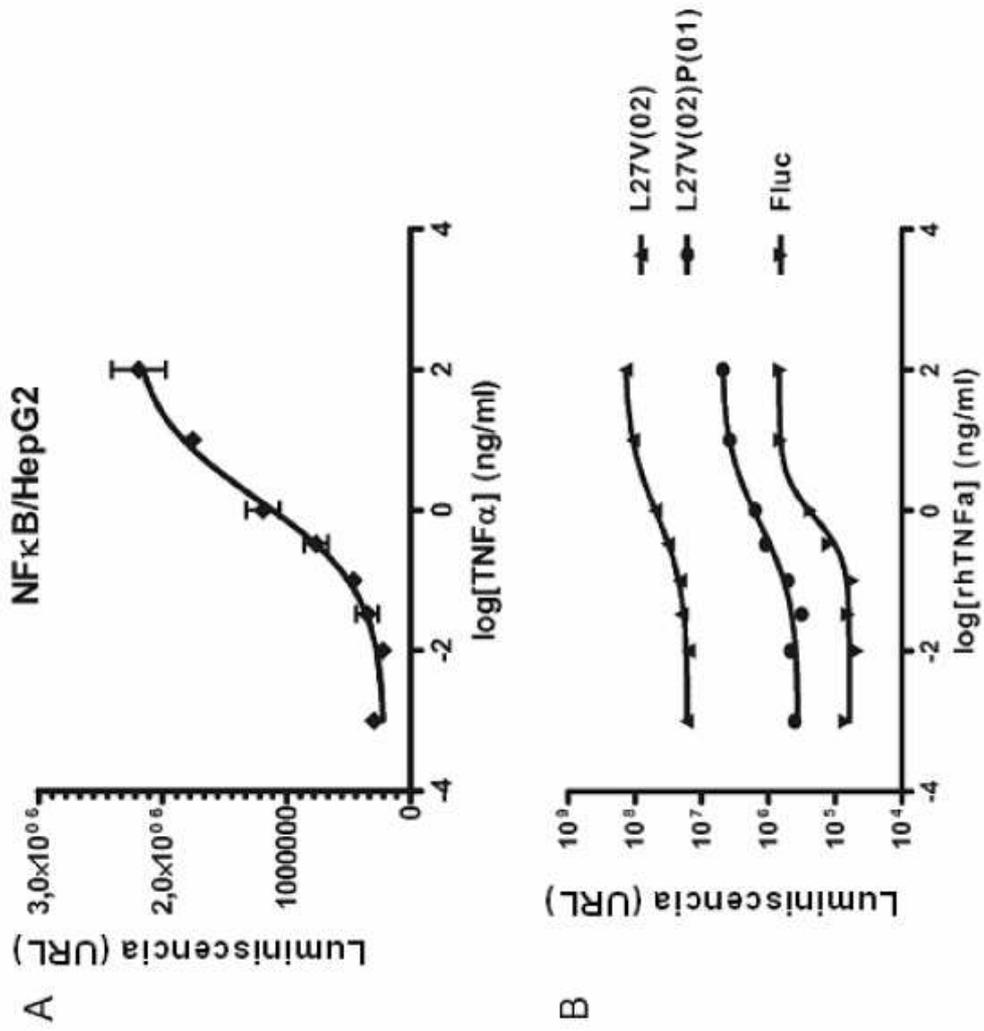


FIG. 62

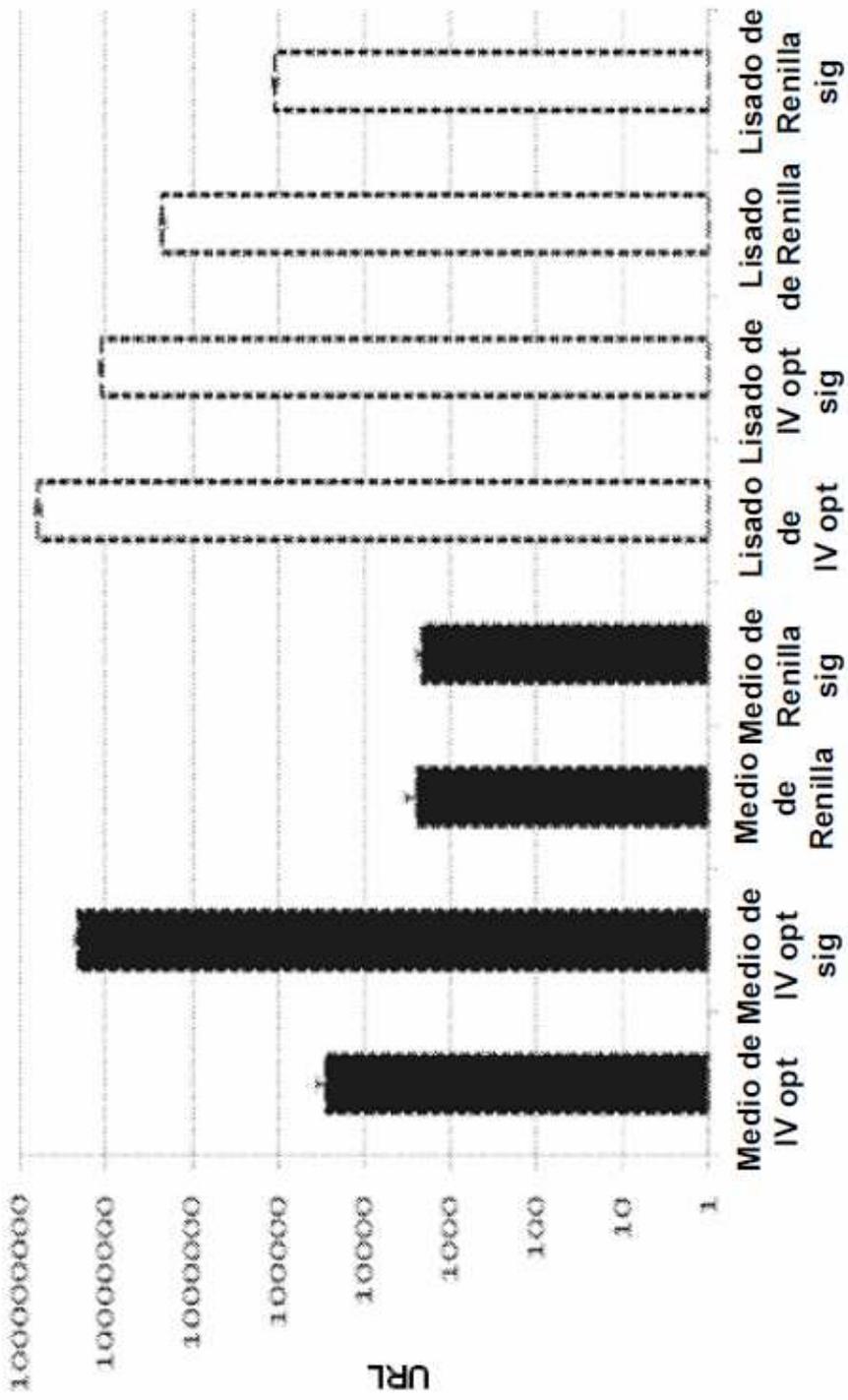
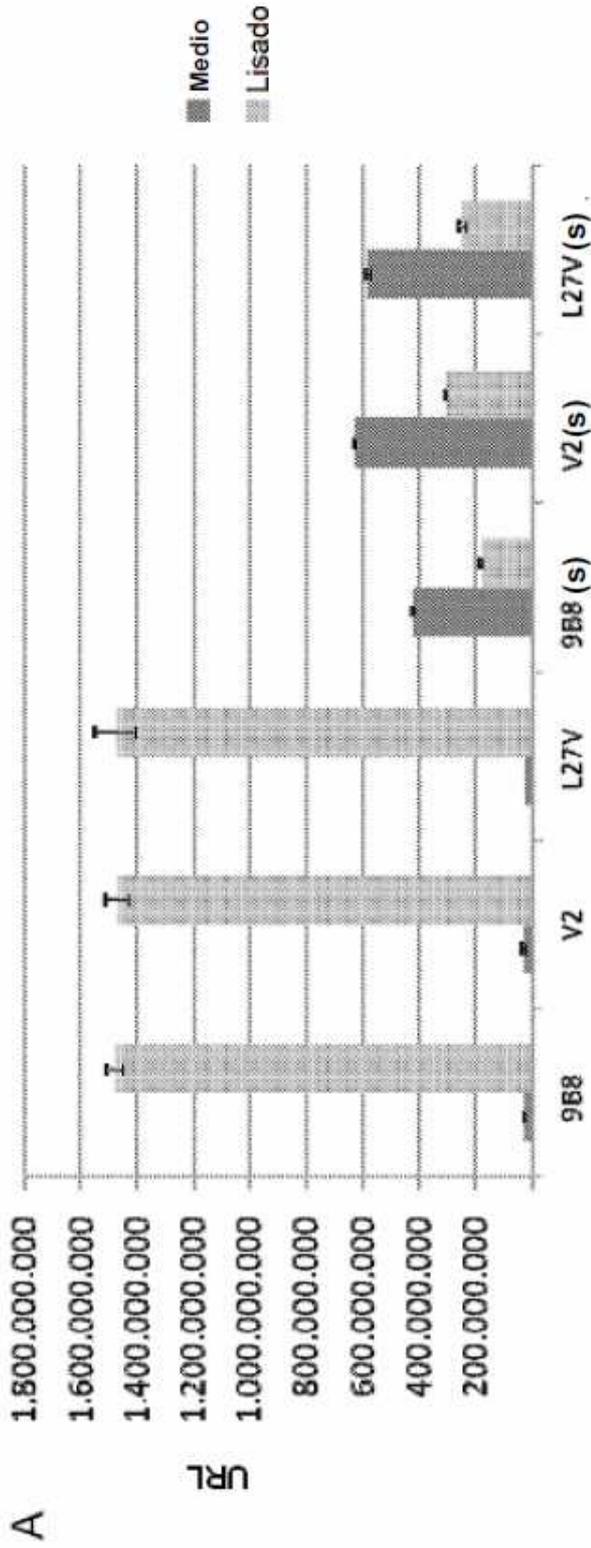


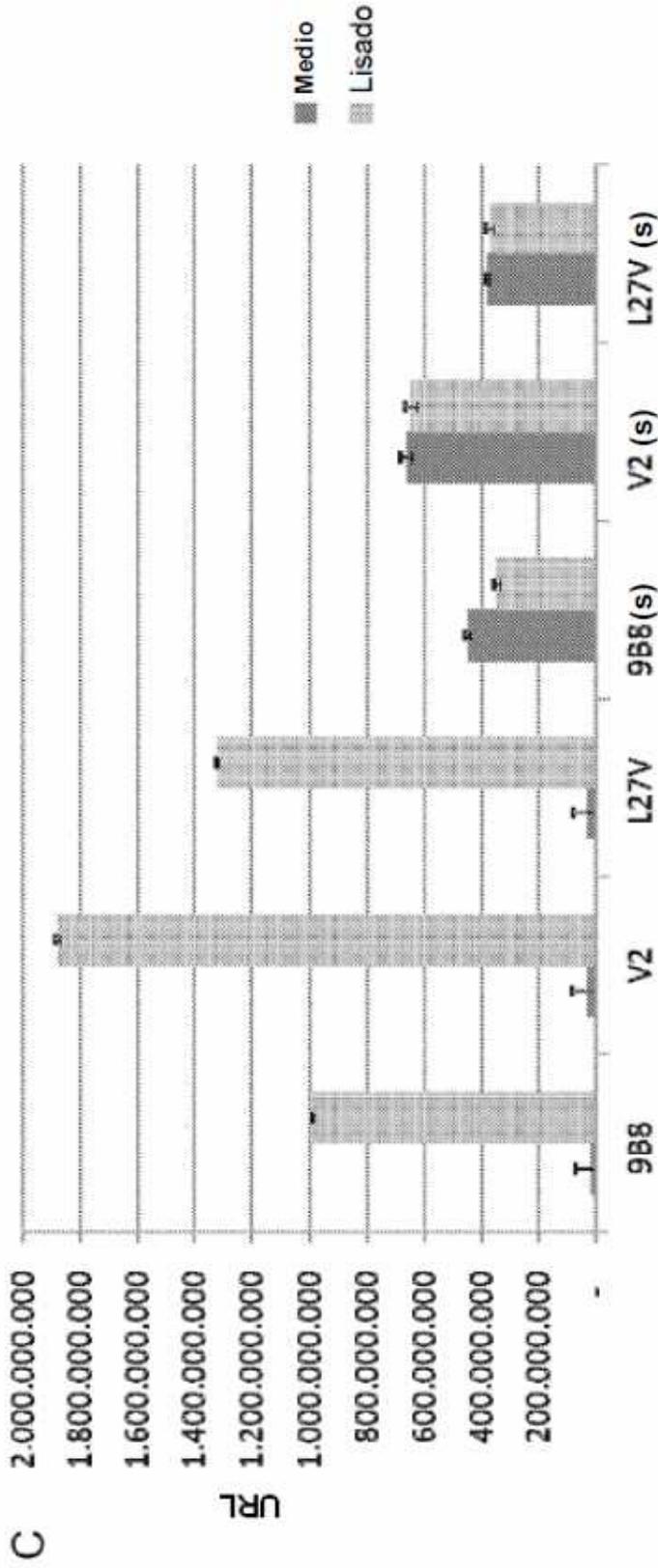
FIG. 63



B

Muestra	9B8	V2	L27V	9B8 (s)	V2 (s)	L27V (s)
Medio	21.284.716	23.787.770	18.299.776	417.440.788	625.387.280	578.186.357
Lisado	1.478.846.480	1.468.338.592	1.474.480.208	177.409.200	299.355.128	243.323.506

FIG. 64



D

Muestra	9B8	V2	L27V	9B8 (s)	V2 (s)	L27V (s)
Medio	14.206.429	27.753.862	28.932.890	447.675.259	660.425.952	377.700.912
Lisado	984.347.600	1.876.585.440	1.319.113.560	343.880.163	643.107.747	369.662.727

FIG. 64

A

ADN	Met-luc (Ready-To Glow™)	9B8-3939	V2-3939
100ng	2.502,116	3.307,464,875	3.992,245,760
10ng	297,024	33,947,989	51,683,999

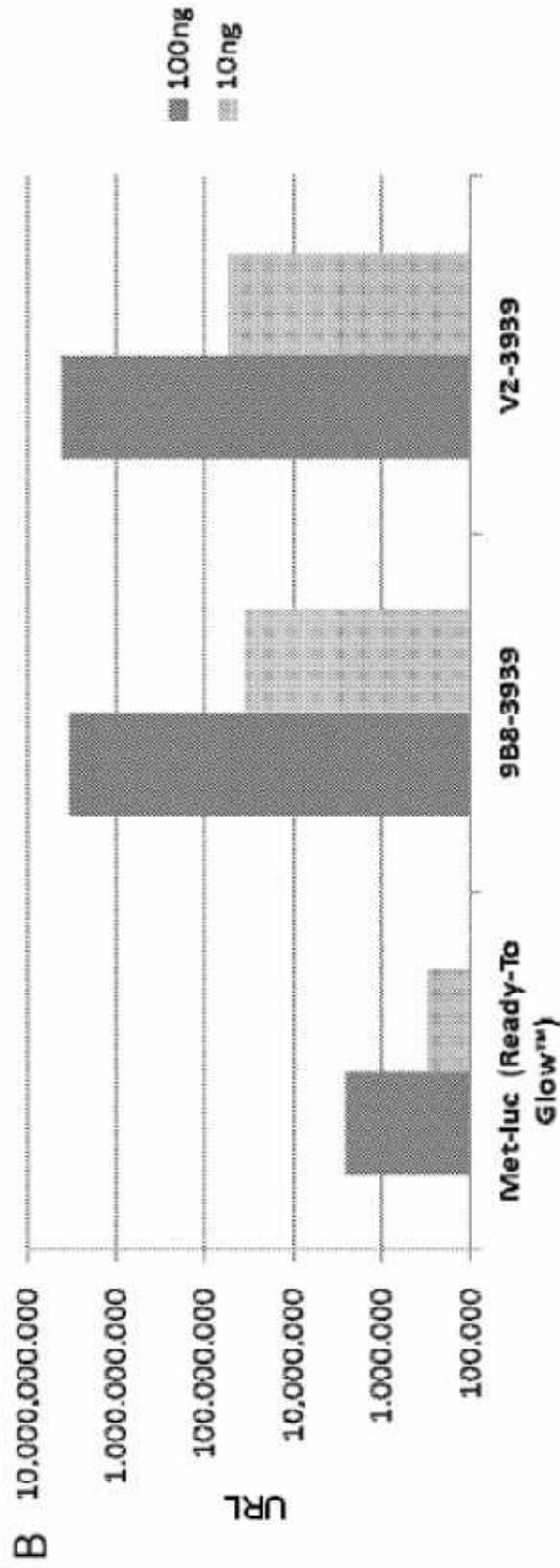


FIG. 65

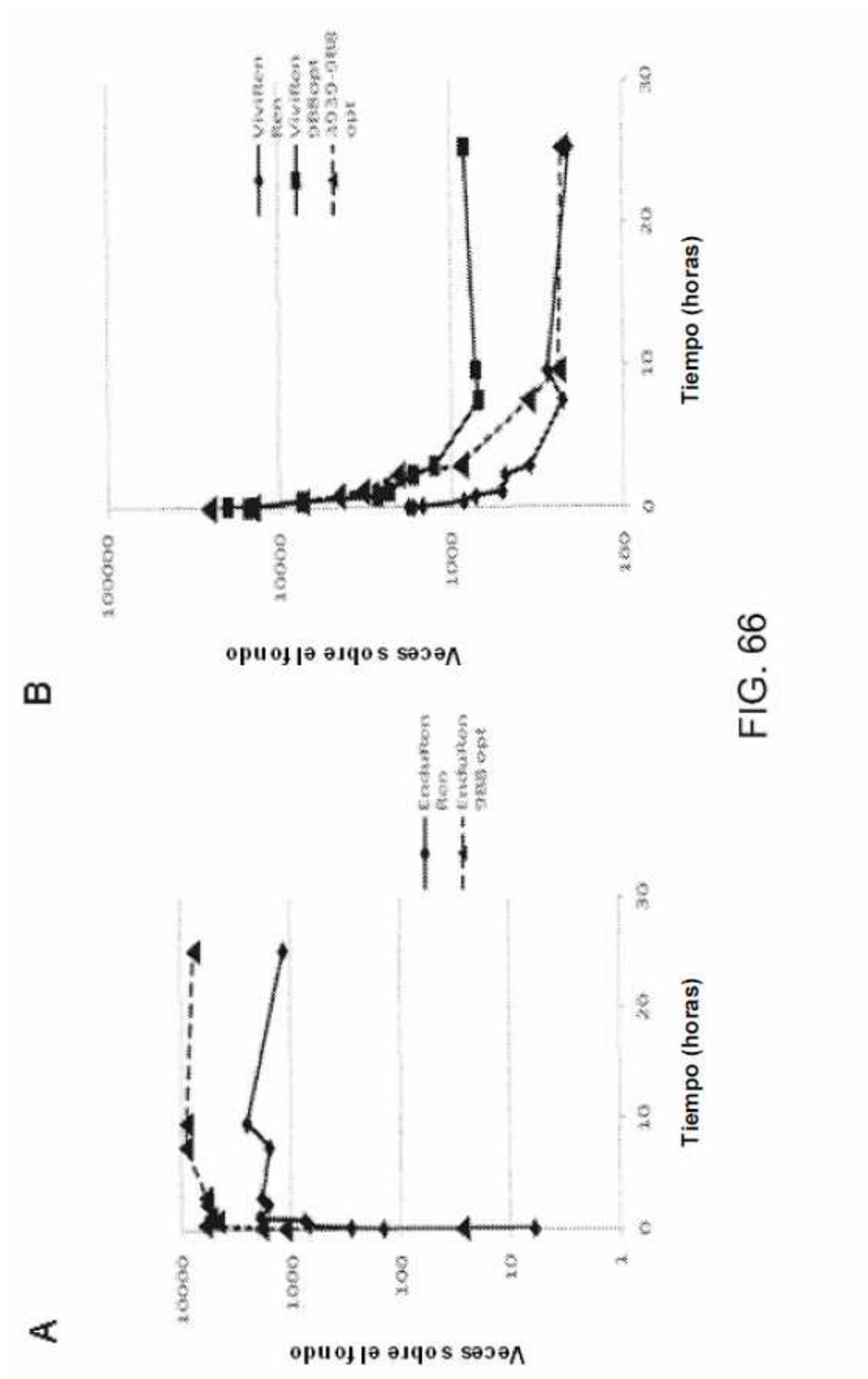
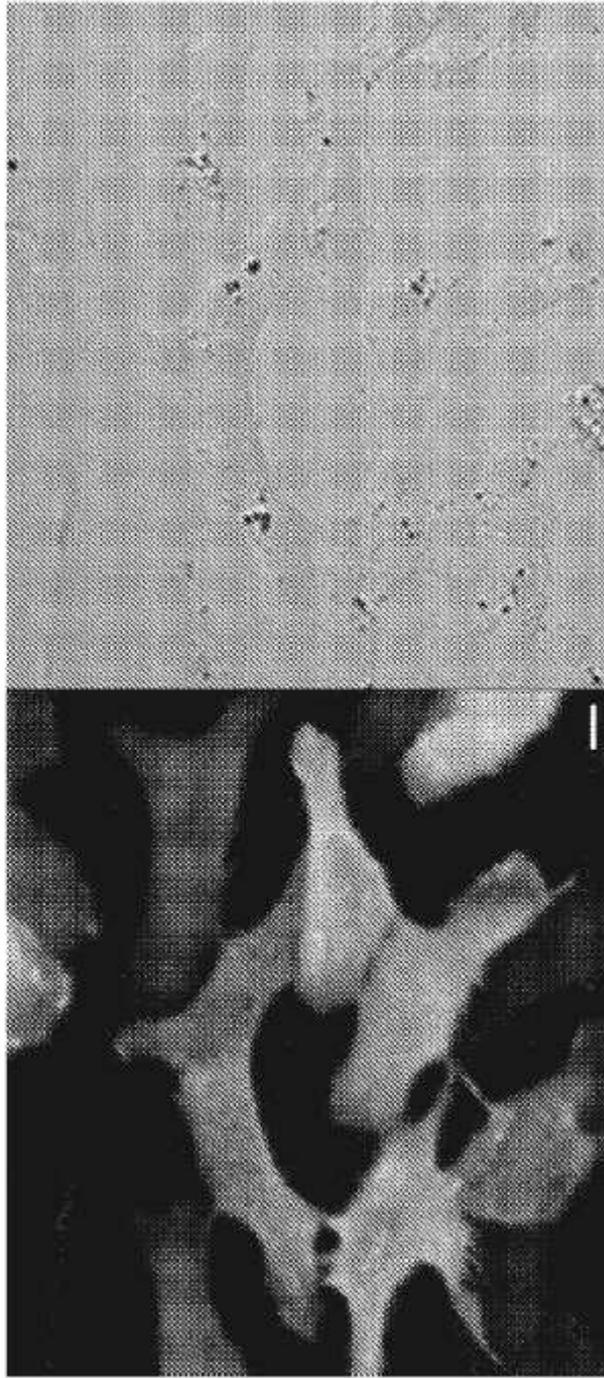


FIG. 66



A

FIG. 67

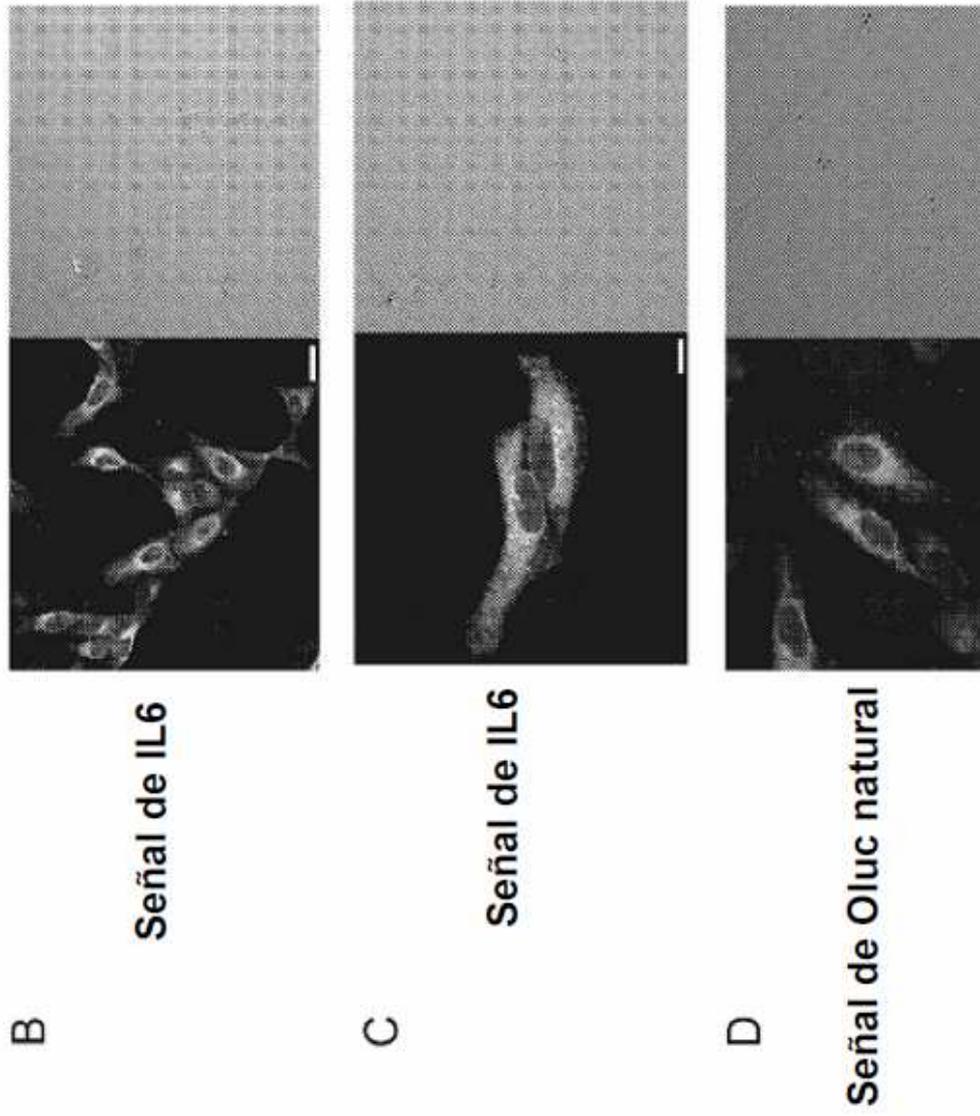


FIG. 67

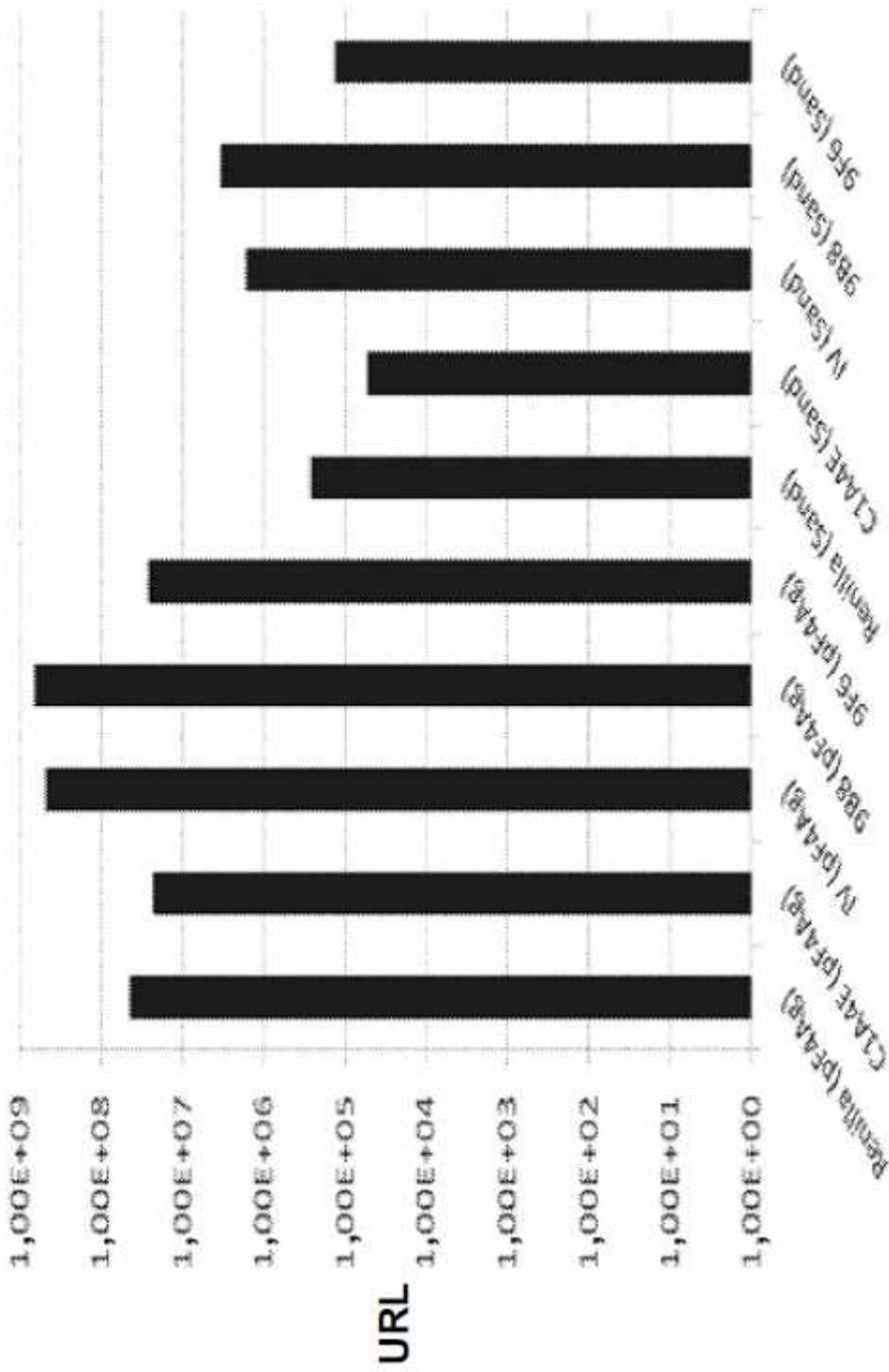


FIG. 68

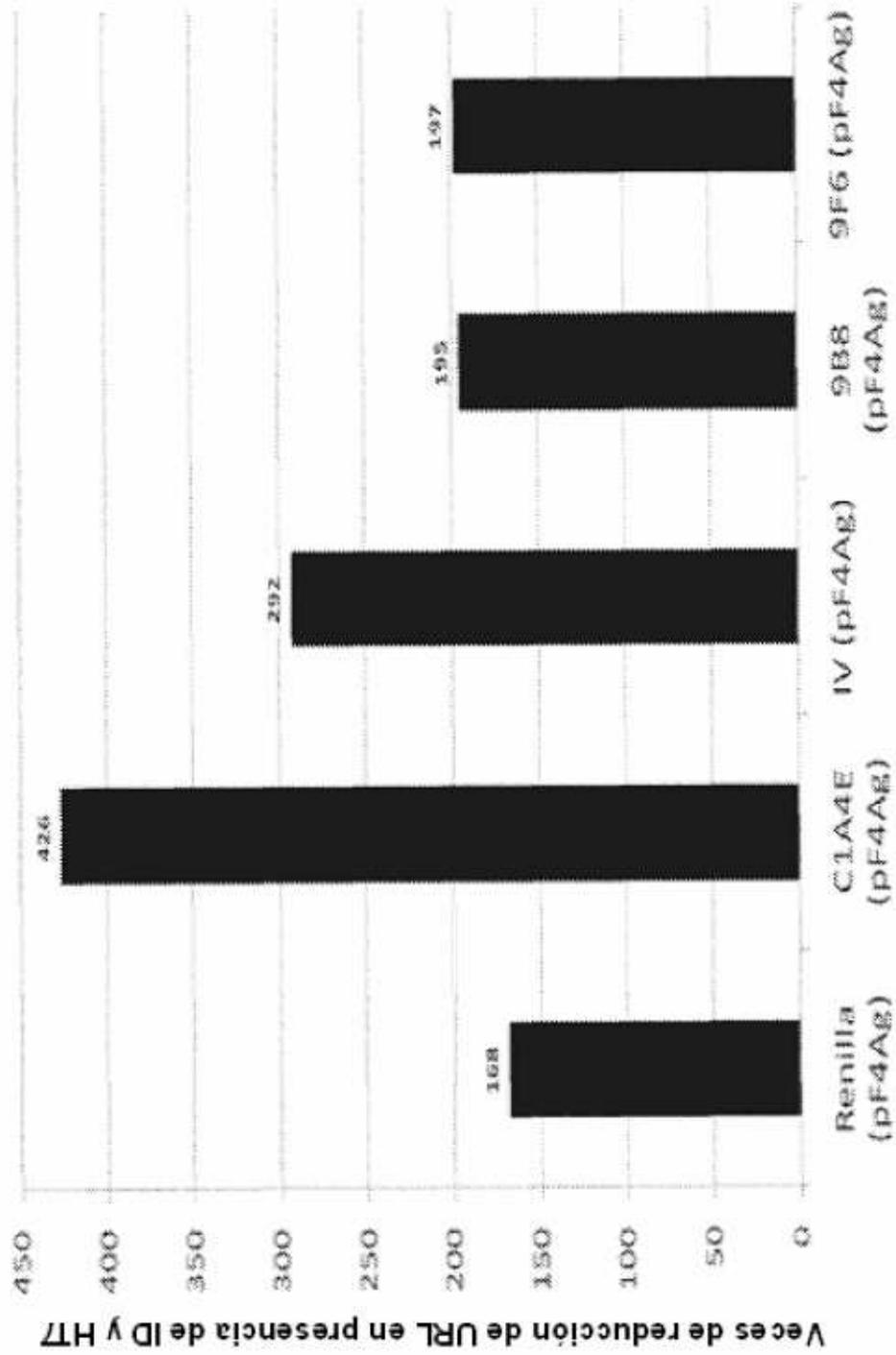


FIG. 69

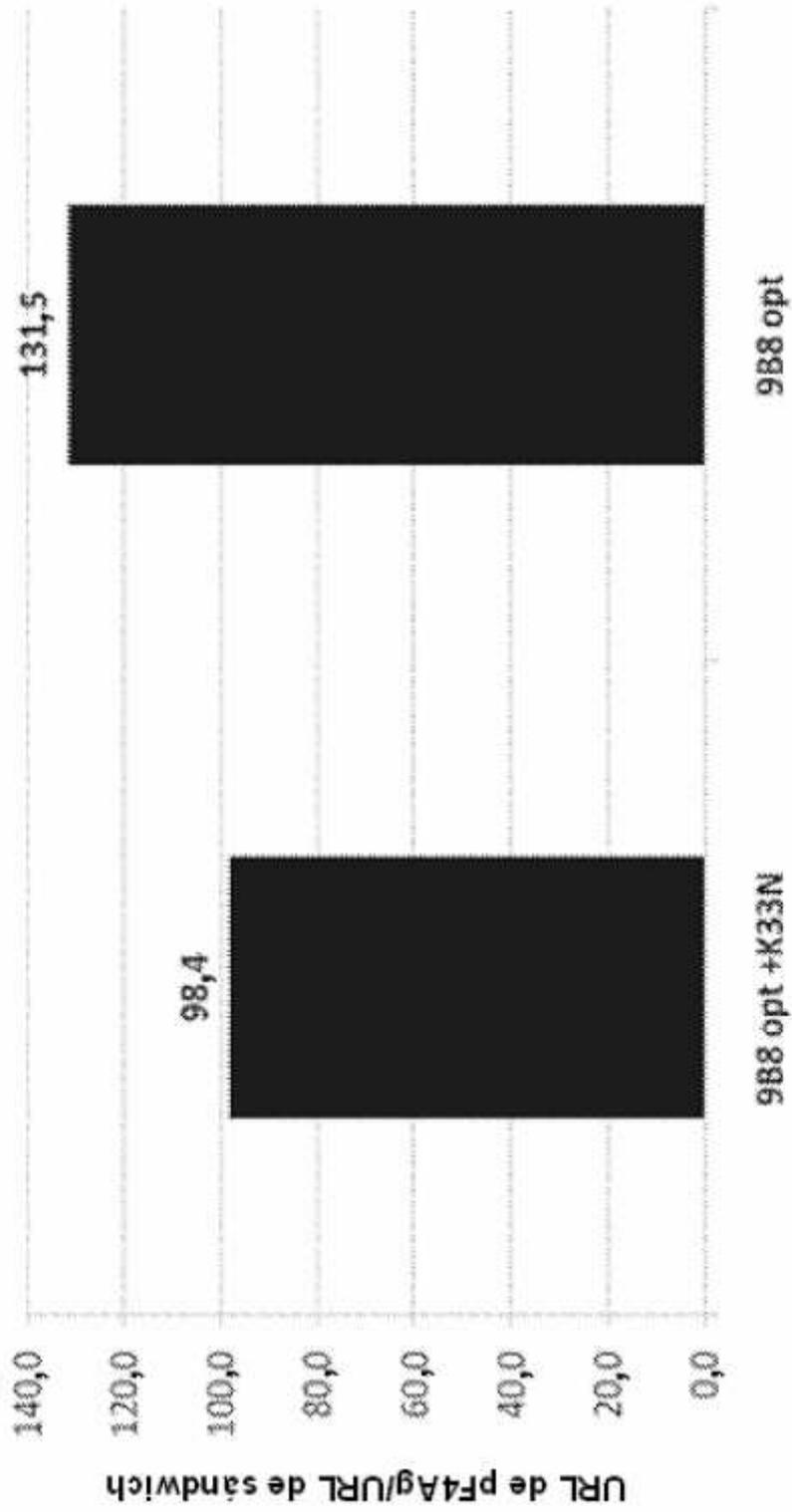


FIG. 70

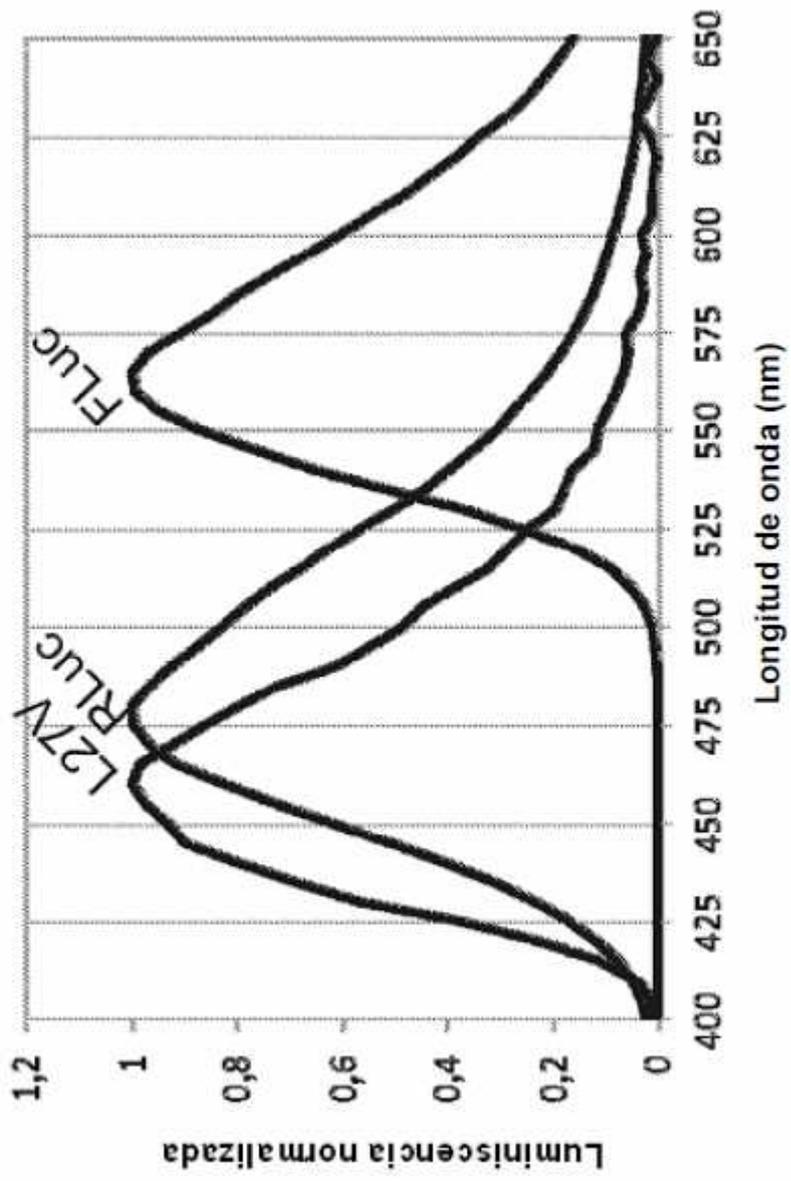


FIG. 71

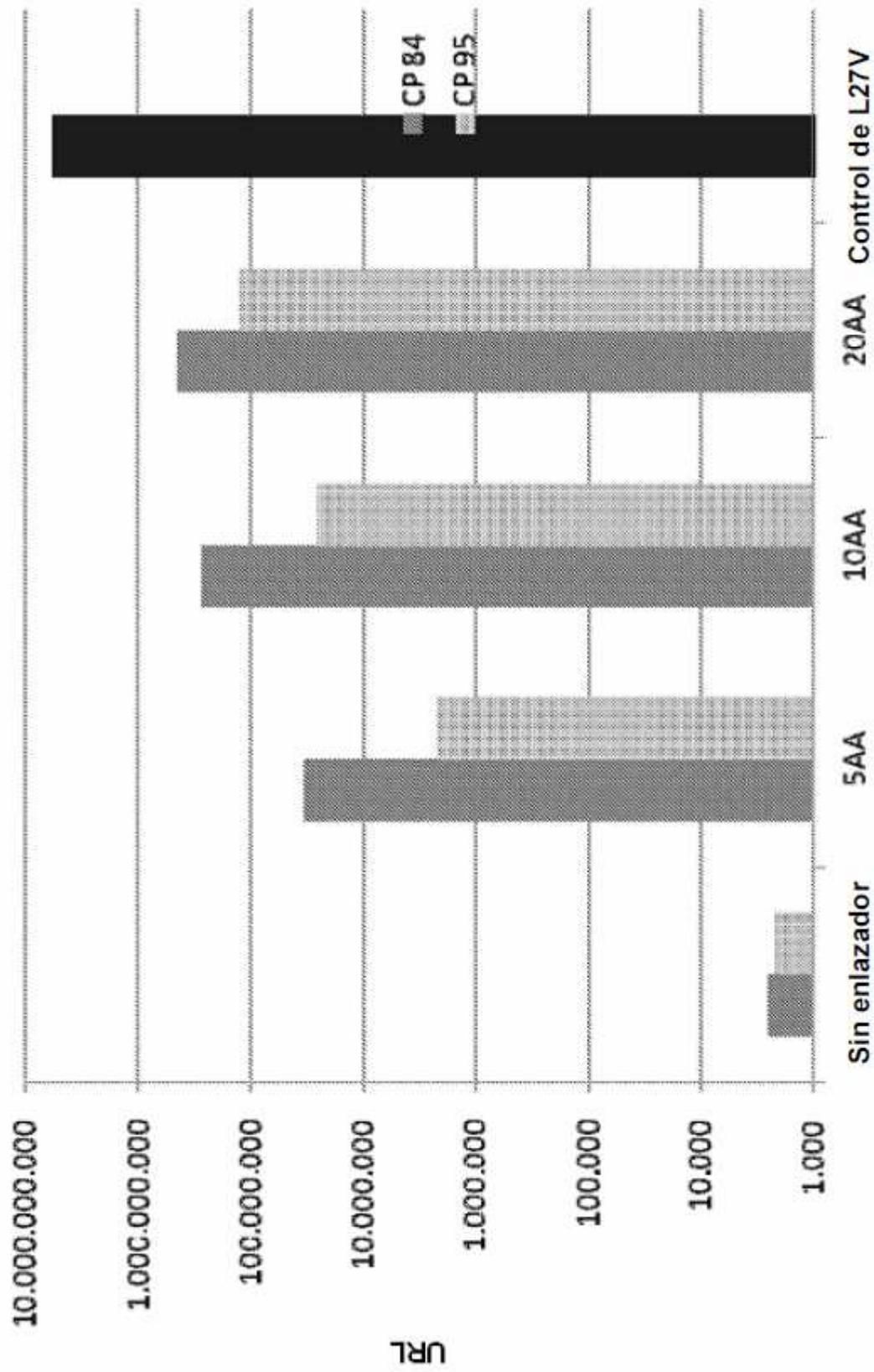


FIG. 72

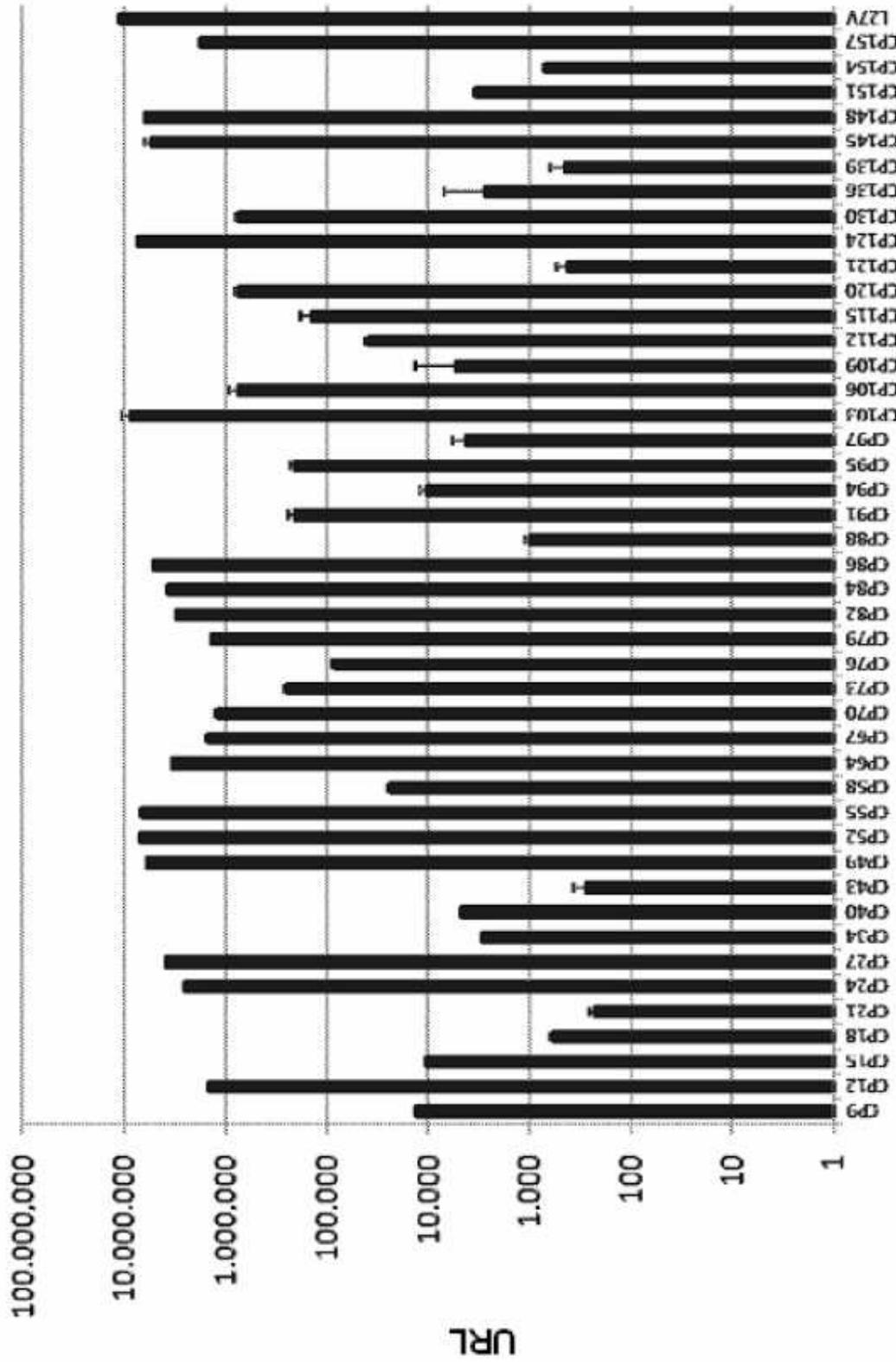


FIG. 73A

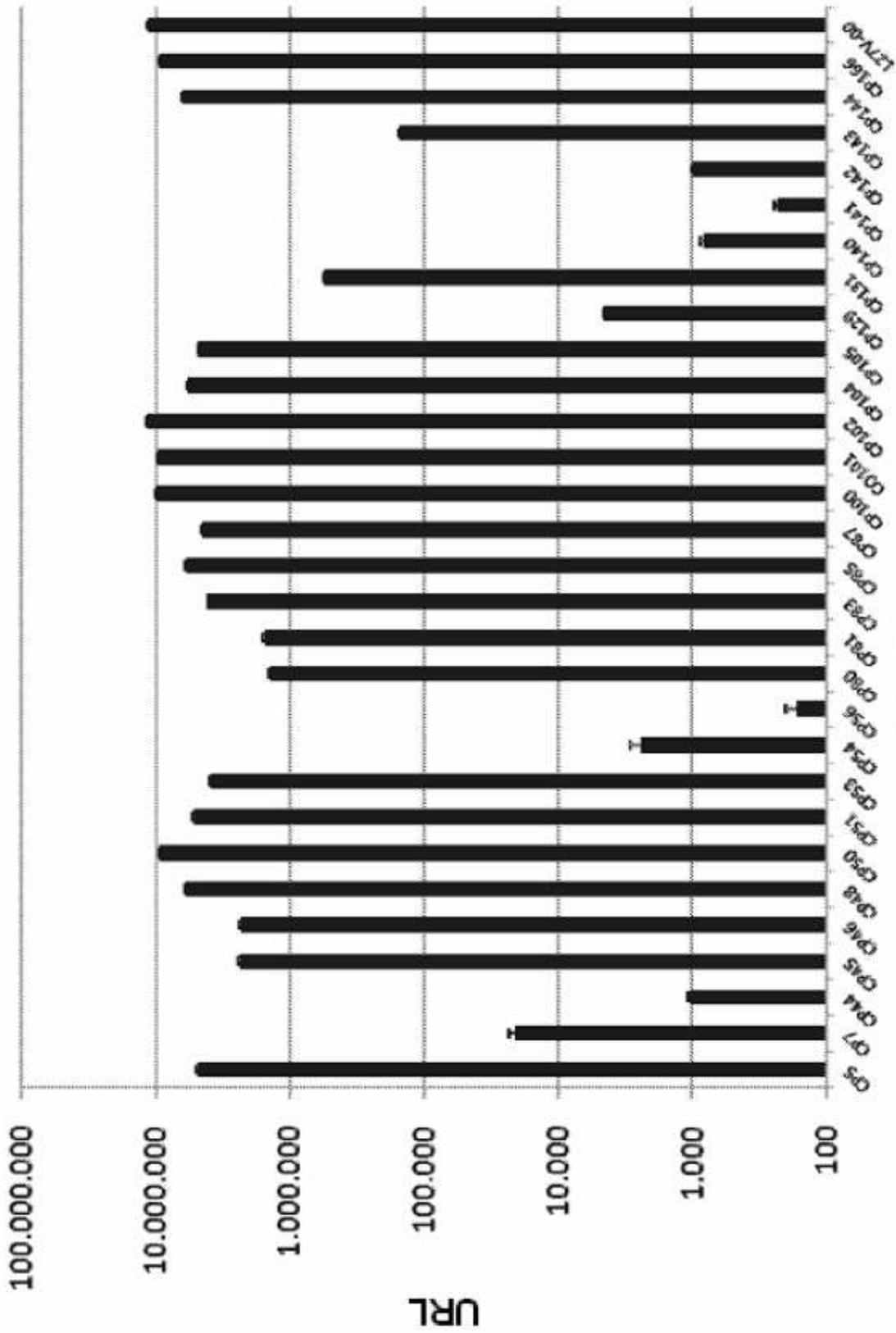


FIG. 73B

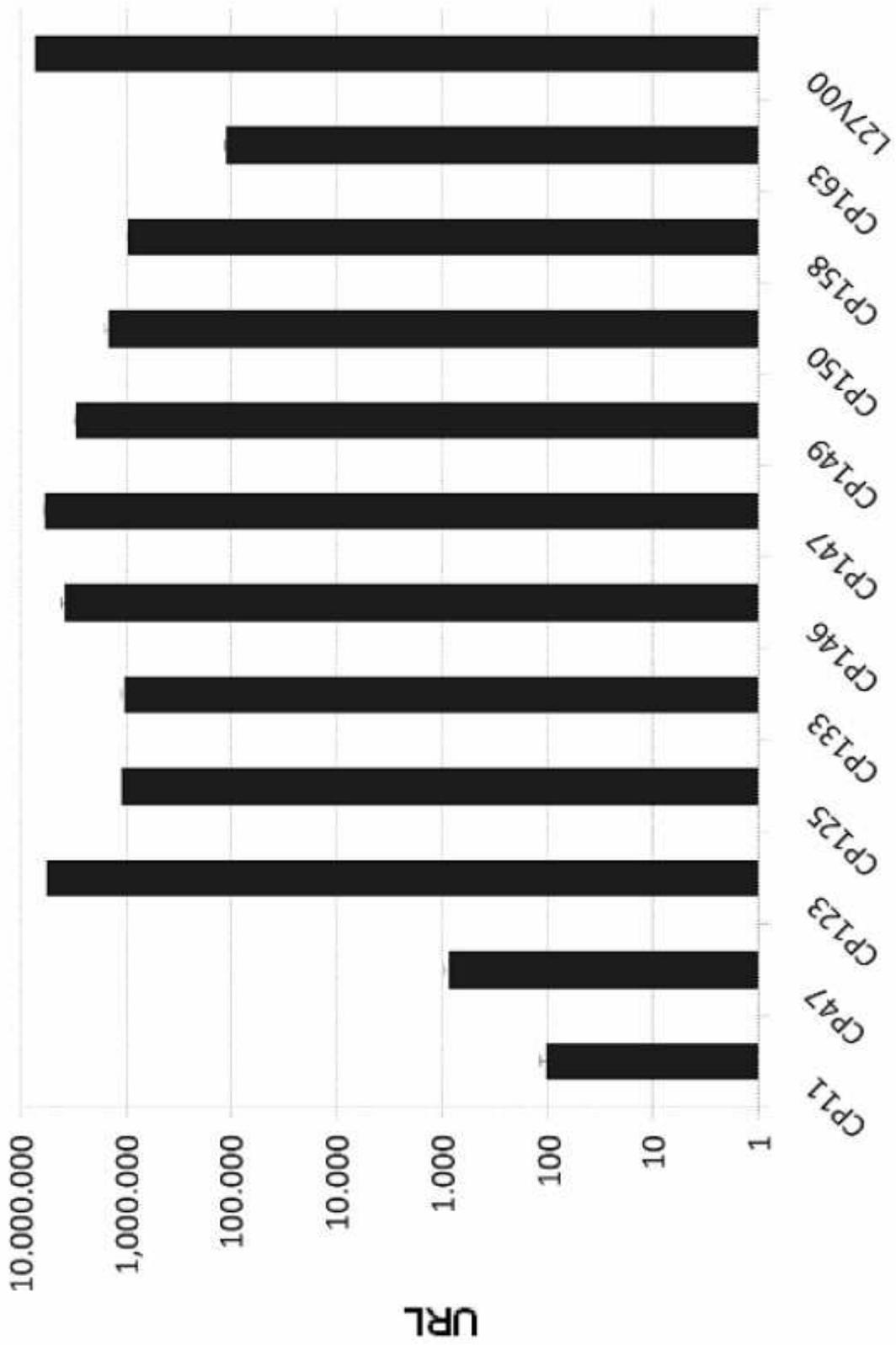


FIG. 73C

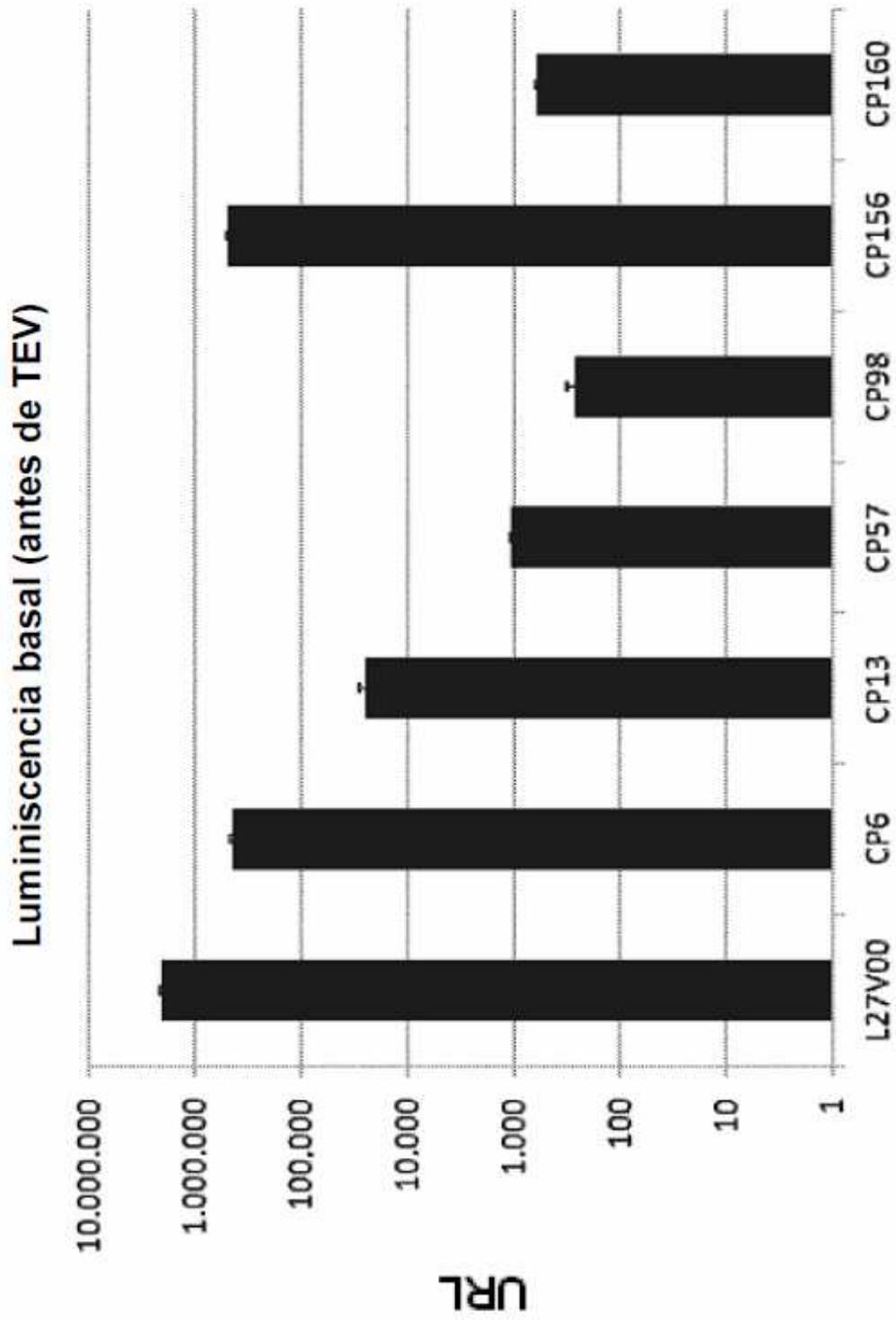


FIG. 73D

Sitio de CP ("n.º de CP")	SEQ ID NO:	Respuesta a TEV	Sitio de CP ("n.º de CP")	SEQ ID NO:	Respuesta a TEV	Sitio de CP ("n.º de CP")	SEQ ID NO:	Respuesta a TEV	Sitio de CP ("n.º de CP")	SEQ ID NO:	Respuesta a TEV
5	114 y 115	1,3	53	160 y 161	2100	95	204 y 205	512,9	136	246 y 247	/
6	116 y 117	7,0	54	162 y 163	12,3	97	206 y 207	9,1	139	248 y 249	1,9
7	118 y 119	/	55	164 y 165	7744,3	98	447 y 448	5,4	140	250 y 251	/
9	120 y 121	2,2	56	166 y 167	/	100	208 y 209	7515,2	141	252 y 253	/
11	122 y 123	/	57	445 y 446	17,6	101	210 y 211	6329,9	142	254 y 255	5,3
12	124 y 125	1,6	58	168 y 169	116,7	102	212 y 213	3205,1	143	256 y 257	871,4
15	126 y 127	/	64	170 y 171	1,4	103	214 y 215	3456,8	144	258 y 259	1,6
18	128 y 129	2,1	67	172 y 173	/	104	216 y 217	3036,9	145	260 y 261	3,7
21	130 y 131	/	70	174 y 175	/	105	218 y 219	4931,6	146	262 y 263	6,6
24	132 y 133	3,8	73	176 y 177	/	106	220 y 221	5,3	147	264 y 265	2,0
27	134 y 135	3,1	76	178 y 179	/	109	222 y 223	12,3	148	266 y 267	3,8
34	136 y 137	9,3	79	180 y 181	/	112	224 y 225	82,7	149	268 y 269	4,4
40	138 y 139	1,8	80	182 y 183	1,3	13	443 y 444	160,8	150	270 y 271	867,4
43	140 y 141	/	81	184 y 185	1,3	115	226 y 227	/	151	272 y 273	6,3
44	142 y 143	12,9	82	186 y 187	1,5	120	228 y 229	1661	154	274 y 275	/
45	144 y 145	1057,7	83	188 y 189	1,5	121	230 y 231	1,5	156	276 y 277	942,1
46	146 y 147	1277,9	84	190 y 191	1,2	123	232 y 233	323,6	157	278 y 279	1467,9
47	148 y 149	1,5	85	192 y 193	1,4	124	234 y 235	1548,2	158	280 y 281	1526,5
48	150 y 151	6,7	86	194 y 195	1,2	125	236 y 237	1141,8	160	282 y 283	12,4
49	152 y 153	12,5	87	196 y 197	1,5	129	238 y 239	40,2	163	284 y 285	/
50	154 y 155	2,2	88	198 y 199	1,8	130	240 y 241	2,043,0	166	286 y 287	/
51	156 y 157	2,8	91	200 y 201	324,2	131	242 y 243	612,5			
52	158 y 159	15,9	94	202 y 203	5,5	133	244 y 245	1,5			

FIG. 73E

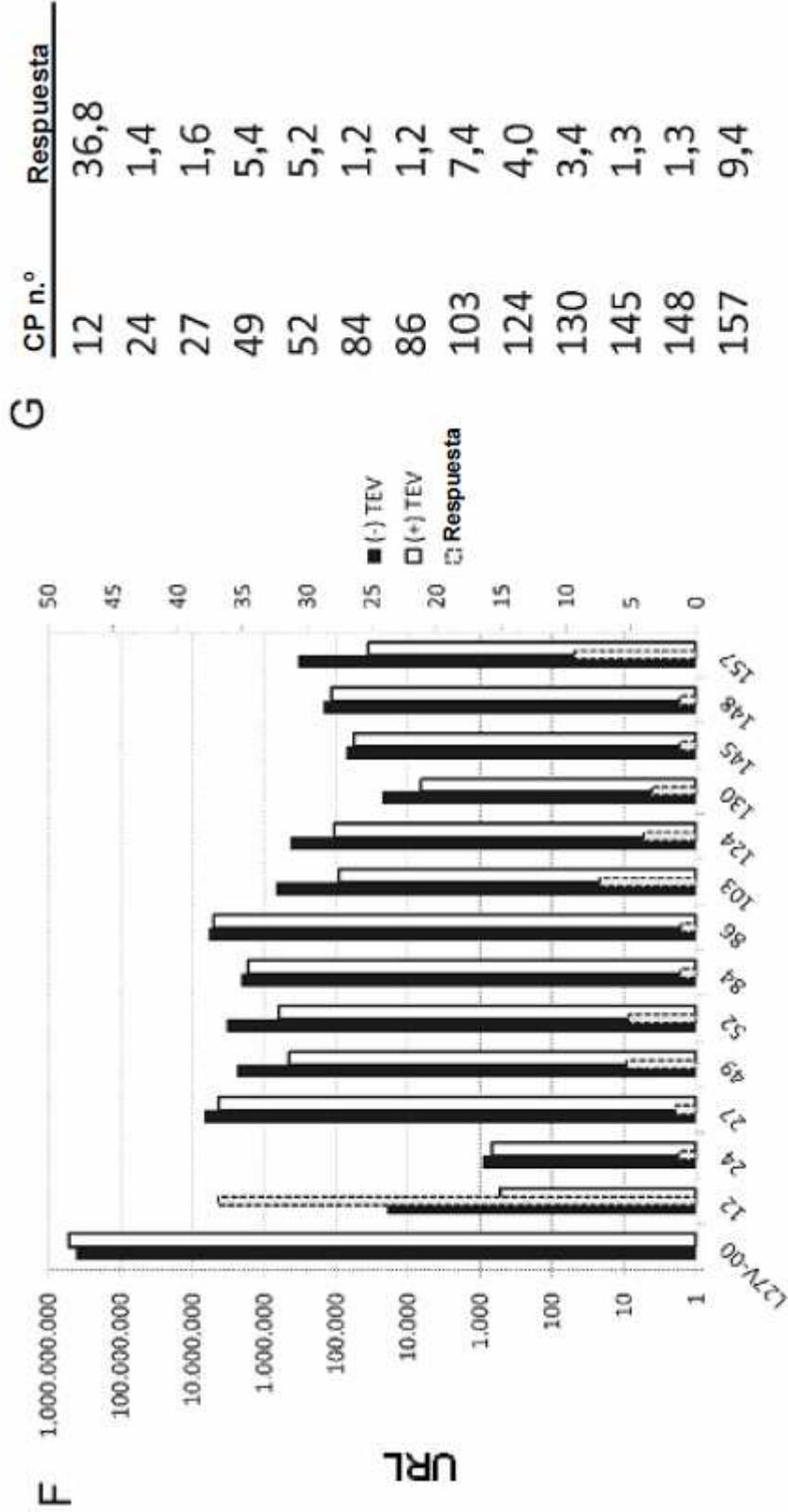


FIG. 73

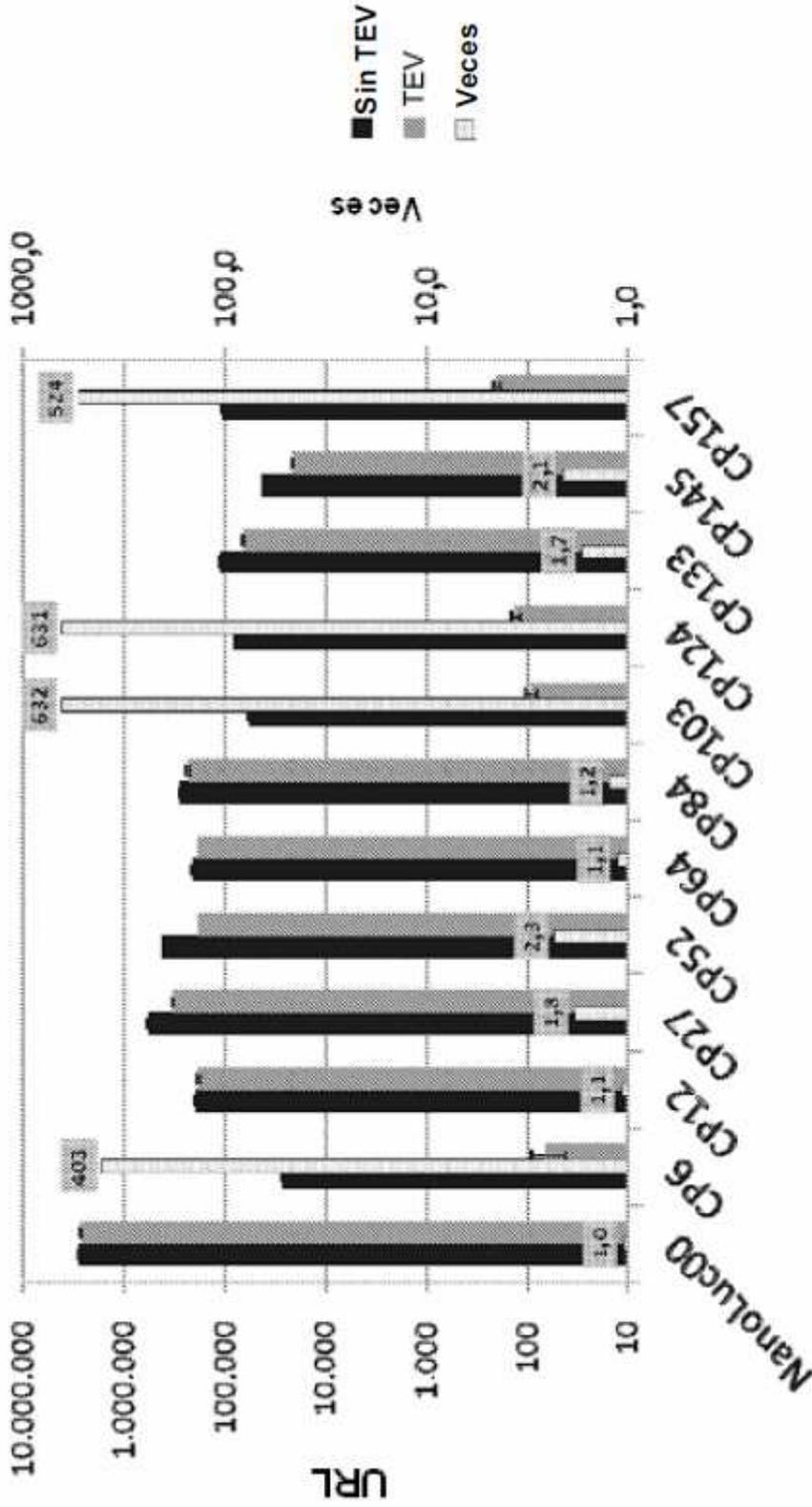


FIG. 73H

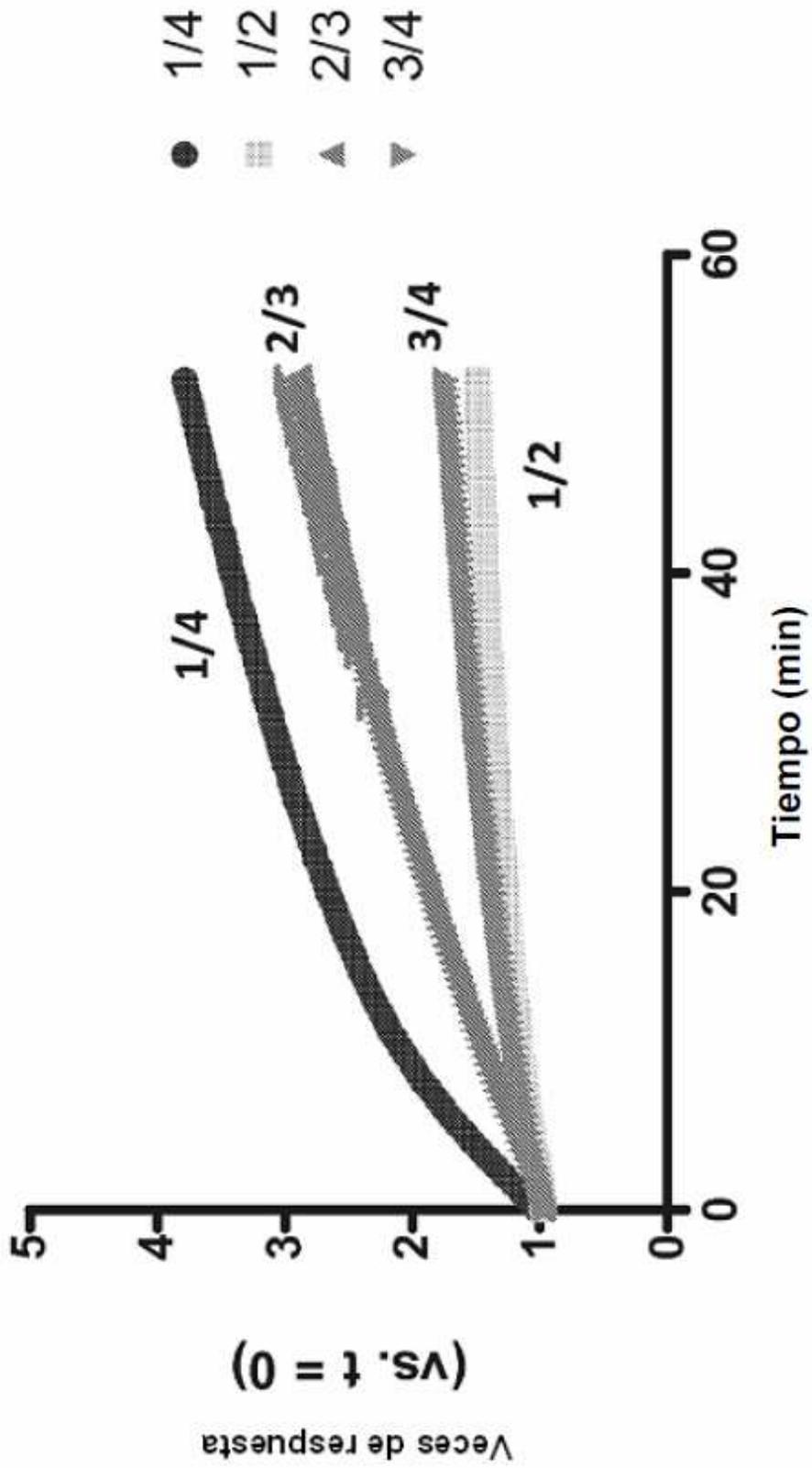


FIG. 74

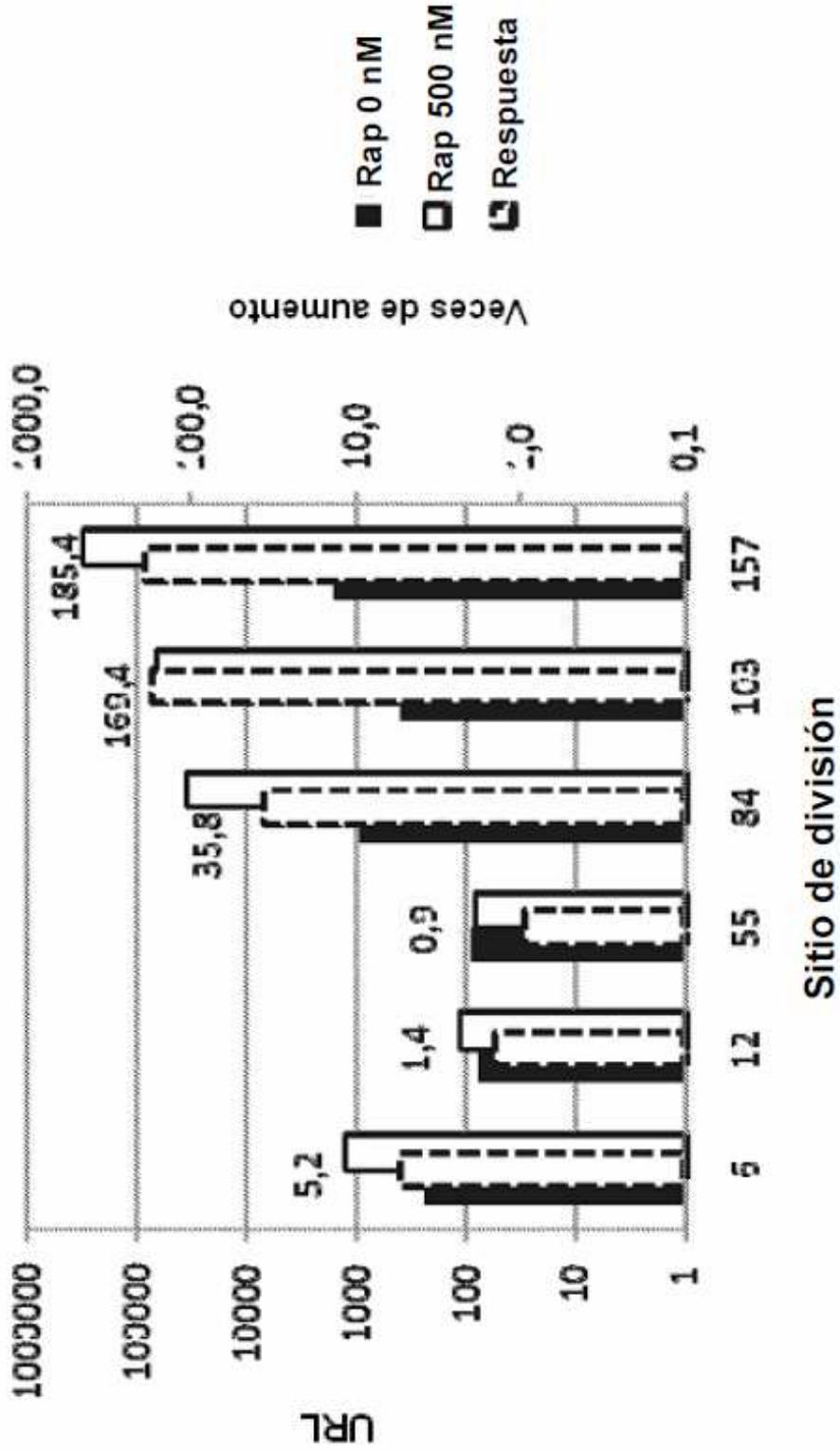


FIG. 75A

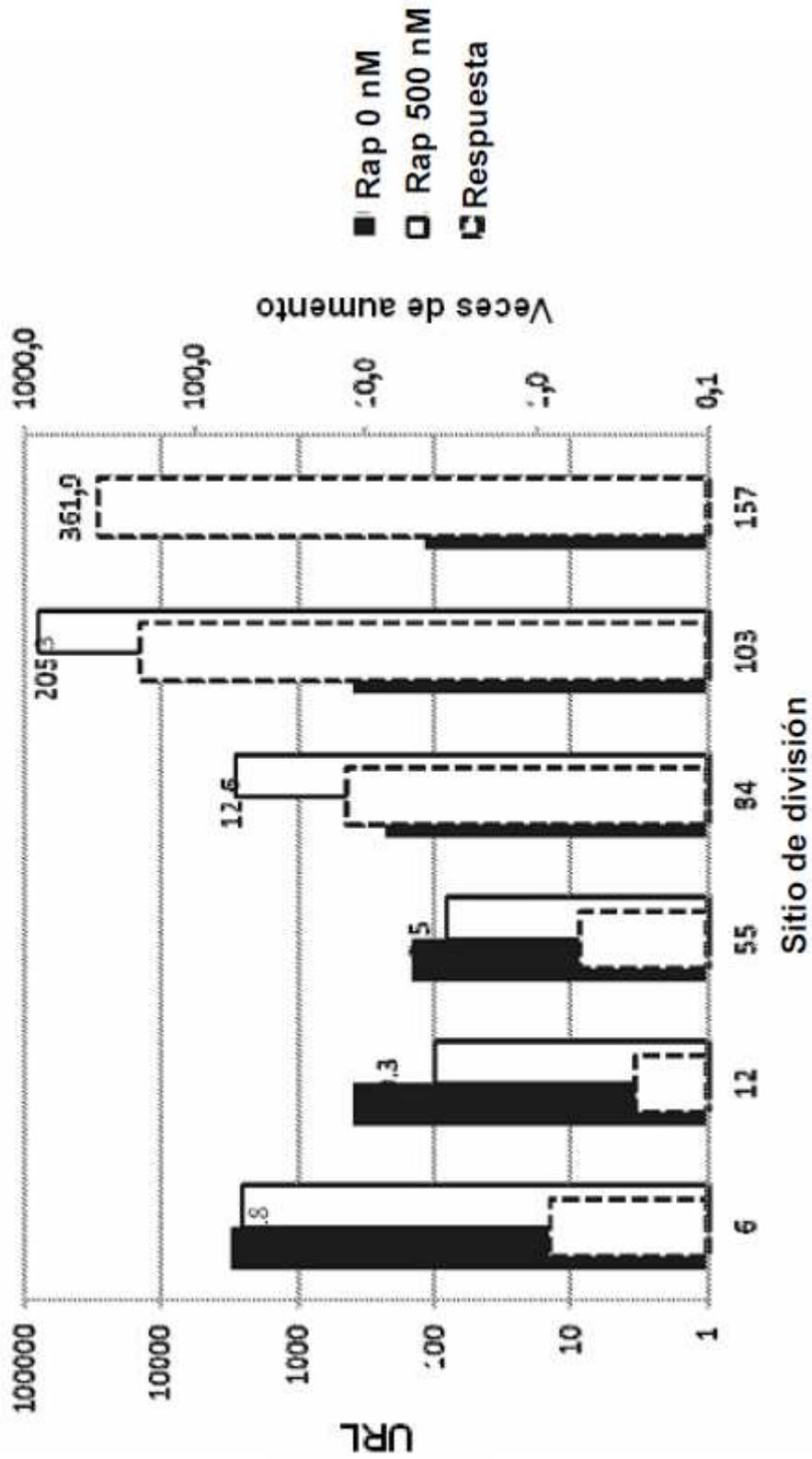


FIG. 75B

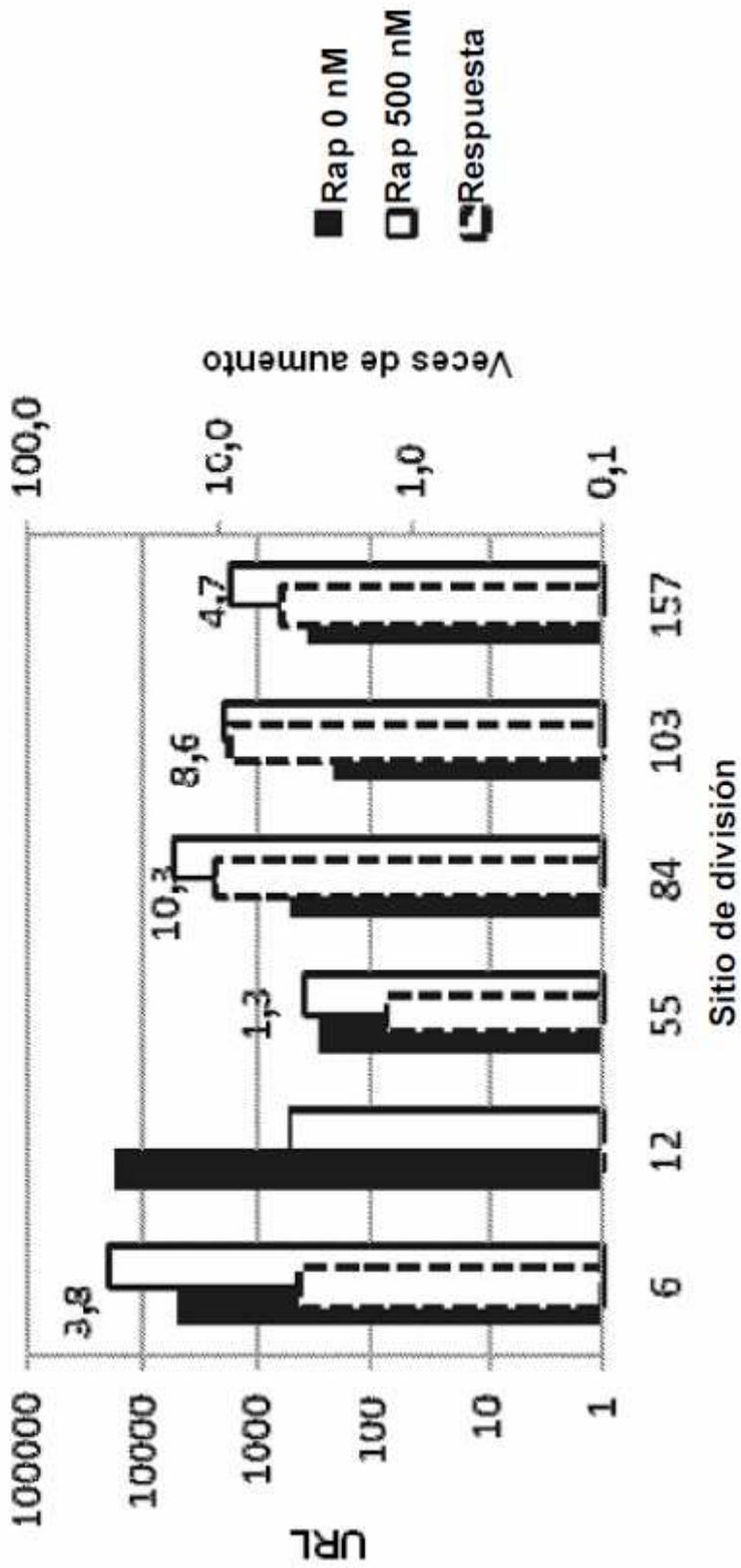


FIG. 75C

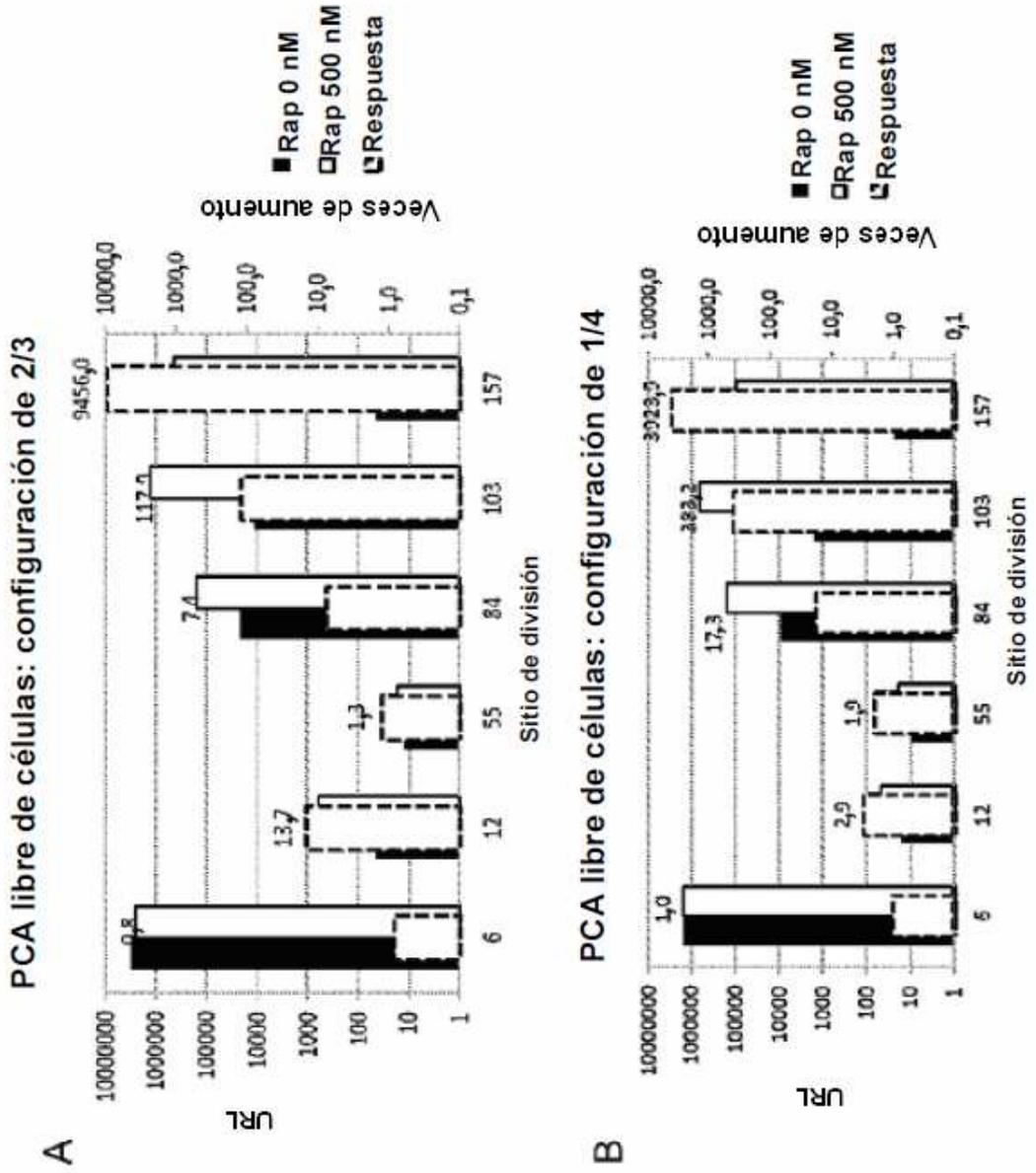


FIG. 76

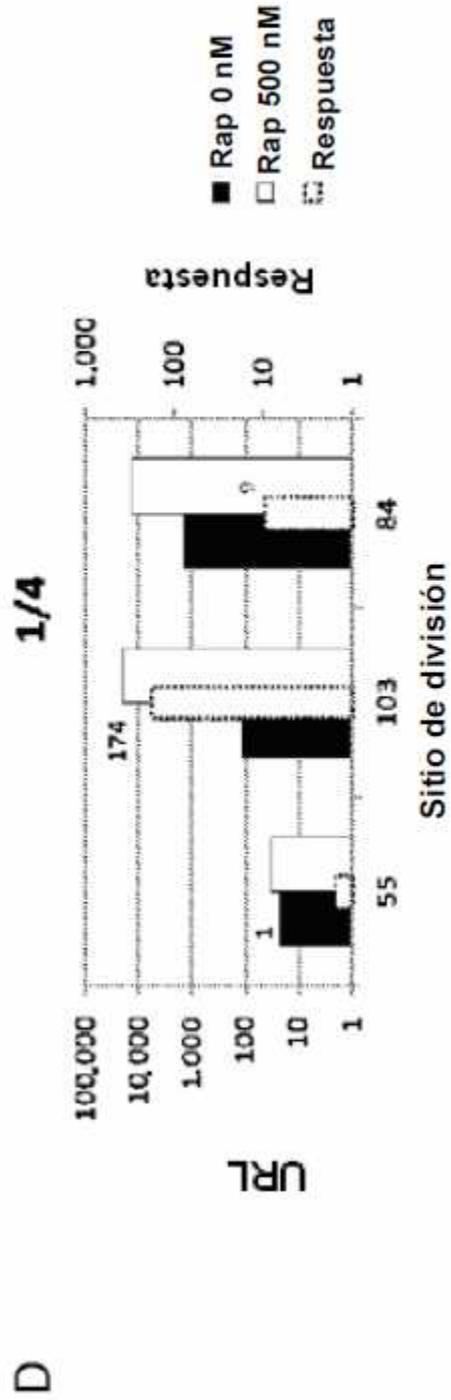
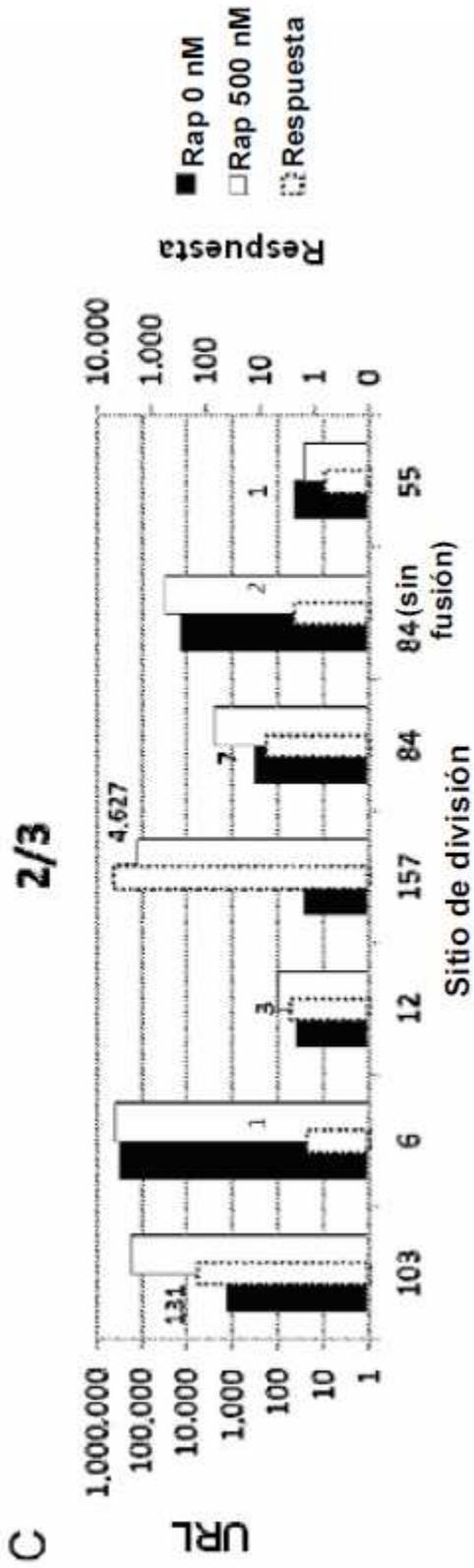


FIG. 76

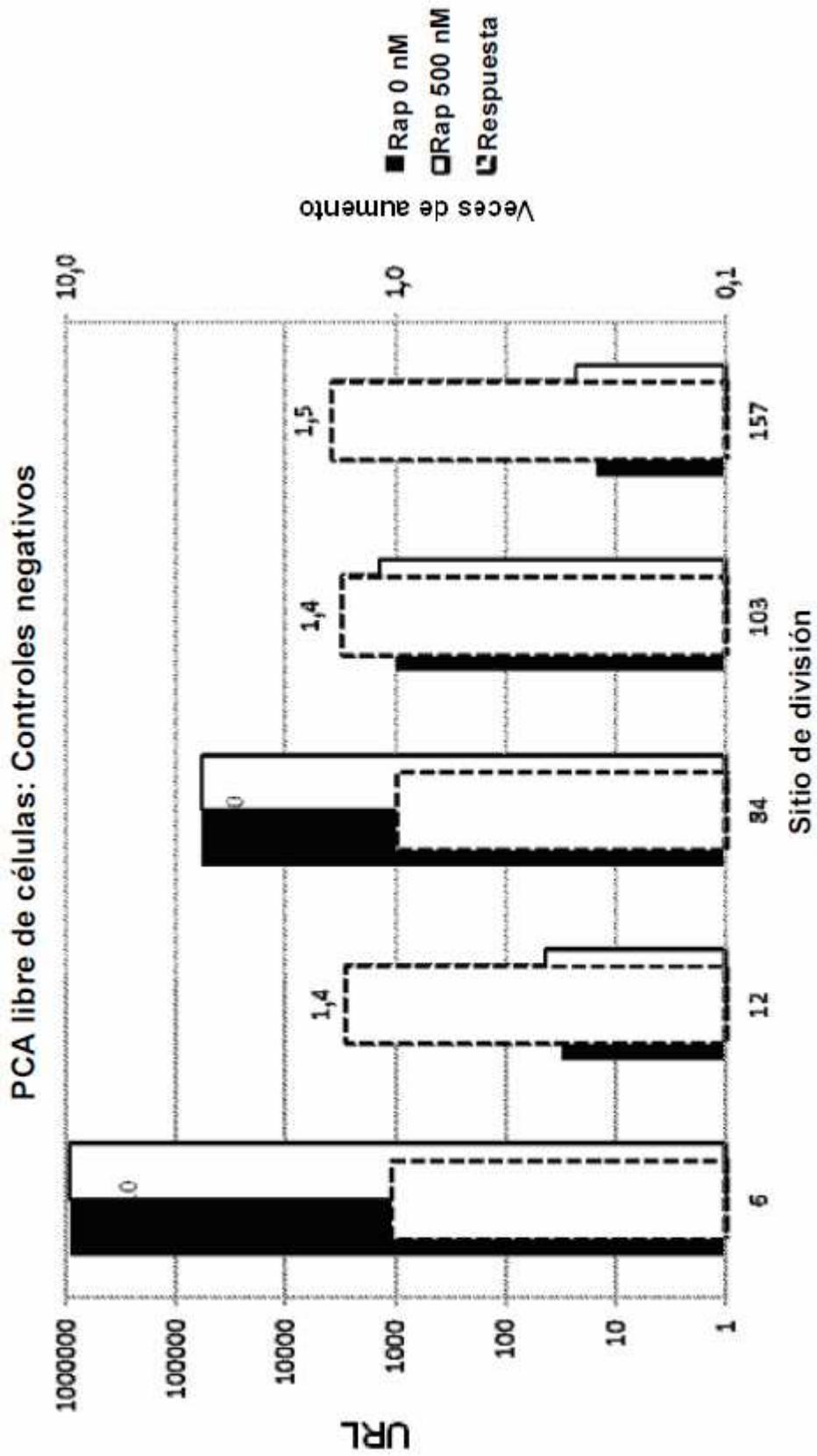


FIG. 76E

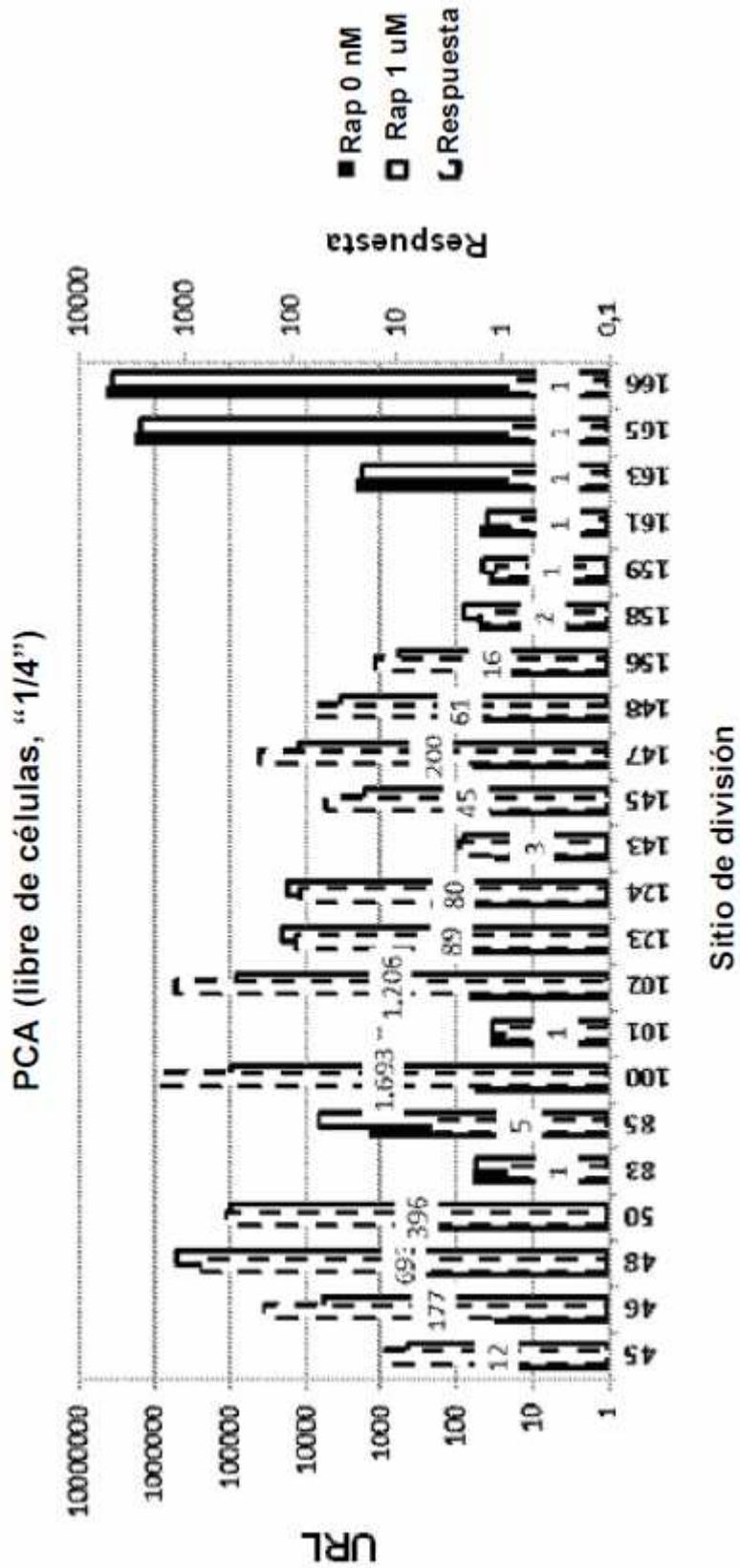


FIG. 76F

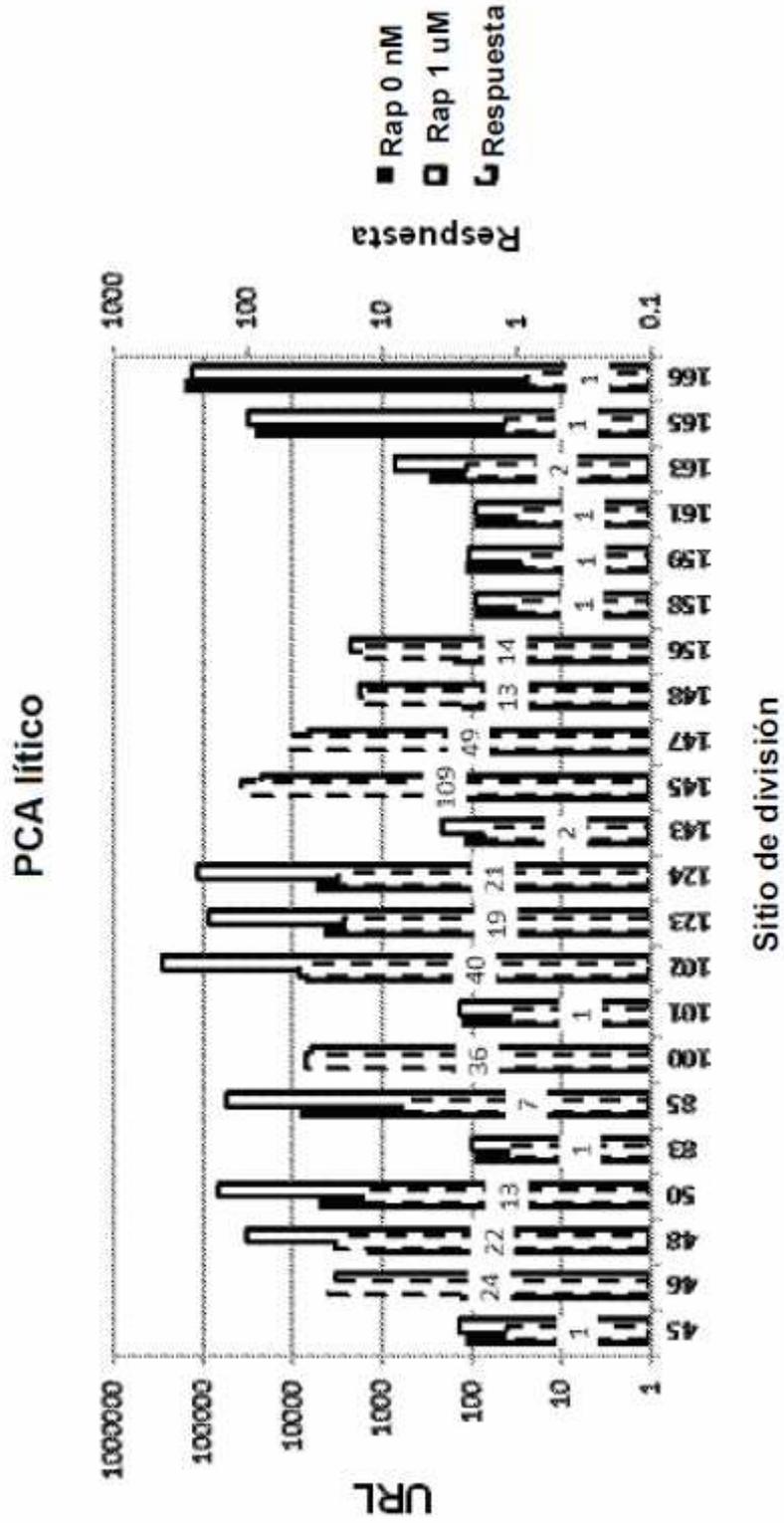


FIG. 76G

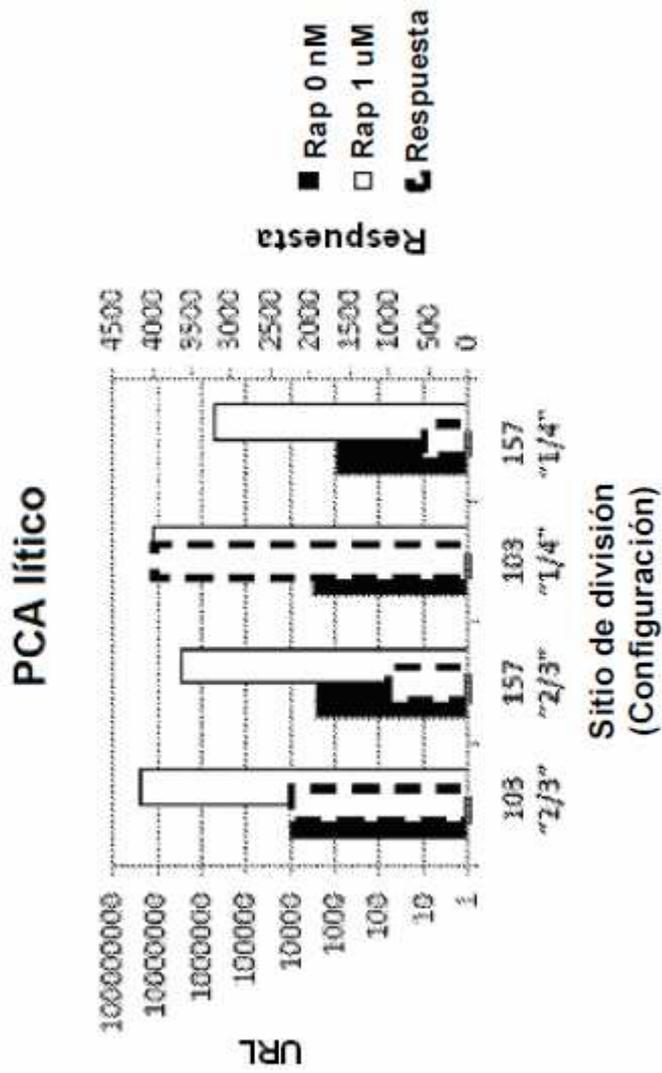


FIG. 76H

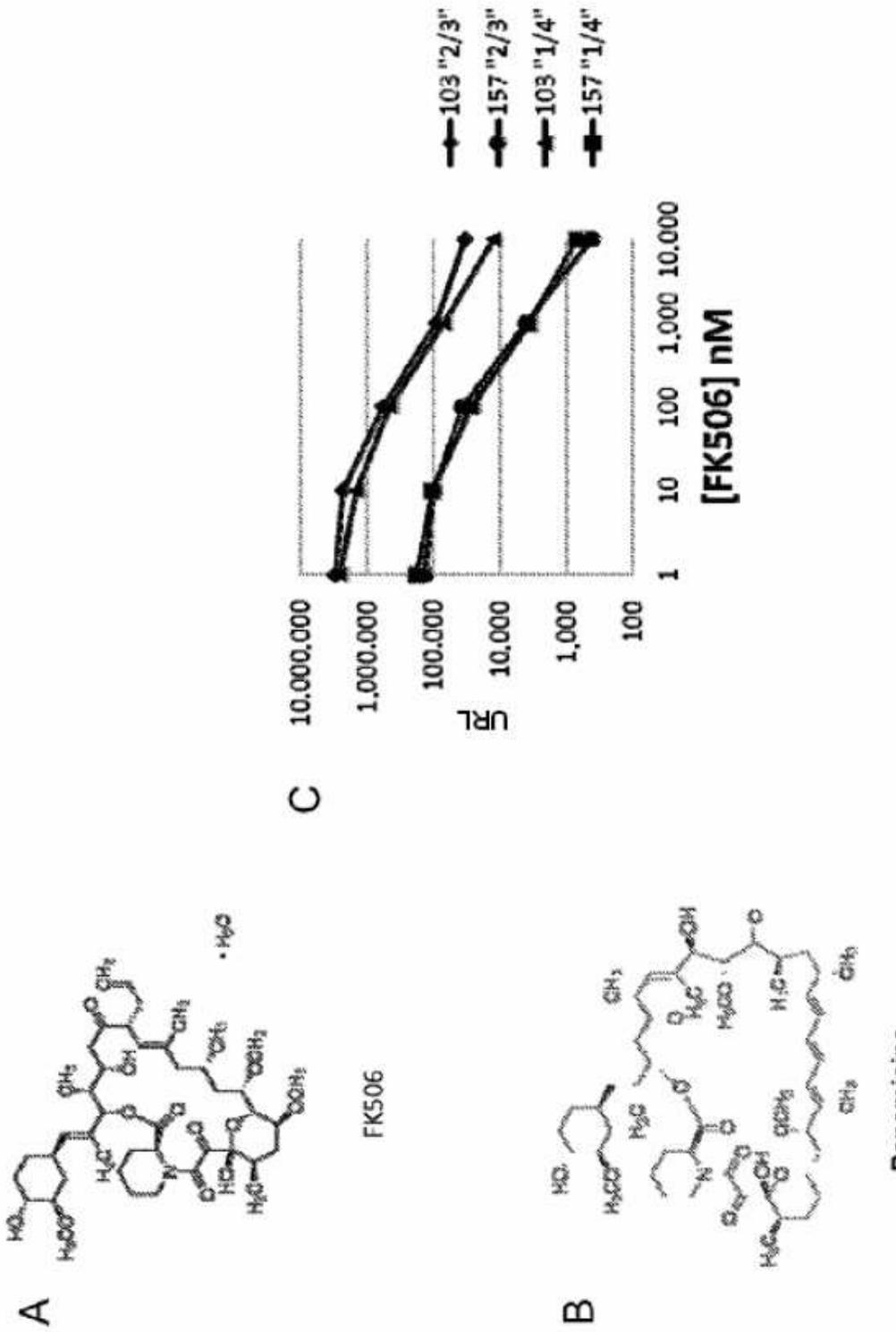


FIG. 77

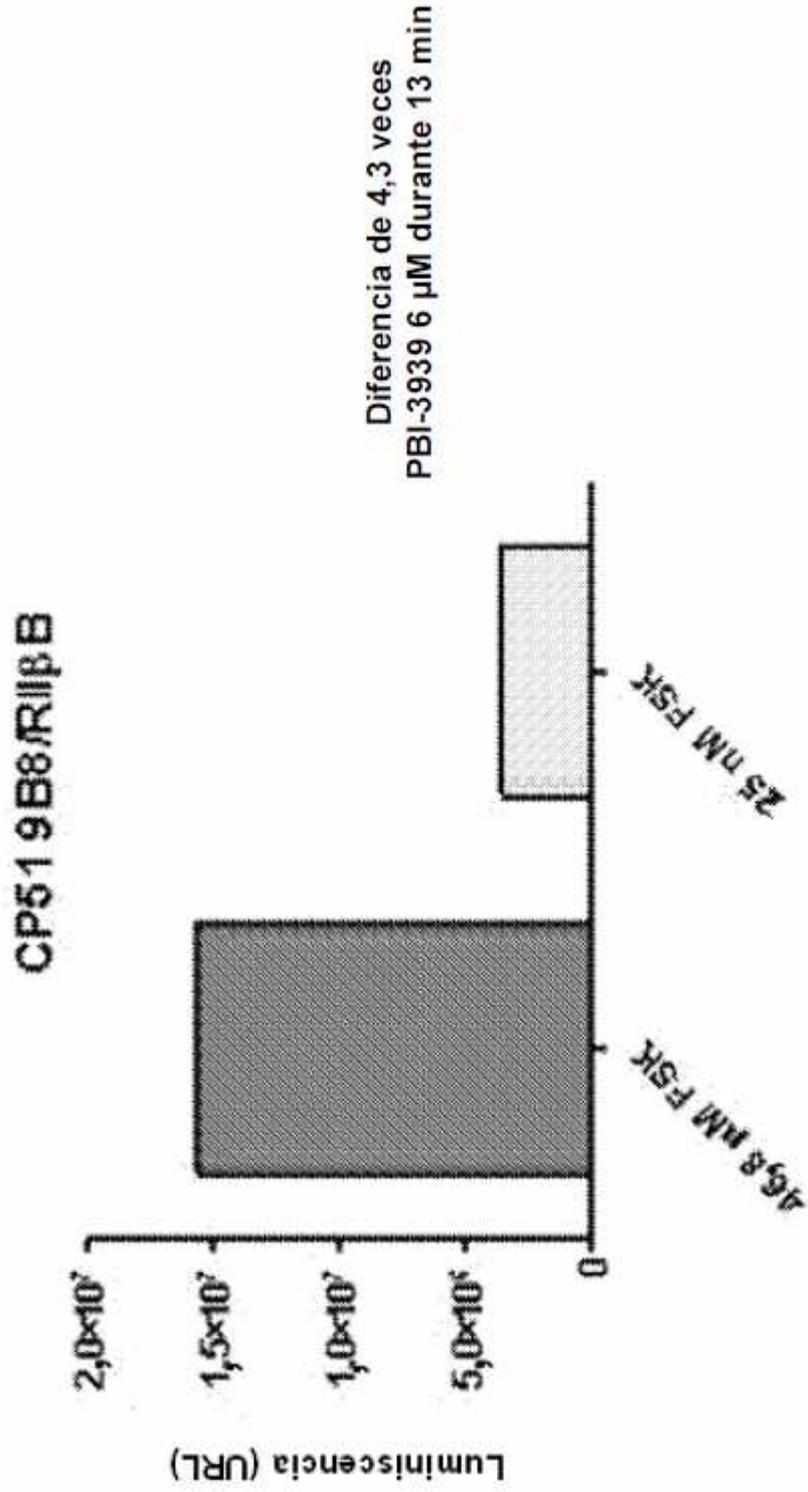
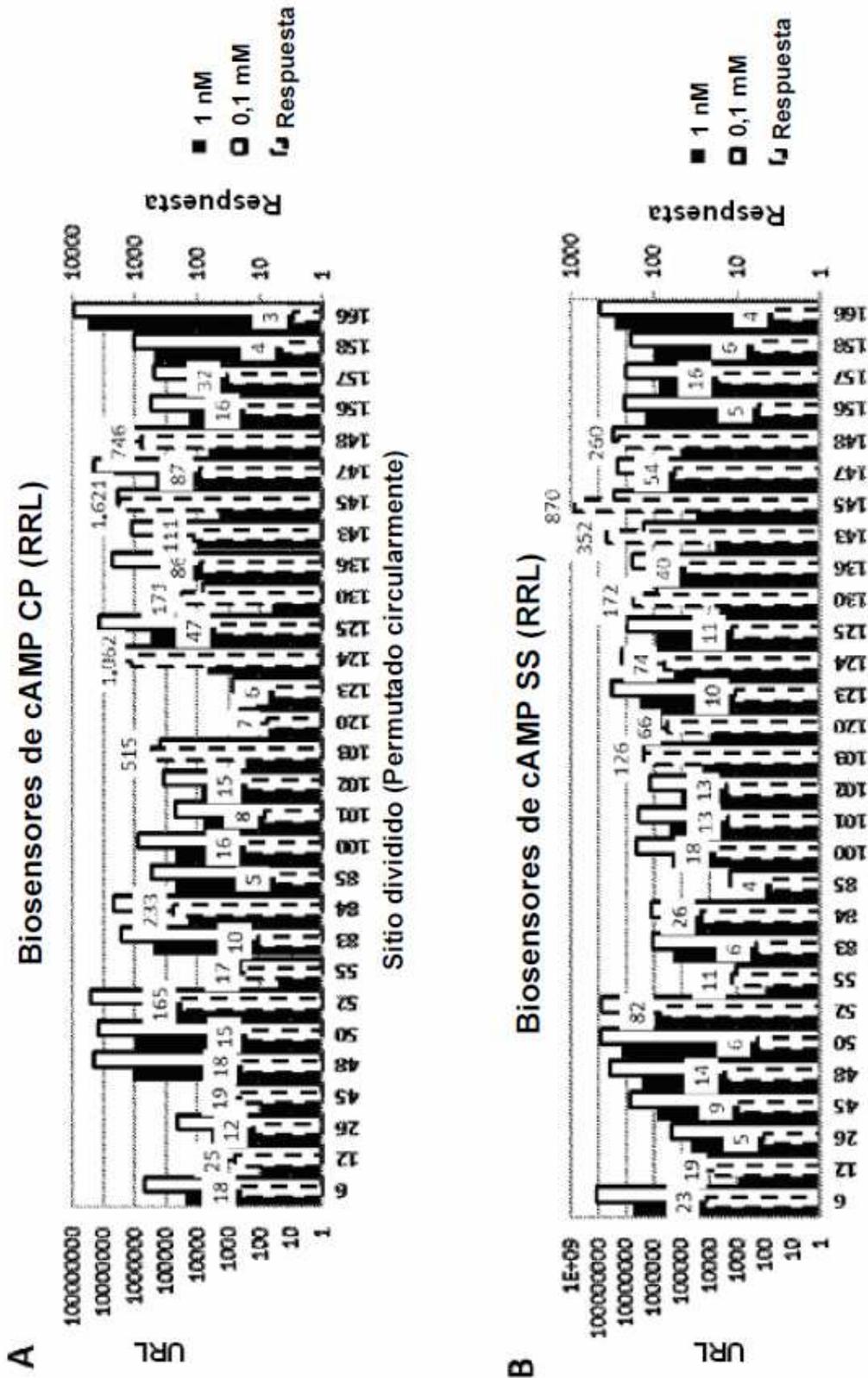
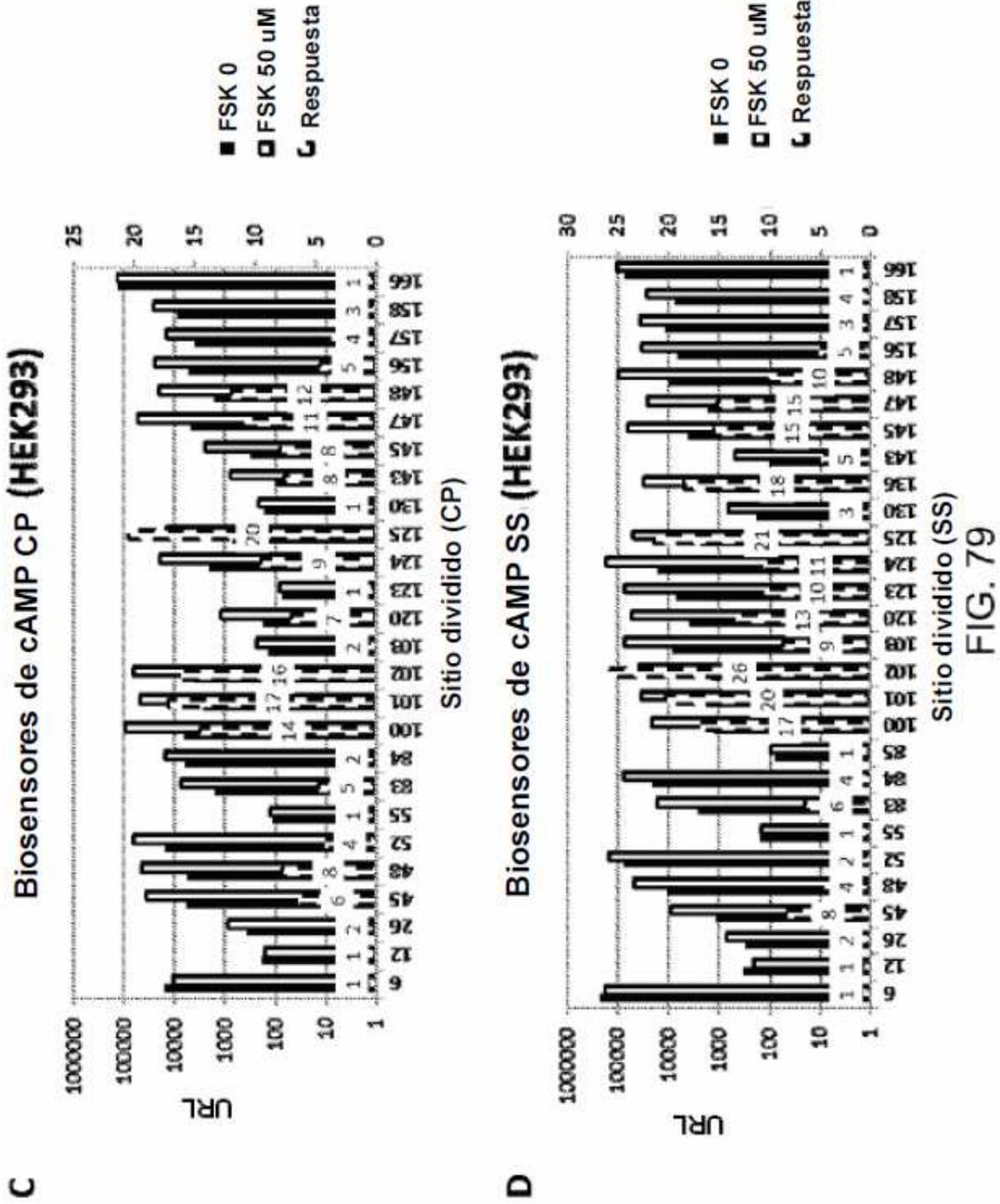


FIG. 78



Sitio dividido (División lineal)

FIG. 79



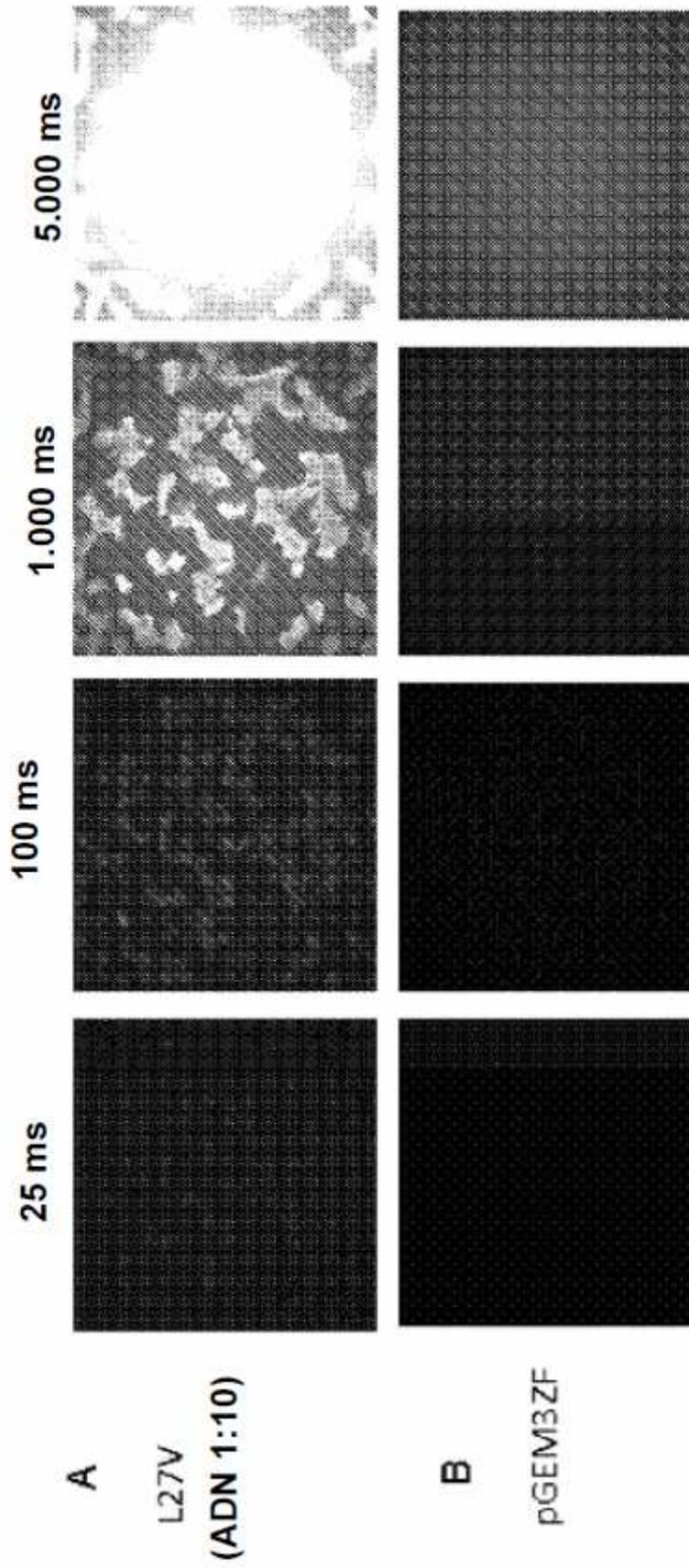


FIG. 80

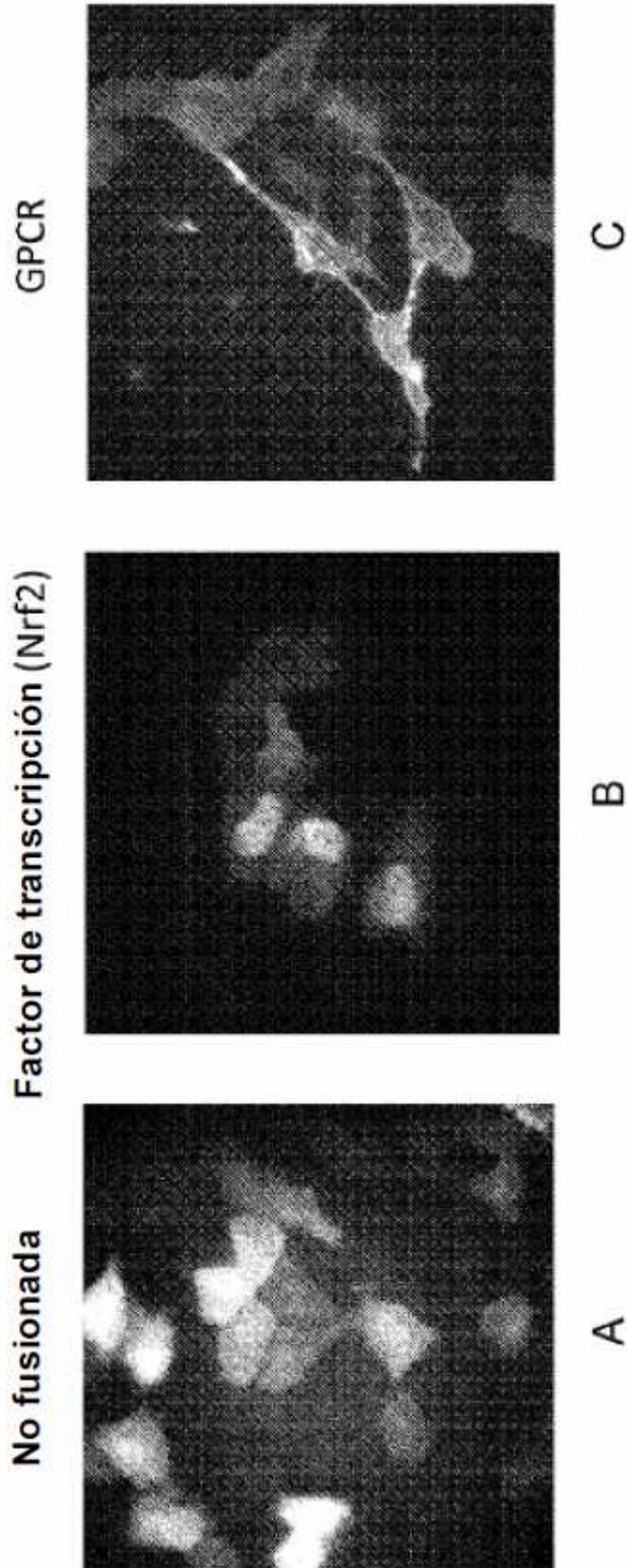


FIG. 81

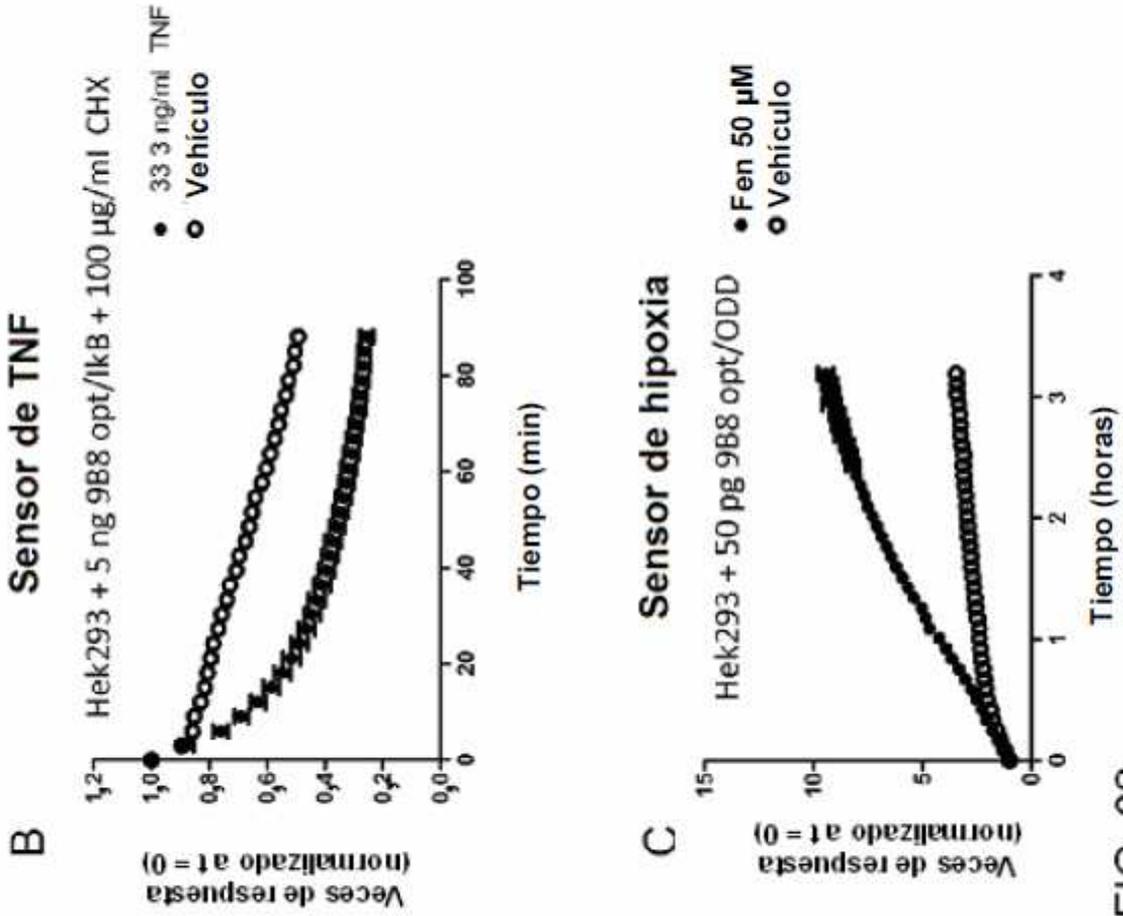


FIG. 82

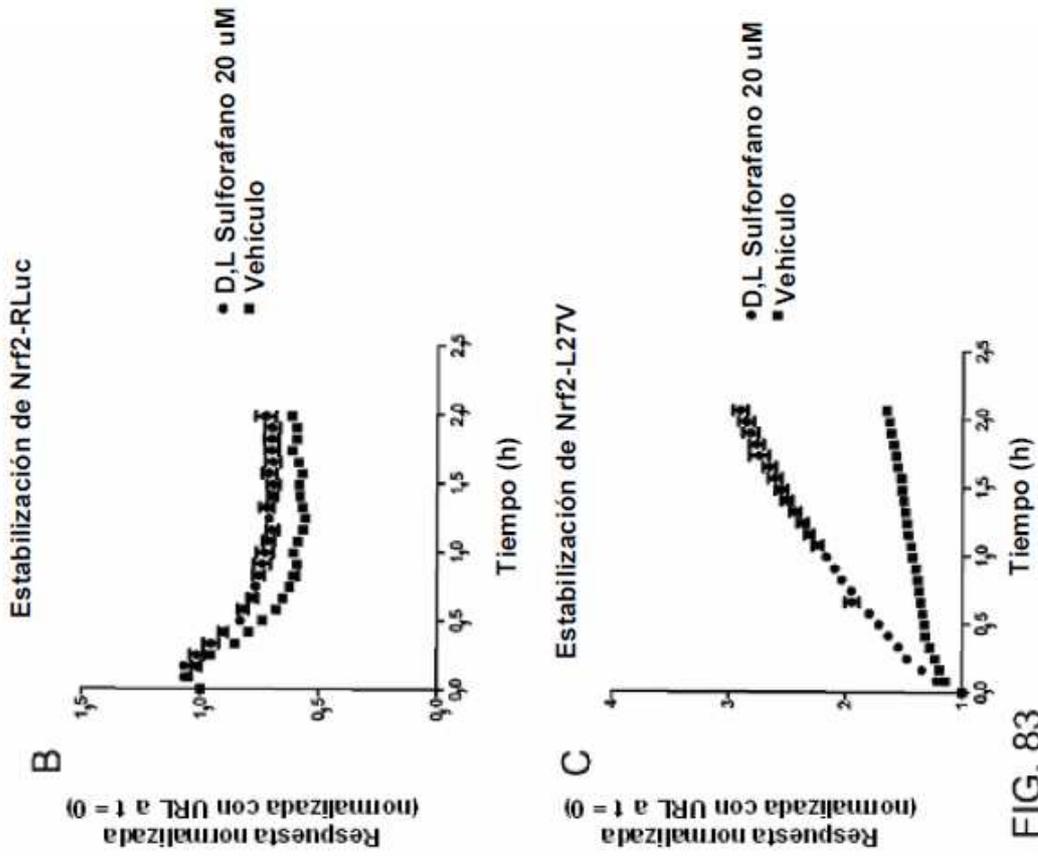
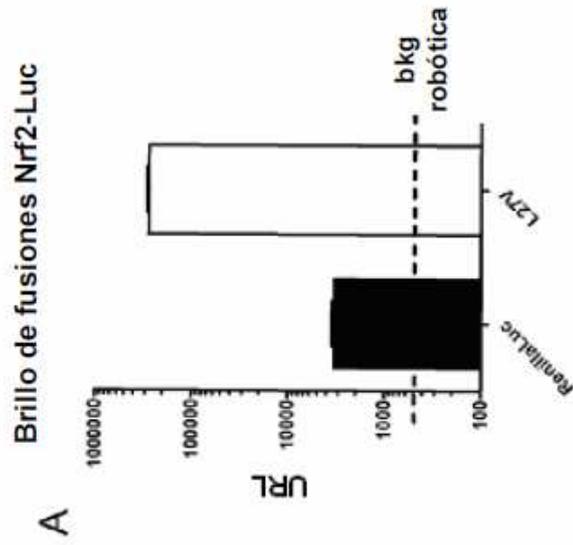


FIG. 83



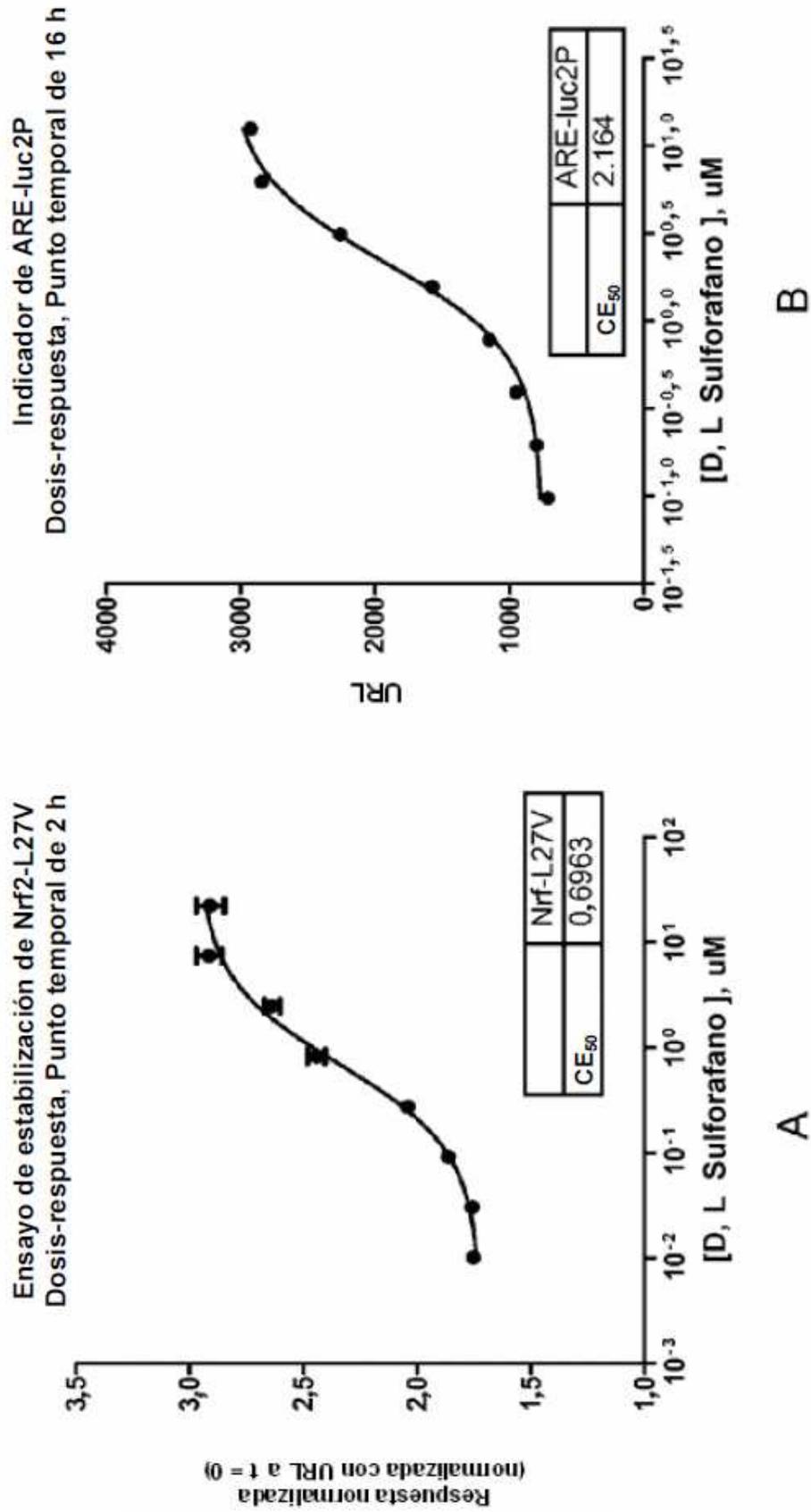
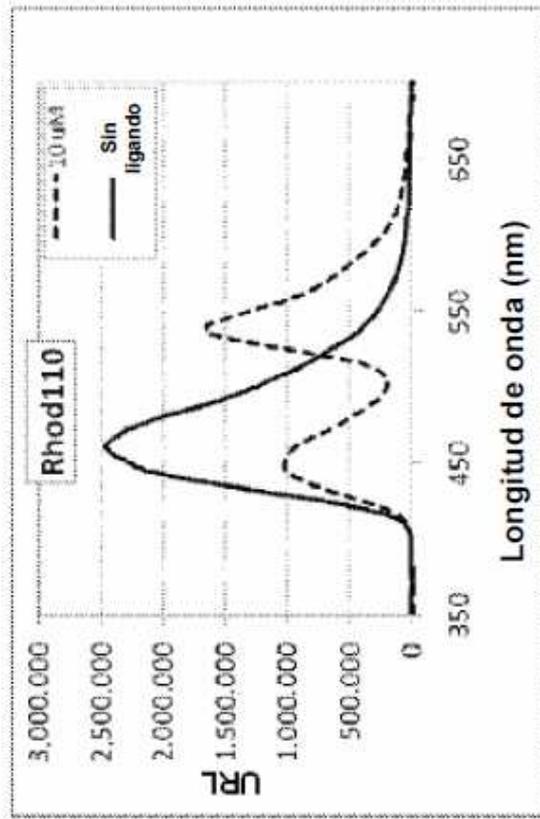
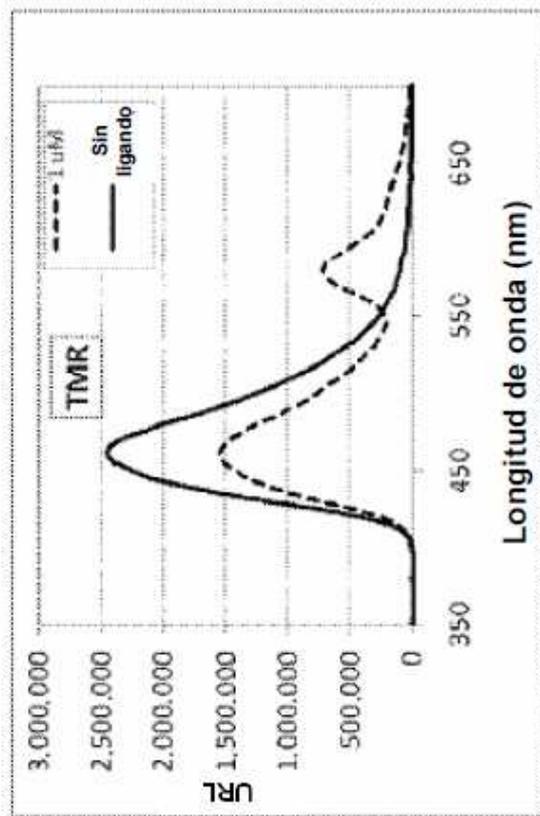


FIG. 84



A



B

FIG. 85

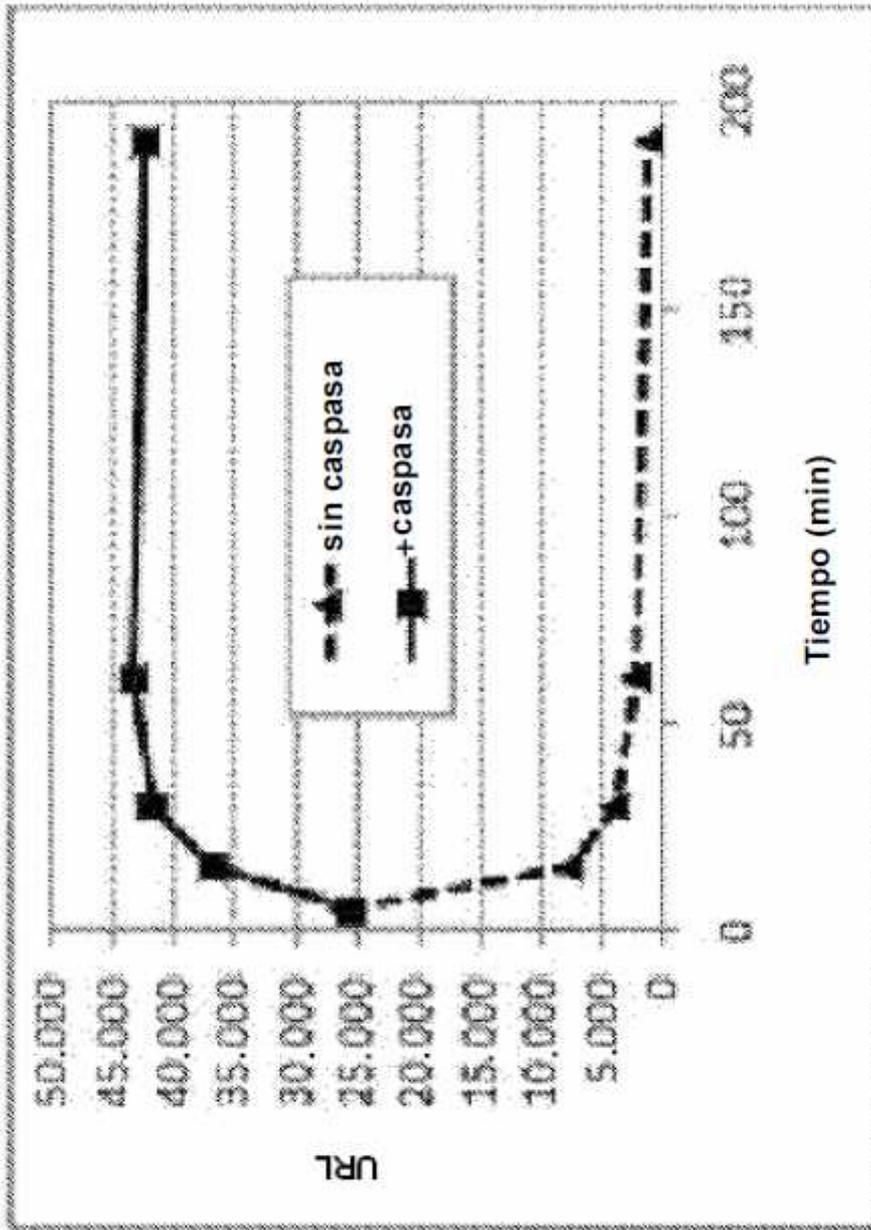


FIG. 86

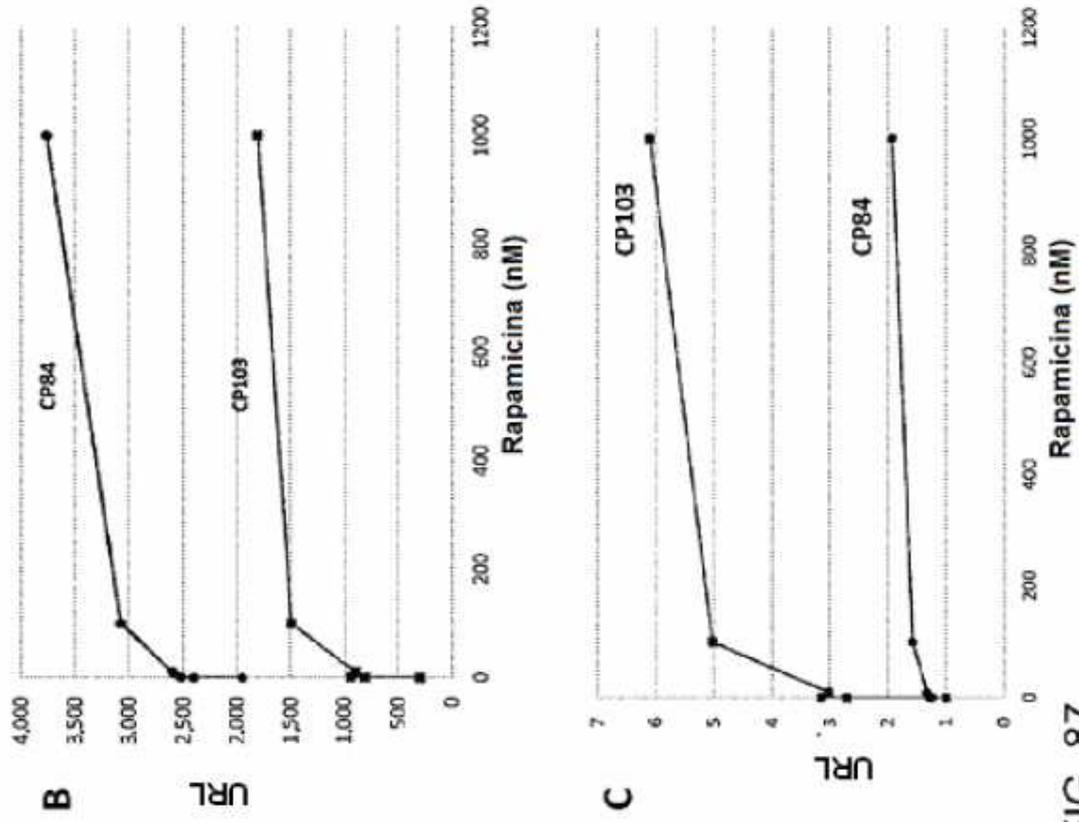


FIG. 87

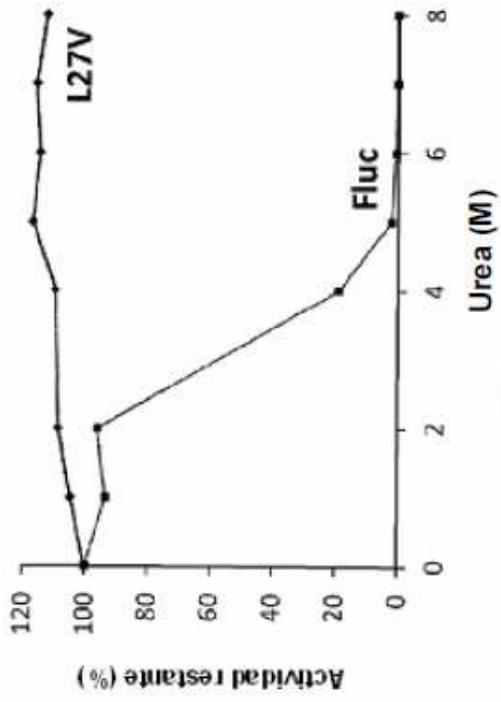


FIG. 88

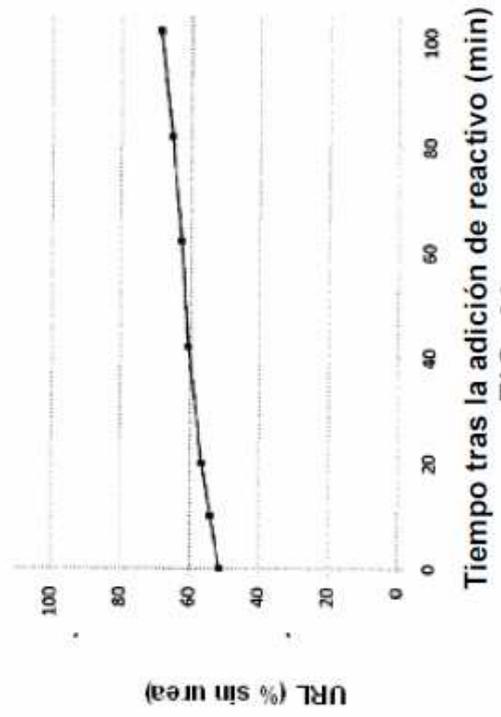
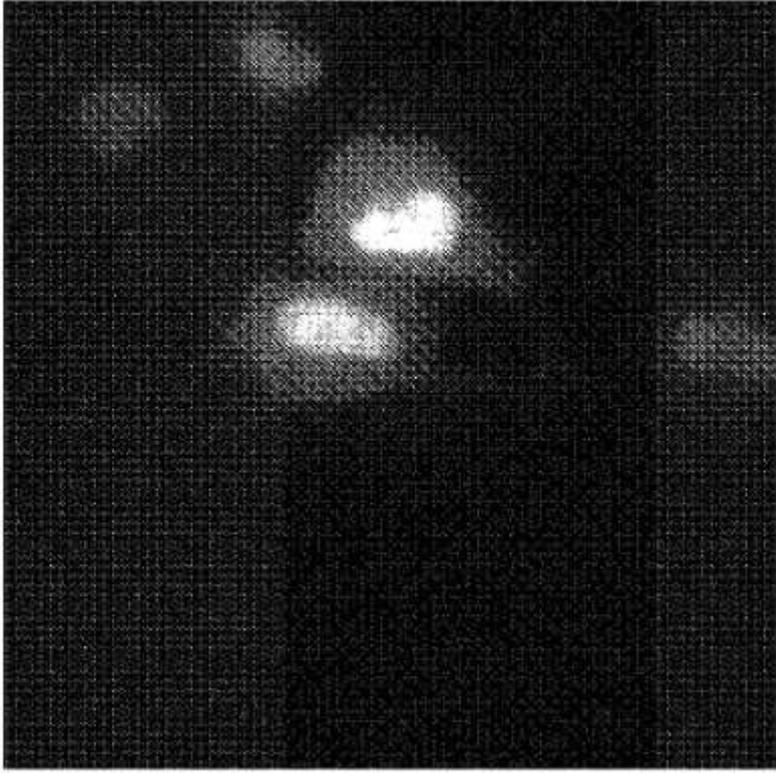


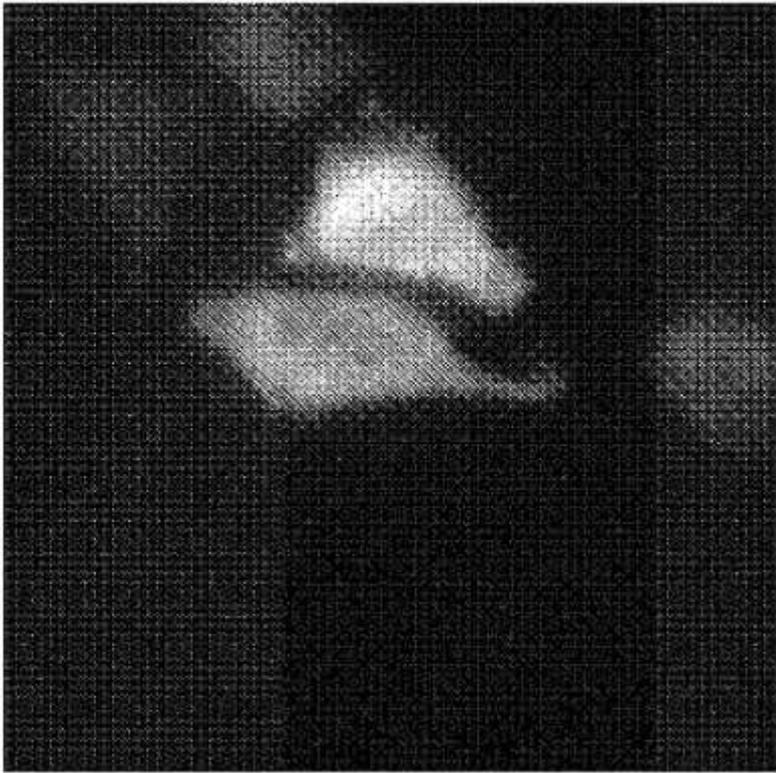
FIG. 89

+Dexametasona, 13 min



B

+ Dexametasona, 0 min



A

FIG. 90

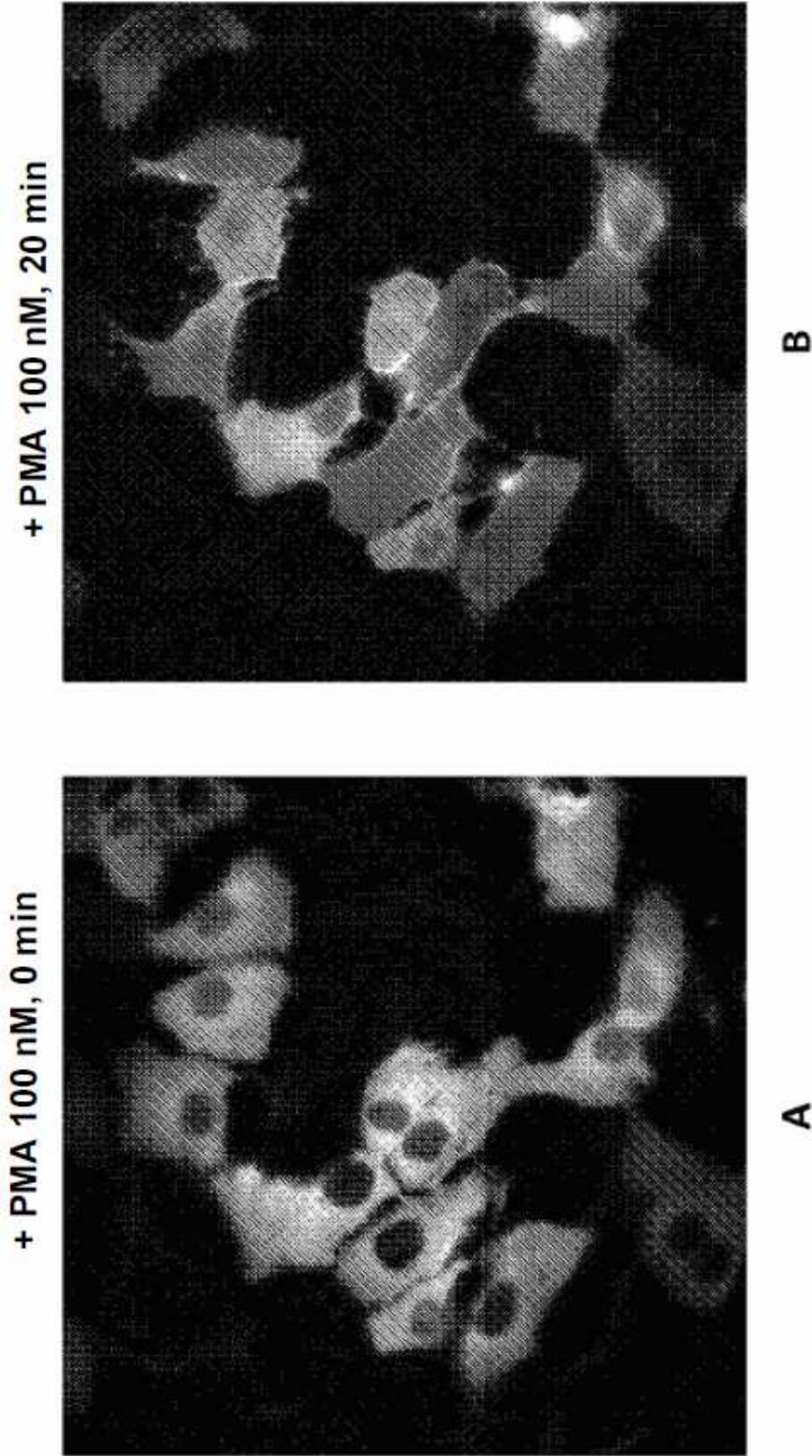


FIG. 91

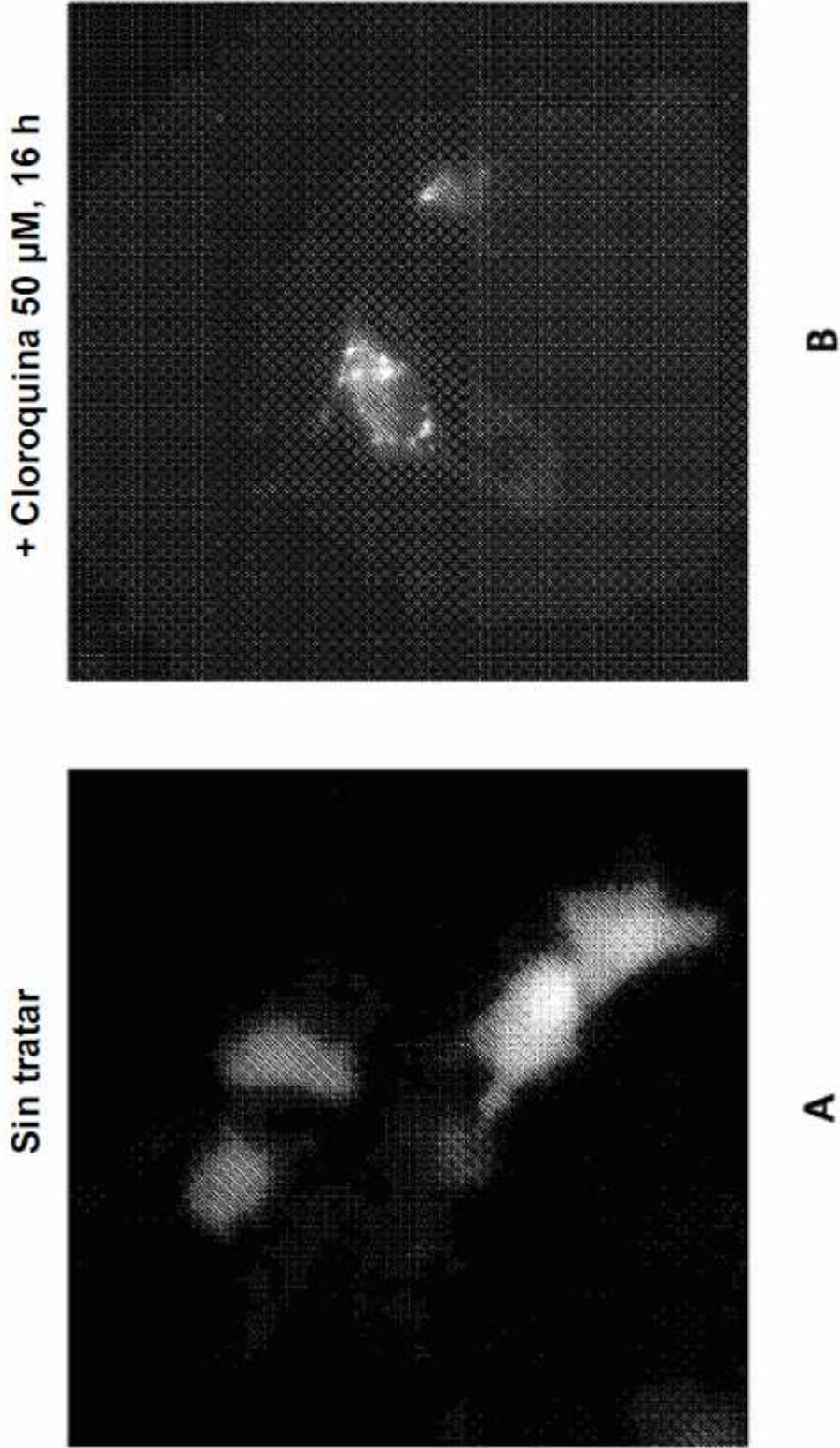


FIG. 92