

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 181**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2010 PCT/GB2010/050018**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10079357**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2010 E 10700590 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2385988**

54 Título: **Sistema rápido de detección de bioluminiscencia**

30 Prioridad:

07.01.2009 GB 0900151

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

31.10.2016

73 Titular/es:

**THE SECRETARY OF STATE FOR HEALTH
(100.0%)**

**Richmond House, 79 Whitehall
London SW1A 2NS, GB**

72 Inventor/es:

**SUTTON, MARK, J.;
POOLMAN, TORYN y
HESP, RICHARD, J.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 588 181 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

Sistema rápido de detección de bioluminiscencia

5 **[0001]** La presente invención se refiere al campo de los sistemas rápidos de detección de bioluminiscencia, en particular a sistemas de detección de bioluminiscencia rápidos y muy sensibles para la detección de la actividad de quinasas reporteras. También se proporcionan ensayos bioluminiscentes, dispositivos y kits para detectar la actividad de quinasas reporteras.

10 **[0002]** El uso de quinasas como enzimas reporteras se ha descrito en la técnica. A modo de ejemplo, los presentes inventores han descrito el uso de quinasas reporteras en sistemas de diagnóstico para detectar la presencia de un analito en una muestra (ver WO00/46357), y también en sistemas para validar la eficacia de procesos de descontaminación (ver WO2005/09308). La actividad de estas quinasas reporteras típicamente se detecta usando un sistema de bioluminiscencia de ATP (por ejemplo, luciferina-luciferasa), que genera una señal de emisión de luz.
15 La emisión de luz generada se mide utilizando un luminómetro, y estas mediciones se correlacionan a continuación con la cantidad de actividad quinasa.

[0003] Un problema potencial asociado con los sistemas de quinasas reporteras es el tiempo requerido para obtener la señal de salida. Hasta la fecha, el tiempo típico requerido para obtener una señal de salida varía de 30 minutos hasta varias horas. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de un sistema reportero más rápido y/o simplificado.

[0004] Uno o más de los problemas anteriormente mencionados se resuelve por la presente invención, que, en un primer aspecto, proporciona un ensayo para detectar la actividad de una quinasa reportera, que comprende:

25 (i) añadir dicha quinasa reportera a una mezcla de ensayo, en la que dicha quinasa reportera se pone en contacto con ADP, y, no más de 5 minutos después de haber sido puesta en contacto con ADP, dicha quinasa reportera se pone en contacto con un reactivo bioluminiscente, en el que, antes de ponerse en contacto la quinasa reportera con ADP, la mezcla de ensayo está sustancialmente libre de quinasa no reportera (es decir, quinasa que no es quinasa reportera); y

30 (ii) detectar la emisión de luz de la mezcla de ensayo.

[0005] En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende además la etapa de registrar los datos de emisión de luz obtenidos en la etapa (ii) en un soporte de datos adecuado.

35 **[0006]** En otra realización de la presente invención, la quinasa reportera se pone en contacto con el reactivo bioluminiscente no más de 2 minutos, no más de 1 minuto, no más de 30 segundos, o no más de 10 segundos, después de ponerse en contacto con el ADP. En otra realización, la quinasa reportera se pone en contacto simultáneamente con el ADP y el reactivo bioluminiscente.

40 **[0007]** Por lo tanto, no existe período de incubación significativo (o sólo un periodo de incubación muy corto) entre el contacto de la quinasa reportera con el ADP y el contacto con el reactivo bioluminiscente. Por tanto, se puede decir que la presente invención emplea un proceso de detección bioluminiscente de "una etapa".

45 **[0008]** A diferencia del sistema de detección rápido anterior, los sistemas reporteros convencionales emplean típicamente un proceso de detección de "dos etapas":

Catalizada por quinasa



50

Catalizada por luciferasa



55 **[0009]** En la primera etapa, las quinasas reporteras se exponen a una fuente de sustrato de ADP, y se incuban durante un tiempo suficiente para permitir la generación de ATP [1]. A continuación, en una segunda etapa, separada, se añade el reactivo luciferina/luciferasa para convertir el ATP generado por la quinasa reportera en luz [2]. Este ensayo bioluminiscente de "dos etapas" se ha demostrado que proporciona una detección de quinasa precisa. Sin embargo, su naturaleza de "dos etapas" (es decir, la adición de ADP, incubación, y a continuación, adición por separado del reactivo bioluminiscente) ha resultado ser engorrosa y lenta cuando la detección se lleva a cabo "en el campo", y no en un entorno de laboratorio.

60 **[0010]** Hasta la fecha, las dos etapas de reacción (ilustradas anteriormente) se han considerado incompatibles, ya que el AMP generado durante la etapa [2] impulsa el equilibrio de la etapa [1] sobre el lado izquierdo, favoreciendo de este modo la reconversión de ATP generado en la etapa [1] en ADP. Dado que la salida de señal de luz del sistema depende de la presencia de ATP, esto hace que la detección de la actividad de quinasa sea más difícil. Por

lo tanto, hasta la fecha, las etapas [1] y [2] se han separado, ya sea temporalmente (es decir, mediante la inclusión de una etapa de incubación tal como se ha descrito anteriormente), o espacialmente (es decir, donde las reacciones se llevan a cabo en compartimentos separados).

5 **[0011]** Contrariamente a este dogma, los presentes inventores han encontrado que las etapas de reacción [1] y [2] pueden realizarse, de hecho, de forma simultánea, sin ningún efecto adverso significativo en la sensibilidad de la detección de las quinasas reporteras. El ensayo bioluminiscente de "una etapa" resultante ofrece ventajas significativas en términos de velocidad y conveniencia, y es particularmente ventajoso en las pruebas de diagnóstico de punto de atención, e indicadores rápidos de liberación de proceso, es decir, para la detección de la actividad de quinasas en el campo en lugar de en el laboratorio.

15 **[0012]** Además, con el fin de garantizar una alta sensibilidad y exactitud de la detección, los presentes inventores han encontrado que es ventajoso asegurarse de que, antes de la adición de cualquier ADP, la muestra que contiene la quinasas reportera está sustancialmente libre de cualquier actividad de quinasas no reportera (es decir, contaminante), y/o cualquier ATP endógeno. Como será evidente a partir de los esquemas de reacción anteriores, la presencia de cualquiera de estos contaminantes significativamente puede afectar negativamente a la sensibilidad/exactitud de la detección de la actividad de quinasas. A modo de ejemplo, las quinasas no reporteras pueden convertir ADP en ATP y así generar una señal de emisión de luz falsa (o aumentada). Por lo tanto, se ha encontrado ventajoso tratar la muestra que contiene la quinasas reportera para eliminar o inactivar cualquier quinasas no reportera y/o cualquier ATP endógeno.

25 **[0013]** En una realización de la presente invención, se elimina y/o inactiva la quinasas no reportera utilizando una o más de las etapas de tratamiento descritas a continuación. En este sentido, las quinasas no reporteras preferidas que se inactivan o se eliminan de acuerdo con la presente invención son quinasas de mamífero, fúngicas y/o de plantas (por ejemplo, una adenilato quinasas de mamífero, fúngica o de planta). Estos tratamientos pueden utilizarse en cualquier número (preferiblemente uno o más, o al menos dos, o al menos tres) y/o en cualquier combinación. En todos los casos, sin embargo, el tratamiento deja la quinasas reportera sustancialmente intacta (por ejemplo, activa en términos de actividad de quinasas). Se pueden aplicar una cualquiera o más de las siguientes etapas de tratamiento a cualquier aspecto de la presente invención.

30 **[0014]** En una realización, la quinasas no reportera es inactivada mediante la exposición a una temperatura de entre 50 a 120°C durante un período de entre 1 y 30 minutos, por ejemplo 90°C durante 10 minutos, 90°C durante 3 minutos, 90°C durante 1 minuto, 120°C durante 3 minutos, o 120°C durante 1 minuto. La temperatura y duración del proceso de inactivación desnaturalizan la quinasas no reportera dejando la actividad de la quinasas reportera sustancialmente intacta.

35 **[0015]** En una realización adicional, la quinasas no reportera se elimina/inactiva utilizando un tratamiento de desnaturalización química. Ejemplos de tratamientos adecuados incluyen la exposición a un agente caotrópico, tal como urea (por ejemplo, concentraciones mayores de 2 M de urea) o guanidina (por ejemplo, concentraciones mayores de 1M de guanidina), la exposición a un detergente (por ejemplo, mayor que 0,5% de SDS, sarcosilo o Triton X-100), la exposición a un generador de radicales libres (por ejemplo, más de 1000 ppm de cloro activo derivado de hipoclorito de sodio o reactivos equivalentes) o la exposición a un tratamiento oxidativo.

40 **[0016]** En otra realización, la quinasas no reportera se elimina/inactiva utilizando un tratamiento de desnaturalización enzimática. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen proteasas muy procesables, tales como por ejemplo Prionzyme®, Properase®, proteinasa-K, y termolisina.

45 **[0017]** En una realización adicional, la quinasas no reportera se elimina/inactiva por exposición a un pH seleccionado (por ejemplo, por debajo de pH 4, o por encima de pH 11 utilizando tampones, tales como CAPS 50 mM pH 11), una concentración de sal seleccionada (por ejemplo, más de 2M de sulfato de amonio), EDTA, o combinaciones de los mismos.

50 **[0018]** En una realización adicional, la quinasas no reportera se elimina/inactiva mediante la adición de un inhibidor, que inhibe selectivamente o específicamente la quinasas no reportera (es decir, el inhibidor inactiva la quinasas no reportera, dejando la actividad de la quinasas reportera sustancialmente intacta). Ejemplos de inhibidores adecuados incluyen: estaurosporina; vanadato (por ejemplo, ortovanadato o decavanadato); glicerofosfato; diadenosinofosfatos, tales como Ap6A (diadenosinhexafofosfato), Ap5A (diadenosinpentafofosfato), Ap4A (diadenosintetrafofosfato), y/o Ap3A (diadenosintrifosfato); vitamina C; AMP-PCP; AMP-PNP; AMP-S; ATP-γS; y Ara-ATP. Los inhibidores competitivos de quinasas no reporteras (por ejemplo, de la adenilato quinasas no reportera) son preferidos (por ejemplo, inhibidores de diadenosinofosfato, tales como Ap4A y/o Ap5A). En una realización, el inhibidor inhibe selectivamente o específicamente quinasas no reporteras de mamífero y hongos (por ejemplo, levadura) y de plantas. En otra realización, el inhibidor (por ejemplo, Ap5A) inhibe selectivamente o específicamente quinasas no reporteras de mamífero y fúngicas (por ejemplo, levadura). En una realización adicional, el inhibidor (por ejemplo, Ap4A y/o Ap6A) inhibe selectivamente o específicamente quinasas no reporteras de mamíferos.

65

[0019] Los inhibidores pueden determinarse empíricamente, por ejemplo, para diferentes muestras o matrices. Por ejemplo, se ha observado experimentalmente que una gama de diferentes inhibidores proporcionan discriminación entre una quinasa reportera (por ejemplo, una quinasa de *S.acidocaldarius*, *T.maritima*, o *Chlamydia pneumoniae*) y una quinasa no reportera, tal como una quinasa derivada de tejido de mamífero como se representa por adenilato quinasa de músculo de conejo (Figura 4 y Figura 7). Por lo tanto, en una realización, el uso de uno o más inhibidores, tales como Ap4A, Ap5A y/o Ap6A, reduce sustancialmente la actividad de la quinasa no reportera (por ejemplo, quinasa derivada de tejido endógeno, tal como la adenilato quinasa). Las concentraciones empleadas de inhibidor están típicamente en el intervalo micromolar bajo y no tienen ningún efecto significativo sobre una quinasa reportera. A modo de ejemplo adicional, Ap5A discrimina quinasa reportera de quinasa no reportera (por ejemplo, adenilato quinasa fúngica) representada aquí por la enzima de *Saccharomyces cerevisiae*. En esta base, la selección de inhibidor puede basarse tanto en la naturaleza de la quinasa reportera como en la base (es decir, quinasa no reportera) de la muestra.

[0020] Ejemplos de aplicaciones adecuadas de quinasa reportera de la presente invención se ilustran en la Tabla 1 (a continuación). También se muestran ejemplos de quinasas no reporteras contaminantes que se encuentran normalmente en dichas aplicaciones. La tabla 1 también enumera, solamente a modo de ejemplo, una selección de inhibidores que se pueden emplear (por ejemplo, mediante la adición de tampones para la preparación de la muestra) en el contexto de la presente invención.

Ejemplo de quinasa reportera	Ejemplo de quinasa no reportera	Ejemplo de inhibidor	Utilidad
Quinasa bacteriana (por ejemplo, AK.); por ejemplo, de <i>Chlamydia pneumonia</i>	Tejido, célula o muestra derivada de mamífero	Inhibidor de quinasa de mamífero (por ejemplo, Ap4A, Ap5A y/o Ap6A)	Detección de infección bacteriana en un paciente
Quinasa bacteriana (por ejemplo, AK.); por ejemplo, de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	Tejido, célula o muestra derivada de mamífero	Inhibidor de quinasa de mamífero (por ejemplo, Ap4A, Ap5A y/o Ap6A)	Detección de patógenos bacterianos viables en un modelo de cultivo celular
Quinasa de Archaea (por ejemplo, AK.); por ejemplo, de <i>S. acidocaldarius</i>	Tejido, célula o muestra derivada de mamífero	Inhibidor de quinasa de mamífero (por ejemplo, Ap4A, Ap5A y/o Ap6A)	Detección de un analito en una muestra de paciente
Quinasa bacteriana (por ejemplo, AK.); por ejemplo, de <i>Thermotoga maritima</i>	Células o cultivo derivado de hongo	Inhibidor de quinasa fúngica (por ejemplo, Ap5A)	Detección de contaminante bacteriano en un recipiente de elaboración de la cerveza
Quinasa fúngica (por ejemplo, AK.); por ejemplo, de <i>S. cerevisiae</i>	Tejido, célula o muestra derivada de mamífero	Inhibidor de quinasa de mamífero (por ejemplo, Ap4A y/o Ap6A)	Detección de un contaminante fúngico en un cultivo de tejido
Quinasa bacteriana (por ejemplo, AK.); por ejemplo, de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tejido, célula o muestra derivada de planta	Inhibidor de quinasa de planta (por ejemplo, Ap4A y/o Ap5A)	Detección de un contaminante bacteriano en un cultivo de células vegetales
Quinasa fúngica (por ejemplo, AK.); por ejemplo, de <i>Phytophthora ramorum</i>	Tejido, célula o muestra derivada de planta	Inhibidor de quinasa de planta (por ejemplo, Ap4A y/o Ap6A)	Detección de un patógeno fúngico en una planta
Quinasa de protozoo (por ejemplo, AK.); por ejemplo, de <i>Plasmodium falciparum</i>	Tejido, célula o muestra derivada de mamífero	Inhibidor de quinasa de mamífero (por ejemplo, Ap3A y/o Ap4A)	Detección de una infección de malaria en una muestra de sangre de paciente

[0021] En otra realización, la quinasa no reportera puede separarse de la quinasa reportera en base de su tamaño. A modo de ejemplo, la muestra que contiene la quinasa reportera se puede utilizar en un dispositivo de filtración, que separa la quinasa no reportera y la quinasa reportera en base al tamaño, reteniendo la quinasa reportera en un filtro adecuado, mientras que la quinasa no reportera pasa a través (véase, por ejemplo, el ejemplo 14 y la figura 6). Esto puede lograrse mediante el acoplamiento de la quinasa reportera a una partícula o dentro de una vesícula que es retenida preferentemente por el filtro. En cualquiera de los casos, la adherencia de la quinasa reportera al filtro no da lugar a la pérdida significativa de la actividad de quinasa reportera. Las matrices de filtro adecuadas incluyen: filtros de nitrocelulosa, acetato de celulosa o papel. Las matrices de filtro emplean típicamente un intervalo de tamaños de poro, tales como de 0,2 µm a 20 µm o mayor dependiendo de la naturaleza del portador particulado empleado.

[0022] El tamaño físico también puede usarse como base para la separación de la quinasa no reportera de la quinasa reportera utilizando filtración en gel o cromatografía de exclusión por tamaño. En una realización, la quinasa reportera tiene un peso molecular más bajo que la quinasa no reportera. En otra realización, la quinasa reportera tiene un peso molecular más alto que la quinasa no reportera. A modo de ejemplo, la quinasa reportera puede tener un peso molecular de al menos 40 a 80 kDa, mientras que la quinasa no reportera puede tener un peso molecular de no más de 30 kDa. Cuando se utiliza una resina de exclusión de tamaño o membrana, esto proporciona una

separación muy eficiente con la proteína mayor (por ejemplo, la quinasa reportera) que se desarrolla en o cerca del volumen vacío de la matriz (por lo tanto, corre rápidamente), mientras que la quinasa no reportera (por ejemplo, quinasa endógena, tal como quinasa de tejido de mamífero) interactúa con los poros de la matriz y se eluye más lentamente. Las quinasas reporteras de "peso molecular más alto" adecuadas se pueden obtener de fuentes de Archaeal (por ejemplo, enzimas de adenilato quinasa triméricas procedentes de fuentes de Archaean), que están en la región de 60 kDa en tamaño en comparación con la 21-22kDa de la quinasa no reportera contaminante (por ejemplo, quinasa endógena, tal como quinasa de tejido de mamífero). Además, el diferencial de tamaño entre la quinasa reportera y la quinasa no reportera puede mejorar mediante la adición de un fragmento de proteína o anticuerpo (por ejemplo, una región variable de anticuerpo de cadena sencilla (scFv), mediante conjugación química o fusión genética y expresión recombinante) a la quinasa reportera. Por ejemplo, una adenilato quinasa trimérica fusionada a una región variable de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) tiene un tamaño del orden de 120 kDa (en base a un tamaño de scFv de aproximadamente 20 kDa, unida a cada una de las tres subunidades).

[0023] En una realización adicional, la separación de la quinasa no reportera de la quinasa reportera se puede lograr mediante el uso de la carga de superficie. En una realización, el punto isoeléctrico de la quinasa reportera puede ser menor que el de la quinasa no reportera. En otra realización, el punto isoeléctrico de la quinasa reportera puede ser superior al de la quinasa no reportera. Por tanto, la quinasa reportera se puede separar de las quinasas no reporteras con la unión selectiva de la quinasa reportera o la quinasa no reportera a una matriz de intercambio catiónico o una matriz de intercambio aniónico a un pH adecuado. El punto isoeléctrico de la quinasa reportera está frecuentemente en el intervalo básico elevado; por ejemplo, la tAK de *S.acidocaldarius* tiene un pI predicho de 9,03 (aunque los inventores han demostrado que el pI real es superior a pH 10, véase la Tabla 2). Por el contrario, la mayoría de las quinasas no reporteras que podrían interferir con el ensayo tienen típicamente un punto isoeléctrico inferior, por ejemplo un pI en la región de pH 7. Por tanto, la quinasa reportera se puede separar de las quinasas no reporteras con la unión selectiva de la quinasa reportera mediante el uso de cualquiera de una resina de intercambio catiónico, membrana u otra matriz sólida a un pH de al menos 8, o el uso de una resina de intercambio aniónica, membrana u otra matriz sólida por encima de pH 10. Muchas de las quinasas reporteras de la presente invención retienen la actividad enzimática en este intervalo de pH. Alternativamente, las quinasas no reporteras se pueden separar selectivamente mediante la unión a matrices adecuadas, por ejemplo, una matriz de intercambio aniónico hasta pH 9.

[0024] En otra realización de la presente invención, la quinasa no reportera se puede separar de la quinasa reportera usando una técnica de "captura hidrófoba". Las quinasas reporteras (por ejemplo, las de la familia de *Sulfolobus*, y familias relacionadas con *Sulfolobus*, tales como *acidianus*, *metallophaera*, *stygiolobus*, y *sulfurisphaera*) muestran una unión excepcionalmente fuerte a una variedad de superficies, incluso cuando tales superficies son pretratadas o precubiertas (denominado "bloqueadas") con otras proteínas o agentes de bloqueo a base de detergentes. En cambio, el "bloqueo" de superficies impide sustancialmente la unión de quinasas no reporteras (por ejemplo, quinasas no reporteras de mamífero, fúngicas y/o de planta). Esta diferencia de propiedades de unión física permite una separación efectiva de la quinasa reportera de quinasas no reporteras contaminantes por adherencia sobre una superficie, realizándose la medición de la quinasa reportera en esa superficie después de la captura. Por ejemplo, el uso de una superficie de polipropileno de policarbonato, recubierta con cualquiera de los agentes de bloqueo utilizados habitualmente, albúmina de suero bovino (por ejemplo, BSA; 3% p/v en tampón neutro) o leche desnatada (por ejemplo, 5% p/v en tampón neutro), evitará completamente la unión de quinasas no reporteras (por ejemplo, quinasas endógenas, tales como quinasas de tejidos de mamíferos), pero no de la quinasa reportera. En este sentido, las quinasas reporteras triméricas, tales como las derivadas de *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus* y géneros relacionados son particularmente adherente en estas circunstancias.

[0025] Uno o más de los tratamientos anteriores para la eliminación/inactivación de la quinasa no reportera se pueden combinar para lograr o mejorar el efecto deseado. Esto puede significar que las concentraciones relativas de uno o más de los componentes químicos pueden reducirse en presencia del segundo componente. Por ejemplo, el nivel de urea necesaria para inactivar la quinasa no reportera puede ser alrededor de 2 M por sí sola, pero se puede reducir a 1 M en presencia de SDS al 0,5%, ya que ambos ejercen un efecto sobre las moléculas diana.

[0026] Algunos de los tratamientos anteriores también pueden tener otros efectos beneficiosos en el depurado de las muestras que se procesan y la disposición de un mayor acceso a las moléculas a detectar. En este sentido, una aplicación preferida de la presente invención es la detección de una infección microbiana en una muestra biológica. En consecuencia, la presente solicitud proporciona un ensayo microbiano de punto de atención sensible y rápido. La presente invención es particularmente adecuada para la detección rápida de infecciones bacterianas, virales y/o fúngicas en muestras biológicas, tales como las fuentes microbianas enumeradas en "quinasa reportera" en la Tabla 1. Infecciones microbianas adicionales incluyen las descritas en los ejemplos, tales como especies de hepatitis, especies de sarampión, especies de norovirus, especies de legionella, especies de clamidia, especies de listeria, especies de salmonella y especies de burkholderia. La presente invención facilita la detección de microorganismos en muestras de heces (por ejemplo, mediante la adición de urea y SDS), tanto en términos de muestras más uniforme como en la liberación de los antígenos microbianos de grupos o agregados. Del mismo modo, la adición de hipoclorito sódico a una muestra de heces puede simultáneamente esterilizar la muestra (minimizando la posibilidad de infecciones) y reducir la actividad de la quinasa no reportera.

[0027] El orden/tiempo preciso de las etapas para la separación de la quinasa no reportera no es crítico, siempre que estas etapas se lleven a cabo antes de que la quinasa reportera entre en contacto con ADP. Por lo tanto, pueden llevarse a cabo en la fase de preparación de la muestra, o durante el ensayo antes de que la quinasa reportera entre en contacto con ADP. En una realización, el tratamiento es en lugar de, o además de, una etapa de lavado.

Tabla 2: Resumen de propiedades de las quinasas reporteras (por ejemplo, AK)

Origen de adenilato quinasa (AK)	Estructura	PM	pl previsto/real (si se conoce)
<i>S.acidocaldarius</i>	Trímero	63330 (3x21110)	9,03/> 10
<i>S.solfataricus</i>	Trímero	63975 (3x21325)	8,31
<i>P. furiosus</i>	Trímero	70602 (3x23534)	9,10
<i>A. permix</i>	Trímero	70149 (3x23383)	9,31
<i>T. maritima</i>	Monómero	26458	6,44/-6,7
<i>P.abysyi</i>	Monómero	26793	8,70
<i>A. fulgidus</i>	Monómero	24703	5,74
<i>C. trachomatis</i>	Monómero	27784	4,63
<i>C.pneumoniae</i>	Monómero	23952	7,19
<i>C.difficile</i>	Monómero	23700	5,29
<i>B.pseudomallei</i>	Monómero	24169	8,03
<i>B.anthraxis</i>	Monómero	23743	4,80
<i>S. aureus</i>	Monómero	23974	4,69
<i>M. tuberculosis</i>	Monómero	20124	4,91
<i>A.baumannii</i>	Monómero	24022	4,98
<i>R.prowazekii</i>	Monómero	24501	9,25
<i>Francisella tularensis</i>	Monómero	24361	8,06
<i>E. coli</i>	Monómero	23589	5,56

[0028] Como se mencionó anteriormente, la presencia de ATP endógeno puede afectar negativamente a la sensibilidad y exactitud del ensayo de la presente invención. Por lo tanto, en una realización, opcionalmente se elimina cualquier ATP presente antes de la adición de ADP usando una o más de las etapas de tratamiento descritas a continuación. Estos tratamientos pueden ser utilizados en cualquier número (preferiblemente uno o más, o al menos dos, o al menos tres) y/o en cualquier combinación. En todos los casos, sin embargo, el tratamiento deja la quinasa reportera sustancialmente intacta. Las etapas de tratamiento se pueden aplicar a cualquier aspecto de la presente invención.

[0029] En una realización, la eliminación de ATP endógeno se consigue usando una ATPasa (por ejemplo, apirasa). La ATPasa a continuación se puede eliminar y/o inactivar antes del contacto con ADP, para evitar la presencia de la ATPasa que influye negativamente en la señal obtenida usando la quinasa reportera. A modo de ejemplo, se puede utilizar una ATPasa para eliminar el ATP y, a continuación, la ATPasa se autodestruye mediante el uso de temperatura elevada. Alternativamente, la ATPasa puede inmovilizarse en un dispositivo (tal como un dispositivo de flujo lateral o dispositivo de filtración descritos en esta memoria), de manera que cuando el ATP fluye sobre la ATPasa, el ATP se inactiva. Como antes, esta etapa de inactivación debe ocurrir antes de que la quinasa reportera entre en contacto con el ADP.

[0030] En una realización adicional, el ATP endógeno se puede separar por medios físicos. A modo de ejemplo, se puede utilizar un dispositivo de filtración, que separa el ATP en base al tamaño de una manera similar a la descrita anteriormente para la separación de la quinasa reportera no reportera. Ventajosamente, la separación del ATP y quinasa no reportera se puede lograr al mismo tiempo ya que ambos son mucho más pequeños que la quinasa reportera, ya sea cuando el último está por sí sola o cuando está unida a un anticuerpo, estructura u otro reactivo de diagnóstico.

[0031] En otra realización, el ATP endógeno se puede separar en base a la carga de la superficie tal como se ha descrito anteriormente. La carga negativa del ATP a pH 5,5 permite unirse a una resina de intercambio aniónico, junto con quinasas no reporteras, pero no con quinasas reporteras. De nuevo, esto separa de manera efectiva el ATP contaminante y la quinasa no reportera de la quinasa reportera generadora de señal en una sola etapa.

[0032] El orden/tiempo preciso de las etapas para la separación de ATP endógeno no es crítico, siempre que estas etapas se lleven a cabo antes de que la quinasa reportera entre en contacto con ADP. Por lo tanto, pueden llevarse a cabo en la fase de preparación de la muestra, o durante el ensayo antes de que la quinasa reportera entre en contacto con ADP. En una realización, el tratamiento es en lugar de, o además de, una etapa de lavado.

[0033] Los datos del tipo presentado en la figura 3 son útiles al decidir sobre el tipo y/o el número de etapas de reducción de base (es decir, la eliminación o inactivación de la quinasa no reportera y/o ATP) para usar en el ensayo de una muestra particular (aunque esta información no excluye el uso de estas etapas en cualquier tipo de ensayo, en particular cuando las infecciones pueden influir en los niveles base de ATP o quinasa reporteraa).

[0034] Se puede utilizar cualquier enzima quinasa como quinasa reportera en la presente invención. En una realización, la quinasa reportera es una adenilato quinasa, acetato quinasa o piruvato quinasa, o una combinación de las mismas.

[0035] La quinasa reportera usada en la presente invención puede tener una estructura trimérica o monomérica - estas estructuras terciarias están asociadas con una estabilidad mejorada de la quinasa a condiciones, tales como por ejemplo, temperatura, pH, desnaturalizantes químicos o proteasas.

[0036] En una realización, la quinasa reportera es una quinasa no mamífero, no hongos, y/o no vegetal.

[0037] En una realización, la quinasa reportera es una quinasa microbiana. Entre las quinasas adecuadas se incluyen quinasas de la especie *Pyrococcus*, tales como quinasa de *Pyrococcus furiosus*, quinasa de *P. abyssi*, quinasa de *P. furiosus*, quinasa de *P. horikoshii*, quinasa de *P. woesei*; quinasas de la especie *Sulfolobus*, tales como quinasa de *Sulfolobus solfataricus*, quinasa de *S. acidocaldarius*, quinasa de *S. shibatae*; quinasas de la especie *Rhodothermus*, tales como quinasa de *Rhodothermus marinus*; quinasas de la especie *Thermococcus*, tales como quinasa de *Thermococcus litoralis*; quinasas de la especie *Thermotoga*, tales como quinasa de *Thermotoga maritima*, quinasa de *Thermotoga neapolitana*; y quinasas de la especie *Methanococcus*, tales como quinasa de *M. ruber*. En otra realización, la quinasa es una quinasa de la especie *Archeoglobus*, tal como quinasa de *A. fulgidus*; una quinasa de la especie *Aeropyrum*, tal como quinasa de *A. pernix*; una quinasa de la especie *Aquifex*, tal como quinasa de *A. pyrophilus*, una quinasa de *Alicyclobacillus*, tal como quinasa de *A. acidocaldarius*; una quinasa de la especie *Bacillus*, tal como quinasa de *B. caldotenax* BT1, una quinasa de la especie *Bacillus* PS3, quinasa de *B. stearothermophilus* 11057, quinasa de *B. stearothermophilus* 12001, quinasa de *B. thermocatenulatus*; una quinasa de especie clostridial, tal como quinasa de *C. stercorarium*; una quinasa de la especie *Thermoanaerobacter*, tales como quinasa de *T. ethanolicus*, quinasa de *T. thermosulfurogenes*, quinasa de *T. celere*, quinasa de *T. aquaticus* YT1, quinasa de *T. caldophilus* GK24, quinasa de *T. thermophilus* HB8, En una realización preferida, la quinasa es una quinasa de *T. litoralis*, quinasa de *T. maritima* o quinasa de *T. neapolitana*.

[0038] En una realización, la quinasa reportera es termoestable. Además de ser resistente a las altas temperaturas, también se encuentran quinasas termoestables resistentes a otros procesos bioquímicos y físicos que dañan de forma rutinaria o destruyen las proteínas o los hacen inactivas, tales como la exposición a ciertos productos químicos, por ejemplo, caótopos, daño por radicales libres, detergentes, extremos de pH, la exposición a proteasas, la reticulación de proteínas, la encapsulación dentro de membranas o polímeros no permeables o semipermeables, o la inmovilización irreversible sobre las superficies. (Véase, por ejemplo: Daniel RM, Cowan DA, Morgan HW, Curran MP, "A correlation between protein thermostability and resistance to proteolysis", *Biochem J.* 1982 207: 641-4; Rees DC, Robertson AD, "Some thermodynamic implications for the thermostability of proteins", *Protein Sci.* 2001 10: 1187-1194; Burdette DS, Tchernajenko VV, Zeikus JG. "Effect of thermal and chemical denaturants on *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary-alcohol dehydrogenase stability and activity", *Enzyme Microbial Technol* 2000 27: 11-18; Scandurra R, Consalvi V, Chiaraluce R, L Politi, Engel PC., "Protein thermostability in extremophiles", *Biochimie* 1998 nov 80 (11): 933-41; y Liao HH, "Thermostable mutants of kanamycin nucleotidyltransferase are also more stable to proteinase K, urea, detergents, and water-miscible organic solvents", *Enzyme Microb Technol* 1993 Abril; 15 (4): 286-92, las cuales se incorporan aquí por referencia en su totalidad).

[0039] En otra realización, la quinasa reportera puede ser una quinasa de *E. coli*, quinasa de *Clostridium difficile*, quinasa de *Bacillus anthracis*, quinasa de *Acinetobacter baumannii*, quinasa de *Burkholderia pseudomallei*, quinasa de *Chlamydia trachomatis*, quinasa de *Chlamydia pneumonia*, quinasa de *Staphylococcus aureus*, quinasa de *Klebsiella pneumonia*, quinasa de *Rickettsia prowazekii*, quinasa de *Mycobacterium tuberculosis*, quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, quinasa de *Leishmania donovani*, quinasa de *Trypanosoma cruzii*, quinasa de *Shigella flexneri*, quinasa de *Listeria manaeytagenes*, quinasa de *Plasmodium falciparum*, quinasa de *Mycobacterium marinum*, quinasa de *Cryptococcus neoformans*, quinasa de *Francisella tularensis*, quinasa de *Salmonella spp.*, quinasa de *Coxiella burnetii*, y/o quinasa de *Brucella abortus*, En varias de las realizaciones, la quinasa derivada de estos organismos no es termoestable, pero se puede distinguir de la quinasa no reportera mediante el uso de diferentes técnicas de tratamiento de la muestra, extracción o separación. Muchas de estas quinasas reporteras, en combinación con el procedimiento para distinguir su actividad de quinasas no reporteras, se pueden utilizar en ensayos rápidos para detectar la presencia/ausencia, la viabilidad o la destrucción del organismo del que se originan. Dichos procedimientos son adecuados para la evaluación de la presencia de una infección en una muestra de paciente, tejido o población de células y la eficacia de diferentes regímenes terapéuticos o fármacos.

[0040] Los ejemplos de quinasas específicas que se han secuenciado y que son adecuadas para su uso en la presente invención son SEQ ID NOs 1-25, 31-36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 y 61-84. En una realización, las quinasas usadas en la invención tienen al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 100% de identidad con SEQ ID Nos: 1-25, 31-36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 y 61-84.

[0041] Otros ejemplos de quinasas reporteras adecuadas se pueden encontrar en el documento WO00/46357 y el documento WO2005/093085, que se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

[0042] La estabilidad de las quininas reporteras se puede aumentar usando una variedad de procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

5 [0043] A modo de ejemplo, agentes estabilizantes (tales como sorbitol hasta una concentración de 4 M, u otros polioles, tales como etilenglicol, glicerol, o manitol a una concentración de hasta 2 M) pueden mejorar la estabilidad de la quinasa. Otros aditivos, tales como xilano, trehalosa, gelatina, también pueden proporcionar efectos de estabilización adicionales, ya sea individualmente o en combinación. La adición de una gama de iones metálicos divalentes, de manera más destacable Ca^{2+} , Mg^{2+} o Mn^{2+} , también puede mejorar la estabilidad de la quinasa.

10 [0044] La modificación química de las quininas también se puede utilizar para mejorar su estabilidad. La alquilación reductora de los grupos amino expuestos a la superficie por el ácido glioxílico (por ejemplo, Melik-Nubarov (1987) Biotech Letts 9: 725-730), la adición de carbohidratos a la superficie de la proteína (por ejemplo, Klibanov (1979) Anal Biochem 93: 1-25) y la amidación (por ejemplo, Klibanov (1983) Adv Appl. Microbiol. 29: 1-28) pueden todos aumentar la estabilidad de la quinasa. Otros procedimientos que incluyen el uso de agentes de reticulación químicos y el uso de diversos soportes poliméricos para la inmovilización de la enzima también son procedimientos relevantes para el aumento de la estabilidad de las enzimas (revisado en Gupta (1991) Biotech Appl Biochem 14: 1-11).

15 [0045] La formulación de la quinasa en una solución que contiene hasta alrededor de 10 mg/ml de una proteína portadora adecuada, tal como caseína o albúmina, o la adición de aminoácidos libres, tales como glicina, tirosina, triptófano o dipéptidos, a la formulación, puede aumentar la estabilidad de la quinasa a los tratamientos con proteasa.

20 [0046] Se ha observado que la modificación genética de las enzimas proporciona un aumento significativo en la estabilidad térmica y, por analogía, dichas mutaciones también son susceptibles de mejorar significativamente la estabilidad de las enzimas a otras condiciones, tales como el tratamiento con proteasas o "esterilización" en fase gaseosa. La comparación de la termoestabilidad de las enzimas quinasa tomadas con la estructura 3-D definida de las AKs triméricas (arqueas) (Vonrhein et al (1998) J. Mol Biol 282: 167-179 y Criswell et al (2003) J. Mol Biol. 330: 1087-1099) ha identificado aminoácidos que influyen en la estabilidad de la enzima.

25 [0047] Se pueden generar de varias maneras variantes modificadas genéticamente de quininas que muestran una estabilidad mejorada. Esencialmente implican la mutagénesis específica dirigida al sitio de los aminoácidos que se cree que forman parte de la región de empaquetamiento del núcleo central de la molécula trimérica y procedimientos aleatorios de "evolución dirigida", donde la molécula completa se somete a posteriores rondas de mutagénesis y selección/cribado de moléculas con propiedades mejoradas. Las enzimas modificadas específicas se exponen en SEQ ID NOs: 17-19 (varias variantes están comprendidas por cada referencia). Estas modificaciones descritas se basan en una estrategia híbrida que utiliza una estrategia basada en el consenso para definir las regiones que probablemente influyen en la termoestabilidad de las enzimas en base a las diferencias observadas entre las moléculas estructuralmente relacionadas. Esto va seguido por cualquiera de los cambios definidos para incorporar los aminoácidos que se correlacionan con la mejor termoestabilidad o una sustitución aleatoria de incorporar todos los aminoácidos disponibles en las posiciones definidas como esenciales para la termoestabilidad.

30 [0048] En una realización de la presente invención, las quininas reporteras pueden estar unidas a un soporte sólido.

35 [0049] Los soportes sólidos adecuados incluyen una superficie de plástico (por ejemplo, policarbonato, poliestireno o polipropileno), una superficie cerámica, una superficie de látex, una superficie magnética, una superficie de acero u otro metal, una matriz de flujo (tal como se describe en esta memoria descriptiva), una membrana de filtro, u otra superficie de polímero. El soporte sólido puede tomar la forma de, por ejemplo, tiras, varillas, placas de microtitulación, esferas.

40 [0050] La unión de la quinasa reportera al soporte sólido se puede conseguir usando cualquiera de una amplia variedad de procedimientos conocidos en la técnica.

45 [0051] En una realización, la quinasa reportera está unida sobre el soporte sólido a través de procedimientos de adsorción de proteínas convencionales, tal como se describe a continuación.

50 [0052] La unión de la quinasa reportera sobre el soporte sólido puede lograrse mediante procedimientos utilizados habitualmente para unir la proteína a las superficies, por ejemplo, incubación de la proteína en tampón de bicarbonato de sodio 0,1 M a un pH de 9,6 a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Alternativamente, la proteína se acopla covalentemente a la superficie usando cualquiera de una amplia gama de químicas de acoplamiento conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una proteína de fusión de la adenilato quinasa (por ejemplo, a Sup35) derivatizada con SPDP (Pierce chemicals; utilizando las instrucciones del fabricante), reducida con DTT para proporcionar grupos sulfhidrilo libres para la reticulación, se une covalentemente a un soporte de poliestireno con una superficie de maleimida. Las superficies de plástico con dichas superficies de unión a sulfhidrilo están bien descritas en la literatura. Las quininas reporteras descritos en esta solicitud tienen la propiedad de que su actividad se mantiene tras la derivación y la reticulación de dichos soportes.

[0053] Alternativamente, se utiliza una superficie reactiva a amina sobre un soporte de poliestireno o policarbonato, con un agente de reticulación bifuncional, tal como glutaraldehído monomérico, para proporcionar una reticulación directa no escindible de la quinasa a través de grupos amina libres en la proteína. El tratamiento con UV también se puede usar para enlazar directamente el indicador a un soporte adecuado.

[0054] Las superficies de acero pueden tratarse de una manera similar a las superficies de plástico para mediar en la unión covalente de la quinasa.

[0055] Una amplia variedad de reactivos de reticulación a proteínas están disponibles de compañías, tales como Pierce chemical company (Perbio). Los reactivos reactivos a grupos sulfhidrilo, amino, hidroxilo y carboxilo están diseñados para el acoplamiento a proteínas, pero igualmente se pueden utilizar para reticular proteínas a soportes sólidos reactivos de de forma natural o recubiertos, tales como plásticos, otros polímeros, vidrio y metales. Las químicas reactivas también están disponibles para la reticulación de las enzimas a los carbohidratos. Por ejemplo, se pueden utilizar los reactivos BMPH ((N-[ácido β -maleimidopropiónico]hidrazida-TFA), KMUH ((N-[ácido k-Maleimidoundecanoico]hidrazida) y MPBH (clorhidrato de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico hidrazida) para reticular el indicador que contiene un sulfhidrilo libre en forma de un residuo de cisteína o una proteína químicamente derivatizada reducida para generar un grupo reactivo de sulfhidrilo, a carbohidratos. Esto puede ser particularmente importante para un soporte sólido que es un carbohidrato complejo (por ejemplo, papel, membranas a base de celulosa, geles o resinas) o puede estar recubierto o tratado con una solución de carbohidratos para generar una superficie adecuadamente reactiva.

[0056] Para cada tipo de soporte, la quinasa reportera se puede formular en una solución que mejora la unión y/o estabiliza la proteína unida. Tales formulaciones incluyen soluciones que contienen hasta 10% (p/v) de sacarosa, sorbitol, manitol, celulosa, o polietilenglicol (PEG). Además, la quinasa puede formularse como parte de un gel que se aplica a la superficie o lumen de un soporte adecuado. Los ejemplos incluyen matrices de alginato, agar o poliacrilamida.

[0057] En otra realización, la quinasa reportera puede unirse a un soporte sólido mediante un enlazador que comprende un agente de unión específico para un analito. Los detalles de procedimientos adecuados para la consecución de esta unión se dan en esta memoria.

[0058] El ensayo descrito en el primer aspecto de la presente invención es particularmente adecuado para detectar la actividad de quinasa en ensayos de detección de analito basados en quinasa, tales como los descritos en la solicitud anterior del solicitante, WO00/46357, cuya totalidad se incorpora aquí por referencia .

[0059] De este modo, en un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para determinar la presencia de un analito en una muestra, que comprende:

- (i) exponer la muestra a una quinasa reportera acoplada a un agente de unión específico para el analito, de manera que se forma un complejo entre la quinasa reportera y cualquier analito presente en la muestra;
- (ii) separar la quinasa reportera complejada de la quinasa reportera no complejada; y
- (iii) medir la actividad de la quinasa reportera complejada utilizando un ensayo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

[0060] El agente de unión utilizado en este procedimiento (y en cualquier otro procedimiento descrito en esta memoria) es habitualmente un anticuerpo (o un fragmento del mismo) que se une específicamente al analito bajo investigación. El anticuerpo puede obtenerse usando técnicas convencionales para la identificación y aislamiento de anticuerpos específicos, y el ensayo es, por tanto, de aplicación a sustancialmente todos los analitos contra los que se puede desarrollar un anticuerpo. Alternativamente, el agente de unión puede seleccionarse del grupo que consiste en lectinas, factores de crecimiento, aptámeros de ADN/ARN, fago u otras especies que se unen específicamente al analito bajo investigación. Cuando están implicados un primer y segundo agente de unión, estos agentes de unión pueden ser el mismo o diferentes.

[0061] La quinasa reportera puede acoplarse al agente de unión específico por técnicas convencionales. Por ejemplo, existen numerosos modos de marcar biomoléculas inmunorreactivas con enzimas (conjugación). Los anticuerpos, la mayoría de los antígenos y las enzimas son todas proteínas y, por lo tanto, se pueden adaptar procedimientos generales de reticulación de covalente de proteínas a la producción de reactivos de inmunoensayo. La preparación de conjugados de anticuerpo-enzima requiere condiciones suaves para asegurar la retención tanto de las propiedades inmunológicas del anticuerpo como las propiedades catalíticas de la enzima. Los procedimientos habituales incluyen, acoplamiento con glutaraldehído, el uso de oxidación con peryodato de glicoproteínas para generar dialdehídos capaces de formar enlaces de base de Schiff con grupos amino libres en otras moléculas proteicas, y el uso de reactivos heterobifuncionales, por ejemplo, succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC).

[0062] En una realización de la presente invención, el procedimiento anterior se realiza como un "ensayo de captura", tal como un ensayo sandwich (a veces referido como un ensayo de captura de dos anticuerpos), un ensayo de captura de antígeno, o un ensayo de captura de anticuerpo. En un ejemplo de un ensayo de captura de

anticuerpo, un analito se une primero a un soporte sólido, por ejemplo, mediante unión no específica. El analito se expone a continuación a una quinasa reportera unida a un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el analito. Se forma así un complejo entre el analito y la quinasa reportera. Cualquier quinasa reportera no complejada se elimina mediante una o más etapas de lavado de rutina. A continuación, se añaden ADP y luciferina/luciferasa al soporte sólido, en el que el ADP se convierte en ATP por el complejo de quinasa reportera. La luciferina/luciferasa convierte el ATP a una emisión de luz, que a continuación se puede medir y correlacionar con la cantidad de analito presente en el soporte sólido.

[0063] En una realización, en cualquier momento antes de la etapa (iii), la muestra se trata para eliminar/inactivar la quinasa no reportera y/o ATP. Los tratamientos adecuados que pueden emplearse en este sentido se describen anteriormente en esta memoria.

[0064] En una realización, el procedimiento descrito en este aspecto de la presente invención se completa en menos de 15 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos, o menos de 2 minutos.

[0065] El ejemplo 10 describe el uso de un procedimiento de acuerdo con este aspecto de la presente invención para detectar la presencia de la hepatitis C en una muestra de hisopo oral. Se toma una muestra de hisopo oral de la boca de un paciente y se seca en un horno a 90°C durante 1 minuto para eliminar cualquier quinasa no reportera (por ejemplo, quinasa endógena, tal como quinasa de tejido de mamífero). El hisopo se expone entonces a un conjugado que comprende una quinasa reportera acoplada a un anticuerpo para el antígeno de la hepatitis C. El conjugado de quinasa reportera forma un complejo con cualquier antígeno de la hepatitis C presente en la muestra de hisopo. El hisopo se enjuaga entonces para eliminar cualquier conjugado de quinasa reportera no complejada, y se inserta en un tubo de reactivo que contiene ADP y luciferina y luciferasa. El tubo de reactivo se transfiere a un luminómetro de mano y se mide la emisión de luz. La emisión de luz se puede correlacionar a continuación con la cantidad de analito presente en la muestra.

[0066] En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar la presencia de un analito en una muestra, que comprende:

- (i) proporcionar un soporte sólido que comprende una quinasa reportera, en el que la quinasa reportera se une al soporte sólido a través de un enlazador que comprende un agente de unión específico para el analito;
- (ii) aplicar la muestra al soporte sólido, mediante lo cual cualquier analito presente en la muestra desplaza la quinasa reportera del soporte sólido; y
- (iii) medir la actividad de la quinasa reportera desplazada utilizando un ensayo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

[0067] En una realización, el procedimiento descrito en este aspecto de la presente invención se completa en menos de 15 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos, o menos de 2 minutos.

[0068] A modo de ejemplo, se proporciona una muestra clínica que se sospecha que contiene una toxina bacteriana. También se proporciona un soporte sólido, que comprende una quinasa reportera unida al soporte sólido mediante un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo) que es específico para la toxina bacteriana. Cuando la muestra se aplica al soporte sólido, cualquier toxina bacteriana presente interferirá competitivamente con la unión del anticuerpo al soporte sólido y desplazará así la quinasa reportera del soporte sólido. La cantidad de quinasa reportera desplazada se puede medir a continuación usando un ensayo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención y se correlaciona con la cantidad de toxina bacteriana presente en la muestra.

[0069] El ejemplo 13 describe el uso de este procedimiento para detectar la presencia de norovirus en una muestra clínica. En este ejemplo, el soporte sólido está recubierto con un anticuerpo para norovirus (es decir, un agente de unión específico para el analito). Se forma un conjugado de quinasa reportera que comprende una quinasa reportera conjugada con una proteína de norovirus VP1 (es decir, el analito). Debido a la interacción entre la VP1 y el anticuerpo, la quinasa reportera se une al soporte sólido. La muestra clínica se aplica a continuación al soporte sólido.

[0070] Cualquier norovirus (es decir, analito) presente en la muestra desplaza el conjugado de quinasa reportera del soporte sólido. La actividad de esta quinasa reportera desplazada se mide a continuación y se correlaciona con la cantidad de norovirus presente en la muestra.

[0071] En una realización, el soporte sólido es una matriz de flujo. El término "matriz de flujo" se utiliza en toda esta memoria para referirse a cualquier material sólido para el transporte de líquidos que permite el flujo de líquidos a su través, incluyendo materiales, tales como nitrocelulosa, nylon, rayón, celulosa, papel, fibra de vidrio, sílice, una matriz de gel, o cualquier otro material poroso o fibroso. En una realización, la matriz de flujo está configurada como una tira alargada sustancialmente plana. El material de la matriz de flujo puede pretratarse o modificarse según se requiera.

[0072] A continuación, se describen procedimientos adecuados para unir la quinasa reportera al soporte sólido. El agente de unión es como se define anteriormente en relación con el segundo aspecto de la presente invención.

- Un analito se acopla directamente a la superficie del soporte sólido. La quinasa reportera se une a un agente de unión específico para el analito (por ejemplo, un anticuerpo) y, de este modo, se asocia con el analito en la superficie. La quinasa reportera permanece unida a la superficie hasta que se desplaza por la presencia del anticuerpo o analito en la muestra.
- Un analito se une al soporte sólido a través de un primer agente de unión específico para el analito. La quinasa reportera se conjuga a un segundo agente de unión específico para el analito y, de este modo, se asocia con el analito en la superficie. La quinasa reportera permanece unida a la superficie (en una disposición de tipo sándwich) hasta que se desplaza por la presencia de anticuerpo o analito en la muestra.
- Se utiliza un agente de unión específico al analito para recubrir el soporte sólido. Se conjuga la quinasa reportera o se fusiona genéticamente al analito diana y, de este modo, se asocia con el agente de unión en la superficie. El conjugado de reportero quinasa-analito se libera del soporte sólido al competir analito o anticuerpo en la muestra de ensayo.

[0073] La quinasa reportera, por tanto, se une indirectamente al soporte sólido mediante un enlazador que comprende un agente de unión específico para el analito. El enlazador puede comprender también el analito (o un fragmento del mismo).

[0074] En una realización, en cualquier momento antes de la etapa (iii), la muestra se trata para eliminar/inactivar la quinasa no reportera y/o ATP. Los tratamientos adecuados se describen en esta memoria.

[0075] En un cuarto aspecto, la invención proporciona un procedimiento para determinar la presencia de un analito en una muestra, que comprende:

- (i) proporcionar un soporte sólido sobre el que se une un primer agente de unión específico para el analito;
- (ii) exponer el soporte sólido a la muestra de manera que cualquier analito presente en la muestra se una al soporte sólido a través de dicho primer agente de unión;
- (iii) exponer el soporte sólido a una quinasa reportera acoplada a un segundo agente de unión específico para el analito, de manera que la quinasa reportera se une al soporte sólido a través de la interacción entre el segundo agente de unión y el analito ya unido;
- (iv) aplicar la mezcla obtenida en la etapa (iii) a una membrana de filtro, en el que el soporte sólido es retenido en la membrana de filtro; y
- (v) medir la actividad de la quinasa reportera retenida utilizando un ensayo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

[0076] En una realización, el procedimiento anteriormente descrito se completa en menos de 15 minutos, a menos de 10 minutos, a menos de 5 minutos, o menos de 2 minutos.

[0077] En una realización, el soporte sólido es un soporte de látex, o un soporte magnético, por ejemplo, una esfera de látex o una esfera magnética. Cuando el soporte sólido es magnético, la etapa (iv) puede ser sustituida por la exposición de la mezcla obtenida en la etapa (iii) a un imán, de manera que el soporte sólido es retenido en el imán.

[0078] El ejemplo 14 describe el uso de este procedimiento para detectar la presencia de legionella en una muestra de agua. Los anticuerpos específicos para legionella están unidos a un soporte sólido (una esfera de látex). Las esferas de látex se exponen a continuación a (i) la muestra a ensayar (que contiene potencialmente legionella) y (ii) una quinasa reportera acoplada a un segundo anticuerpo específico para legionella. Cualquier legionella presente en la muestra se une al anticuerpo en la esfera de látex. Posteriormente, el conjugado de quinasa reportera-anticuerpo se une a la esfera de látex a través de la legionella ya unida. La mezcla así obtenida se aplica a una membrana de filtro, que retiene las esferas de látex. Los otros componentes de la mezcla (por ejemplo, conjugado de quinasa reportera no unida, ATP, quinasa no reportera (por ejemplo, quinasa de tejidos de mamífero, quinasa de planta y/o fúngica endógena a la muestra de prueba, etc.) pasa a través de la membrana de filtro. La quinasa reportera retenida en la membrana de filtro se expone entonces a ADP y una mezcla de luciferina/luciferasa, y la emisión de luz se mide utilizando un luminómetro. Opcionalmente, la membrana de filtro puede tratarse usando cualquiera de las etapas de tratamiento descritas anteriormente para la eliminación de cualquier ATP o quinasa no reportera restante.

[0079] Las membranas de filtro adecuadas para usar en este aspecto de la presente invención incluyen: nitrocelulosa, acetato de celulosa o filtros de papel. Las matrices de filtro emplean típicamente un intervalo de tamaños de poro de 0,2 μm a 20 μm o mayor dependiendo de la naturaleza de cualquier portador particulado utilizado.

[0080] El ejemplo 17 describe el uso de este procedimiento para detectar la presencia de Salmonella en una muestra de alimento. El procedimiento es esencialmente como se describe para el Ejemplo 14 anterior, excepto que se usa una esfera magnética como soporte sólido en lugar de una esfera de látex, y la mezcla obtenida en la etapa (iii) se expone a un imán en lugar de una membrana de filtro.

[0081] En una realización, en cualquier momento antes de la etapa (v), la muestra se trata para eliminar o inactivar la quinasa no reportera y/o ATP. Los tratamientos adecuados se describen en esta memoria.

[0082] El ensayo descrito en el primer aspecto de la presente invención también es adecuado para detectar la actividad de quinasa en sistemas de indicadores biológicos basados en quinasa, tales como los descritos en la solicitud anterior del solicitante, documento WO2005/093085, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

[0083] Un indicador biológico típico se prepara mediante la adsorción de una quinasa reportera sobre un soporte sólido, tal como una tira o varilla indicadora. El indicador se incluye entonces con una muestra (que contiene un contaminante) a tratar, y el indicador más la muestra se someten a un proceso de tratamiento. La reducción en la actividad de la quinasa del indicador por el tratamiento se correlaciona entonces con la reducción en la cantidad o actividad del contaminante. Cuando se determina que un nivel de actividad es sabido que se correlaciona con una reducción aceptable en el contaminante, se considera entonces el tratamiento como válido.

[0084] También se ha encontrado que el rendimiento de estos indicadores basados en quinasa se puede mejorar mediante la reticulación covalente de la quinasa a un componente biológico, en el que el componente biológico es un mimético/sustituto del contaminante. Esto permite que el indicador refleje con mayor exactitud la reacción del contaminante al proceso de tratamiento, que a su vez conduce a una mayor precisión/sensibilidad del indicador, y por lo tanto un menor número de validaciones de proceso "falsas".

[0085] Por lo tanto, en un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de validación de un proceso de tratamiento para reducir la cantidad o actividad de un agente biológico contaminante en una muestra, que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una muestra que contiene, o se sospecha que contiene, un agente biológico contaminante;
- (ii) someter la muestra a un proceso de tratamiento en presencia de una cantidad definida de una quinasa reportera, en el que la quinasa reportera y el agente biológico contaminante se exponen ambos al proceso de tratamiento;
- (iii) medir la actividad residual de la quinasa reportera usando un ensayo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención; y
- (iv) comparar dicha actividad residual con una actividad de quinasa predeterminada, en el que la actividad de quinasa predeterminada corresponde a una reducción confirmada en la cantidad o actividad del agente biológico contaminante en las mismas condiciones.

[0086] En una realización, las etapas (i) a (iv) se han completado en menos de 15 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos, a menos de 2 minutos.

[0087] En una realización, en cualquier momento antes de la etapa (iii), la muestra se trata para eliminar/inactivar la quinasa no reportera y/o ATP. Los tratamientos adecuados se describen en esta memoria.

[0088] El término "tratamiento" o "proceso de tratamiento" abarca cualquier proceso que esté diseñado para reducir la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra. Los tratamientos adecuados incluyen uno o más de: un pH, temperatura o presión seleccionados, exponer la muestra a una proteasa u otra enzima lítica, exponer la muestra a un detergente, un esterilizante químico, radiación, radicales libres, o un esterilizante en fase gaseosa. En una realización, el tratamiento está diseñado para reducir la actividad infecciosa (también conocida como infectividad) de un contaminante biológico infeccioso, tal como TSE. El término "tratamiento" o "proceso de tratamiento" también abarca procesos de limpieza y de inactivación, tales como el tratamiento en autoclave a alta temperatura con vapor húmedo o seco, esterilización con ozono, esterilización con H₂O₂, fundir u otro procedimiento diseñado para eliminar o inactivar el contaminante. En una realización de la presente invención, tanto la quinasa reportera como el contaminante se exponen directamente al proceso de tratamiento, es decir, no hay sello o barrera entre la quinasa reportera/contaminante y el proceso de tratamiento. La quinasa reportera y el contaminante están, por lo tanto, ambas en contacto directo con el proceso de tratamiento y están sujetos a las mismas condiciones de tratamiento.

[0089] En una realización, el agente biológico contaminante se selecciona del grupo que consiste en bacterias, virus, esporas, toxinas, priones, proteínas y péptidos. En una realización adicional, la quinasa reportera se une sobre un soporte sólido utilizando cualquiera de los procedimientos descritos en relación con el primer aspecto de la presente invención.

[0090] En otra realización de la presente invención, la quinasa reportera está unida covalentemente a un componente biológico.

[0091] El componente biológico es ventajosamente un mimético o sustituto del contaminante, y por lo tanto, reacciona al proceso de tratamiento sustancialmente de la misma manera que el contaminante. En una realización, el componente biológico puede ser el mismo, pero físicamente distinto, del contaminante en la muestra que se va a someter al proceso de tratamiento, por ejemplo, si el contaminante es una proteína, entonces el componente biológico es también una proteína; si el contaminante es una proteína de la sangre, el componente biológico es también proteína de la sangre; si el contaminante es una molécula de ADN, entonces el componente biológico es también una molécula de ADN; si el contaminante es una molécula de ARN, entonces el componente biológico es

también una molécula de ARN, etc., para cada uno de los contaminantes y componentes biológicos descritos en esta memoria.

[0092] Los ejemplos de componentes biológicos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos.

[0093] En una realización, el componente biológico comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en una proteína de la sangre, una proteína bacteriana, una proteína viral, una proteína fúngica, y una proteína autoagregante o que forma amiloides.

[0094] En una realización adicional, la proteína de la sangre se selecciona del grupo que consiste en proteínas de la coagulación de la sangre (por ejemplo, fibrinógeno, péptidos de fibrina, fibrina, sustratos de transglutaminasa, trombina), proteínas séricas (por ejemplo, albúmina y globulina), proteínas de plaquetas, glicoproteínas de células sanguíneas, y hemoglobina.

[0095] En otra realización, la proteína bacteriana se selecciona del grupo que consiste en una proteína fimbrial bacteriana (por ejemplo CgsA de *E. coli* y AgfA de *Salmonella*), una proteína de toxina bacteriana (por ejemplo, toxinas de *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*), una proteína de la superficie celular bacteriana (por ejemplo, peptidoglicano, lipoproteínas), y una proteína de espora bacteriana (por ejemplo, de bacterias Gram positivas y que tienen una secuencia o estructura general similar a las proteínas que forman lo apéndices de cinta en *Clostridium taeniosporum*, proteínas Chaplin, proteínas Rodlin).

[0096] En otra realización, la proteína viral se selecciona del grupo que consiste en una proteína de la envoltura viral, una proteína de la cápside viral, y una proteína del núcleo viral. Preferiblemente, las proteínas virales son de un virus bacteriófago (por ejemplo, las proteínas MS2 y PP7), virus de Norwalk (por ejemplo, proteína de la cápside), rotavirus (por ejemplo, proteínas VP2, VP6 y VP7), coronavirus (por ejemplo, proteínas S, E y M de SARS), virus de la lengua azul (por ejemplo, proteína VP2), virus del papiloma humano (por ejemplo, proteína estructural principal viral, L1), hepatitis B (por ejemplo, proteína de la envoltura pequeña HBsAg), virus de la hepatitis C (por ejemplo, proteínas del núcleo E1 y E2), virus de la gripe (por ejemplo, neuraminidasa y proteínas de hemaglutinina y de la matriz), virus de la polio (por ejemplo, proteínas VP0, 1 y 3 de la cápside), VIH (por ejemplo, Pr55gag, proteínas de la envoltura) y el virus del dengue B (por ejemplo, envoltura (e) y premembrana/membrana (prM/M)).

[0097] En una realización adicional, la proteína fúngica se selecciona del grupo que consiste en proteínas de hidrofobina (por ejemplo, SC3 de *Schizophyllum commune*, RodA/B de *Aspergillus fumigates*, y proteínas equivalentes de levadura), proteínas de esporas fúngicas, proteínas de hifas, micotoxinas, y priones fúngicos (por ejemplo Sup35, Het S, URE 2, Rnq1, New 1).

[0098] En una realización adicional más, la proteína autoagregante se selecciona del grupo que consiste en priones (por ejemplo, PrP^{Sc} y PrP^C, Sup35, Het S, Ure 2, Rnq1, New 1), proteínas miméticas de priones, fibrillas de amiloide, adhesinas de la superficie celular de conformación floc y bacterias filamentosas en lodos activados, proteína beta amiloide, proteína tau, proteína de unión a poliadenina, glicoproteína B del virus de herpes simplex, proteína C de surfactante pulmonar, proteína CsgA de *E. coli*, proteína AgfA de especies de *Salmonella*, proteínas fimbriales bacterianas, apolipoproteínas (por ejemplo, la apolipoproteína A1), hidrofobinas de especies fúngicas (por ejemplo SC3 de *Schizophyllum commune*, RodA/B de *Aspergillus fumigates*), chaplins (por ejemplo, Chps A-H de *Streptomyces spp*), rodlinas (por ejemplo Rd1A y Rd1B de *Streptomyces spp*), proteínas de la cubierta de esporas gram positivas (por ejemplo, P29a, P29b, GP85 y un análogo SpoVM), y proteínas de tipo cemento de percebes (por ejemplo, la proteína de 19 kDa de *Balanus albicostatus*, y la proteína de 20 kDa de *Megabalanus rosa*, y la nueva proteína de tipo cemento dependiente de calcita de *Balanus albicostatus*).

[0099] En una realización adicional, el ácido nucleico se selecciona entre una molécula de ADN y una molécula de ARN. Preferiblemente, el ácido nucleico se deriva de tejido neurológico.

[0100] En una realización adicional, el carbohidrato se selecciona del grupo que consiste en exopolisacáridos, lipopolisacárido (EPS/LPS, a veces conocidos como endotoxinas) (por ejemplo, de *Legionella*, *E. coli*, la especie *Staphylococcus*, la especie *Streptococcus*, la especie *Pseudomonas*, la especie *Acinetobacter*, la especie *Campylobacter* y la especie *Bacillus*), peptidoglicano, componentes de la pared celular de las plantas, hongos y levaduras (por ejemplo, quitina, lignina, glucano), preparaciones de mucina, glicolípidos (especialmente glicolípidos derivados del cerebro), glicoproteínas (por ejemplo, glicoproteínas de la superficie celular, Eap1p), extractos de esporas (por ejemplo, de *Bacillus spp*, *Clostridium spp* y otros formadores de esporas), polisacáridos de cápsulas de levadura, y secreciones de invertebrados (por ejemplo, de geles de moluscos).

[0101] En otra realización, el lípido se selecciona del grupo que consiste en glicolípidos (por ejemplo, glicolípidos derivados del cerebro), gangliósidos (por ejemplo, gangliósidos de células neuronales, tales como GT_{1b}, GT_{1a} y gangliósidos de origen celular más general, tales como GM₁) y aceites vegetales y lípidos.

[0102] Ventajosamente, el componente biológico es parte de una matriz biológica. La matriz biológica puede ser un mimético de la muestra que se va a tratar. En una realización, la matriz biológica comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, o fragmentos o derivados de los mismos. En otra realización, la matriz biológica puede comprender una mezcla de proteínas. En una realización adicional, la matriz biológica puede comprender uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en sangre, suero, albúmina, moco, huevo, tejido neurológico, comida, materia de animal sacrificado y suciedad de ensayo disponible comercialmente. En una realización adicional de la presente invención, la matriz biológica comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en fibrinógeno, trombina, factor VIII, CaCl₂, y, opcionalmente, albúmina y/o hemoglobina. Los ejemplos de quinasas reporteras unidas a componentes biológicos se describen en la SEQ ID NOs. 34-38, 40, 42, 48, 50, 52, 54, 61, 67, 72 y 73.

[0103] El indicador biológico puede prepararse mediante la unión covalente de una quinasa reportera a un componente biológico adecuado. Se puede utilizar cualquier procedimiento adecuado de unión covalente conocido en la técnica. En una realización, la quinasa está genéticamente o químicamente reticulada al componente biológico.

[0104] La reticulación química se puede lograr usando una variedad de reactivos homo- y hetero-bifuncionales utilizados habitualmente para la reticulación de proteínas para la generación de conjugados de enzimas u otros objetivos relacionados. Por ejemplo, en un indicador que comprende fibrina como componente biológico, la fibrina y la quinasa reportera pueden derivarse con la adición de SPDP (Perbio) a los grupos de amina primaria. La quinasa reportera se puede reducir a continuación para generar un grupo tiol reactivo y éste entonces se mezcla con la fibrina para producir enlaces covalentes fibrina-quinasa.

[0105] Las quinasas reporteras también se pueden reticular químicamente a carbohidratos, lípidos u otros glicoconjugados utilizando agentes heterobifuncionales después del tratamiento de los carbohidratos diana con metaperyodato.

[0106] Alternativamente, el indicador se puede preparar como una proteína de fusión. Esto se consigue mediante la fusión de un gen sintético que codifica una quinasa apropiada (por ejemplo, el gen que codifica la AK de *Sulfolobus acidocaldarius* o *Thermatoga neopolitana*) a un gen que codifica un componente biológico apropiado.

[0107] Los procedimientos de acuerdo con este aspecto de la presente invención se ilustran en los Ejemplos 18-21.

[0108] En un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo para detectar la actividad de una quinasa reportera en una muestra, que comprende:

una matriz de flujo alargada, en el que dicha matriz de flujo comprende:

(i) una zona de recepción de muestras; y

(ii) una zona de detección, que se encuentra aguas abajo de la zona de recepción de muestras, que comprende una mezcla de ADP y un reactivo bioluminiscente;

en el que, en uso, se aplica una muestra a la zona de recepción de muestras y se arrastra a lo largo de la matriz de flujo hasta la zona de detección.

[0109] En uso, la muestra se aplica a la zona de recepción de muestras del dispositivo y se permite migrar hasta la zona de detección donde entra en contacto con la mezcla de ADP y el reactivo bioluminiscente. Aquí, cualquier quinasa reportera presente en la muestra actúa sobre el ADP para generar ATP, que a su vez reacciona con el reactivo bioluminiscente para producir luz. La emisión de luz de la zona de detección se puede medir fácilmente utilizando un luminómetro, preferiblemente un luminómetro de mano. En una realización, la zona de detección del dispositivo se desprende y se coloca en un luminómetro. La cantidad de luz producida puede entonces correlacionarse con la cantidad de actividad de quinasa reportera.

[0110] En una realización, el dispositivo comprende una tira de soporte sobre la que se coloca la matriz de flujo alargada. La tira de soporte puede estar fabricada de cualquier material no absorbente adecuado, tal como un cartón de soporte de plástico adhesivo. En otra realización, la matriz de flujo está intercalada, al menos parcialmente, entre un laminado superior y un laminado inferior. El laminado superior puede incluir una ventana de aplicación de la muestra, que proporciona acceso a la zona de recepción de muestras de la matriz de flujo, y también puede incluir una ventana de detección, que proporciona acceso a la zona de detección de la matriz de flujo. Los laminados pueden estar fabricados de cualquier material no absorbente adecuado, por ejemplo una película de plástico adhesiva transparente o translúcida.

[0111] En una realización, el dispositivo es un dispositivo de flujo lateral. Los dispositivos de flujo lateral y los procedimientos para su construcción son bien conocidos en la técnica, siendo el más conocido el kit de prueba de embarazo estándar.

[0112] En una realización adicional, el dispositivo puede comprender una zona de reducción de ruido de ruido de fondo, situada entre la zona de recepción de muestras y la zona de detección. Esta zona funciona para eliminar/inactivar cualquier quinasa no reportera y/o ATP que pueda estar presente en la muestra antes de que la

muestra alcance la zona de detección. Por lo tanto, se evita que estos contaminantes interfieran con la sensibilidad o precisión del ensayo.

5 **[0113]** En una realización, la zona de eliminación de la reducción de ruido de ruido de fondo comprende una sustancia que selectivamente (o específicamente) inhibe la quinasa no reportera, dejando a la quinasa reportera sustancialmente sin afectar. Los inhibidores adecuados se describen en la presente memoria. En otra realización, la zona de reducción de ruido de ruido de fondo comprende una proteasa que destruye selectivamente la quinasa no reportera, dejando a la quinasa reportera sustancialmente sin afectar. Las proteasas adecuadas se describen en la presente memoria. En una realización adicional, la zona de reducción de ruido de ruido de fondo puede estar dispuesta para capturar físicamente quinasas no reporteras en base a su tamaño, carga, o propiedades de unión tal como se describe en la presente memoria. Por lo tanto, se evita que las quinasas no reporteras capturadas alcancen la zona de detección.

15 **[0114]** En otra realización, la zona de reducción de ruido de ruido de fondo comprende una ATPasa inmovilizada, por ejemplo, apirasa. En otra realización, la zona de reducción de ruido de ruido de fondo puede estar dispuesta para capturar físicamente ATP en base a su tamaño o carga, tal como se describe en la presente memoria. Por lo tanto, se evita que el ATP capturado alcance la zona de detección.

20 **[0115]** En una realización, el ADP en la zona de detección del dispositivo es ADP de alta pureza, y el reactivo bioluminiscente es una mezcla de luciferina y luciferasa. En otra realización, el ADP y la luciferina/luciferasa se inmovilizan en la zona de detección utilizando procedimientos de inmovilización convencionales.

[0116] En una realización adicional, el dispositivo es portátil.

25 **[0117]** En una realización adicional, la zona de detección puede incluir una membrana catiónica que retiene y concentra el conjugado de quinasa reportera para una mejor detección.

30 **[0118]** En otra realización, la zona de recepción de muestras puede incluir un colorante adecuado que también migra a la zona de detección, que actúa como un control para el flujo adecuado de la muestra a través del dispositivo. Este control interno positivo también puede explotar el uso de una membrana de unión a cationes dentro de la zona de detección para ayudar a retener el colorante para proporcionar una señal visual clara.

35 **[0119]** En un séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo de flujo lateral para su uso en un ensayo para detectar la presencia de un analito en una muestra, que comprende:
una tira de soporte sobre la que se coloca una matriz de flujo alargada, en la que dicha matriz de flujo comprende:
(i) una zona de recepción de muestras que comprende una quinasa reportera unida a la matriz de flujo a través de un enlazador que comprende un agente de unión específico para el analito; y
(ii) una zona de detección, que se encuentra aguas abajo de la zona de recepción de muestras;
en el que, en uso, se aplica una muestra a la zona de recepción de muestras y cualquier analito presente en la muestra desplaza la quinasa reportera de la matriz de flujo y de ese modo permite que la quinasa reportera migre a la zona de detección.

45 **[0120]** En uso, la muestra se aplica a la zona de recepción de muestras, y cualquier analito presente en la muestra desplaza la quinasa reportera unida a la zona de recepción de muestras. Cualquier quinasa reportera que no se desplace permanece unida a la zona de recepción de muestras, y este es el caso para una muestra negativa para la presencia del analito. Por lo tanto, sólo la quinasa reportera desplazada pasa a la zona de detección en la que puede detectarse y correlacionarse con la cantidad de analito presente en la muestra.

50 **[0121]** La tira de soporte del dispositivo puede estar fabricado de cualquier material no absorbente adecuado, tal como un cartón de soporte de plástico adhesivo. En una realización, la matriz de flujo se encuentra intercalada, por lo menos parcialmente, entre un laminado superior y un laminado inferior. El laminado superior puede incluir una ventana de aplicación de la muestra, que proporciona acceso a la zona de recepción de muestras de la matriz de flujo, y también puede incluir una ventana de detección, que proporciona acceso a la zona de detección de la matriz de flujo. Los laminados pueden estar fabricados de cualquier material no absorbente adecuado, por ejemplo una película de plástico adhesivo transparente o translúcido. En una realización adicional, la zona de detección comprende una mezcla de ADP y un reactivo bioluminiscente.

60 **[0122]** La quinasa reportera se une a la matriz de flujo mediante un enlazador que comprende un agente de unión específico para el analito. Los agentes de unión y procedimientos para unir la quinasa reportera a la matriz de flujo son como se describen en relación con el segundo aspecto de la presente invención.

65 **[0123]** En una realización, el dispositivo puede comprender además una zona de reducción de ruido de ruido de fondo, situada entre la zona de recepción de muestras y la zona de detección. Esta zona funciona para eliminar/inactivar cualquier quinasa no reportera y/o ATP que pueda estar presente en la muestra antes de que la muestra alcance la zona de detección. Por lo tanto, se evita que estos contaminantes interfieran con la sensibilidad o precisión del ensayo.

5 **[0124]** En una realización, la zona de eliminación de la reducción de ruido de ruido de fondo comprende una sustancia que selectivamente (o específicamente) inhibe la quinasa no reportera, dejando a la quinasa reportera sustancialmente sin afectar. Los inhibidores adecuados se describen en la presente memoria. En otra realización, la zona de eliminación de la reducción de ruido de ruido de fondo comprende una proteasa que destruye selectivamente la quinasa no reportera, dejando a la quinasa reportera sustancialmente sin afectar. Las proteasas adecuadas se describen en la presente memoria. En una realización adicional, la zona de reducción de ruido de ruido de fondo puede estar dispuesta para capturar físicamente quinasas no reporteras en base a su tamaño, carga, o propiedades de unión tal como se describen en la presente memoria. Por lo tanto, se evita que las quinasas no reporteras capturadas alcancen la zona de detección.

15 **[0125]** En otra realización, la zona de reducción de ruido de ruido de fondo comprende una ATPasa inmovilizada, por ejemplo, apirasa. En otra realización, la zona de reducción de ruido de ruido de fondo puede estar dispuesta para capturar físicamente ATP en base a su tamaño o carga, tal como se describe en la presente memoria. Por lo tanto, se evita que el ATP capturado alcance la zona de detección.

20 **[0126]** En una realización, el ADP en la zona de detección del dispositivo es ADP de alta pureza, y el reactivo bioluminiscente es una mezcla de luciferina y luciferasa. En otra realización, el ADP y la luciferina/luciferasa se inmovilizan en la zona de detección utilizando procedimientos de inmovilización convencionales.

[0127] En otra realización, el dispositivo es portátil.

25 **[0128]** En una realización adicional, la zona de detección puede incluir una membrana catiónica que retiene y concentra el conjugado de quinasa reportera para una mejor detección.

30 **[0129]** En otra realización, la zona de recepción de muestras puede incluir un colorante adecuado que también migra a la zona de detección, que actúa como un control para el flujo adecuado de la muestra a través del dispositivo. Este control interno positivo también puede explotar el uso de una membrana de unión a cationes dentro de la zona de detección para ayudar a retener el colorante para proporcionar una señal visual clara.

35 **[0130]** En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar la actividad de una quinasa reportera en una muestra, en el que el procedimiento se lleva a cabo utilizando un dispositivo de acuerdo con el sexto aspecto de la presente invención, que comprende las etapas de:
 (i) aplicar la muestra a la zona de recepción de muestras del dispositivo;
 (ii) permitir que la muestra fluya a través de la zona de detección del dispositivo; y
 (iii) detectar la emisión de luz de la zona de detección.

40 **[0131]** En una realización, después de la etapa (i), el procedimiento comprende además permitir que la muestra fluya a través de una zona de reducción de ruido de ruido de fondo, tal como se describe en relación con el sexto aspecto de la presente invención.

[0132] En otra realización, la etapa (iii) se lleva a cabo mediante el desprendimiento de la zona de detección del dispositivo, y a continuación se coloca la zona de detección en un luminómetro.

45 **[0133]** En una realización adicional, el procedimiento comprende la etapa de registrar los datos de emisión de luz obtenidas en un soporte de datos adecuado.

50 **[0134]** En un noveno aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un analito en una muestra utilizando el dispositivo descrito en relación con el séptimo aspecto de la presente invención que comprende:
 (i) aplicar la muestra a la zona de recepción de muestras del dispositivo;
 (ii) permitir que cualquier quinasa reportera desplazada de la zona de recepción de muestras migre a la zona de detección; y
 (iii) detectar la emisión de luz de la zona de detección.

55 **[0135]** En una realización, después de la etapa (i), el procedimiento comprende además permitir que la muestra fluya a través de una zona de reducción de ruido de ruido de fondo descrita en relación con el séptimo aspecto de la presente invención.

60 **[0136]** En otra realización, la etapa (iii) se lleva a cabo mediante el desprendimiento de la zona de detección del dispositivo, la exposición de la zona de detección a ADP y un reactivo bioluminiscente, en el que la zona de detección se expone al reactivo bioluminiscente no más de 5 minutos (o no más de 2 minutos, 1 minuto, 30 segundos o 10 segundos) después de haber sido expuesto al ADP, y a continuación la colocación de la zona de detección en un luminómetro. En una realización, la zona de detección se expone al ADP y el reactivo bioluminiscente simultáneamente.

65

[0137] En una realización adicional, el procedimiento comprende la etapa de registro de los datos de emisión de luz obtenidas en un soporte de datos adecuado.

5 [0138] En un décimo aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende un dispositivo según el sexto o séptimo aspecto de la presente invención, y un luminómetro. En una realización, el luminómetro es un luminómetro de mano (es decir, portátil).

SECCIÓN DE DEFINICIONES

10 [0139] El término "emisión de luz" significa que la luz que es emitida por la reacción del ATP con el reactivo bioluminiscente. Esta emisión de luz se puede detectar usando tecnología completamente convencional, tal como un luminómetro estándar (por ejemplo, un luminómetro de microplacas Berthold Orion de 96 pocillos, o un luminómetro de mano).

15 [0140] El término "matriz de flujo" se refiere a cualquier material sólido de transporte de líquidos que permite que líquido fluya a su través, e incluye materiales, tales como nitrocelulosa, nylon, rayón, celulosa, papel, fibra de vidrio, sílice, matrices de gel, o cualquier otro material poroso o fibroso. En una realización, la matriz de flujo está configurada como una tira alargada sustancialmente plana. El material de matriz de flujo se puede pretratar o modificar según se requiera.

20 [0141] El término "quinasa reportera" se refiere a una enzima quinasa que no es una quinasa de mamífero, planta y/o fúngica. Por lo tanto, en el contexto de una muestra biológica a ensayar, una quinasa reportera es una quinasa que normalmente no está presente (hasta cualquier grado significativo) en una muestra tomada de un individuo sano. Dicho de otra manera, una quinasa reportera de la presente invención es una quinasa que normalmente no es inherente o endógeno (hasta cualquier grado significativo) en una muestra tomada de un individuo sano. La quinasa reportera puede añadirse a la muestra como un reactivo separado (es decir, exógeno), por ejemplo, como una quinasa aislada. Las quinasas reporteras son preferiblemente termoestables.

25 [0142] El término "quinasa no reportera" se refiere a una enzima quinasa que no es una quinasa reportera tal como se ha definido anteriormente. Las quinasas no reporteras también pueden referirse como quinasas endógenas, quinasas contaminantes, o quinasas del ruido de ruido de fondo. Las quinasas no reporteras están habitualmente presentes en una muestra tomada de un individuo sano. La actividad de quinasa no reportera también se puede definir como la actividad que no está asociada con la quinasa reportera. Muchas quinasas no reporteras derivan de organismos mesófilos, es decir, organismos que crecen mejor a temperaturas moderadas (por ejemplo, 25 a 40°C).
30 Los ejemplos de quinasas no reporteras incluyen quinasas de mamíferos, plantas y/o fúngicas, en particular, cualquiera de la gama de 7 isoformas de adenilato quinasa humana halladas en cantidades variables en muestras clínicas, proteínas equivalentes en especies animales o alimentos derivados de las mismas, o quinasas (por ejemplo, adenilato quinasas) de organismos comensales comunes en los seres humanos o los animales.

40 [0143] El término "quinasa termoestable" se refiere a una quinasa que retiene la actividad después de la exposición al calor, es decir, se ve relativamente poco afectada por las altas temperaturas. Las quinasas termoestables preferidas retienen al menos el 70% de actividad (o el 80% de actividad, el 90% de actividad, el 95% de actividad, o el 100% de actividad) después de la exposición a una temperatura de entre 50 y 120°C. Las quinasas termoestables particularmente preferidas retienen al menos el 70% de actividad (o el 80% de actividad, el 90% de actividad, el 95% de actividad, o el 100% de actividad) después de la exposición a 50°C durante 30 minutos, o después de la exposición a 60°C durante 30 minutos, o después de la exposición a 70°C durante 30 minutos, o después de la exposición a 80°C durante 20 minutos, o después de la exposición a 90°C durante 3 minutos, o después de la exposición a 120°C durante 3 minutos. Las quinasas termoestables también pueden ser más resistentes que las quinasas no termoestables a una serie de otros procesos bioquímicos y físicos que dañan de forma rutinaria o destruyen proteínas o los vuelven inactivas, tales como la exposición a ciertos productos químicos, por ejemplo, agentes caotrópicos, daño por radicales libres, detergentes, extremos de pH, exposición a proteasas, reticulación de proteínas, encapsulación dentro de las membranas o polímeros no permeables o semipermeables, o inmovilización irreversible sobre las superficies. En una realización particular, las quinasas termoestables pueden retener al menos el 70% de la actividad (o el 80% de actividad, el 90% de actividad, el 95% de actividad, o el 100% de actividad) después de la exposición a uno o más de los procesos bioquímicos y físicos descritos anteriormente. En todos los casos, esta "actividad retenida" puede confirmarse fácilmente usando ensayos convencionales. Brevemente, se incubaba la quinasa con ADP en condiciones de tratamiento determinadas durante una cantidad determinada de tiempo, y a continuación se analiza la actividad residual mediante la detección de la generación de ATP usando luciferina/luciferasa y un luminómetro. A partir de esto, se puede determinar el % de actividad de quinasa retenida
50 después del tratamiento.

[0144] Los términos "quinasa" y "actividad de quinasa" se utilizan indistintamente en toda esta memoria.

65 [0145] El término "muestra" abarca cualquier elemento, instrumento, superficie, fluido o material. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, muestras clínicas (tales como sangre completa, suero, muestras orales, tales como saliva, pus, muestras vaginales, muestras de heces, vómito), muestras ambientales (tal como muestras de agua,

suelo, aire), instrumentos quirúrgicos y médicos, placas de microtitulación, tiras reactivas, dispositivos de flujo lateral, batas de hospital, ropa de cama, líquidos a granel, materia de animales sacrificados, productos farmacéuticos, bancos de trabajo, paredes y suciedades, matrices biológicas e indicadores biológicos.

5 **[0146]** Los términos "sustancialmente libre de quinasa no reportera", "libre de quinasa no reportera", "sustancialmente libre de quinasa distinta de quinasa reportera", y "libre de quinasa distinta de quinasa reportera" se consideran sinónimos y se utilizan indistintamente en toda la memoria para significar que el nivel de quinasa no reportera es suficientemente bajo o ausente y no interfiere en ningún grado significativo con la sensibilidad o precisión del ensayo. En términos de lectura del ensayo, el impacto de la quinasa no reportera se define
10 generalmente en cuanto a la relación señal-ruido. Por tanto, el término "sustancialmente libre" se puede definir también en el sentido de que la quinasa no reportera no representa más del 10% (preferiblemente no más del 5% o 2%) de la señal total de quinasa en el límite de detección del ensayo.

15 **[0147]** Los términos "sustancialmente libre de ATP" y "libre de ATP" se consideran sinónimos y se usan indistintamente en toda la memoria para significar que el nivel de ATP endógeno es suficientemente bajo o ausente y no interfiere en ningún grado significativo con la sensibilidad o precisión del ensayo. El ATP endógeno puede tener un impacto en el ensayo en cuanto a la señal:ruido. Por lo tanto, el término "sustancialmente libre" significa que cualquier ATP endógeno no representa más del 10% (preferiblemente no más del 5% o 2%) de la señal total en el
20 límite de detección del ensayo.

[0148] El término "simultáneamente" significa al mismo tiempo. En el contexto del primer aspecto de la presente invención, donde, en una realización, la quinasa reportera se pone en contacto con ADP y el reactivo bioluminiscente simultáneamente, esto significa que no hay (o sustancialmente no hay) período de incubación separado entre el contacto de la quinasa con ADP y el contacto de la quinasa con el reactivo bioluminiscente.
25

[0149] El término "reactivo bioluminiscente" se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que pueden reaccionar con ATP para generar luz. Un reactivo preferido es una mezcla de luciferina y luciferasa.

[0150] El término "RLU" significa Unidad relativa de luz. Las unidades relativas de luz son una medición relativa, no absoluta. Los valores proporcionados en la memoria se refieren a mediciones realizadas utilizando un luminómetro de microplacas de 96 pocillos Berthold Orion con sistema de inyección utilizando un procedimiento "flash" de medición de la luz durante 2 segundos inmediatamente después de la adición de los reactivos luciferasa/luciferina (luz de medición con fotomultiplicador según especificación técnica emitida a una longitud de onda de 300-650 nm). Para solucionar este problema, los fabricantes han generado datos para "factores" de RLU, que permiten a los datos generados por un luminómetro determinado normalizarse a un patrón calibrado. De este modo, se pueden hacer comparaciones entre diferentes instrumentos. El factor de para el RLU luminómetro de microplacas de 96 pocillos Berthold Orion es 1. Por consiguiente, los valores de RLU proporcionados en la memoria se pueden considerar como valores de RLU normalizados/estandarizados.
30
35

40 **[0151]** En términos de valores absolutos, un valor de RLU puede estar relacionado con la concentración de ATP requerida para dar dicho valor con los reactivos tal como se describe en el procedimiento. Como conversión aproximada, y dada la relación lineal entre los valores de RLU y la concentración de ATP, se pueden utilizar los siguientes valores:

RLU	Concentración aproximada de ATP/ μ M
12.000.000	1000
1.200.000	100
120.000	10
12.000	1
1.200	0,1
120	0,01

45 **[0152]** Todas las referencias citadas en esta solicitud se incorporan por referencia en su totalidad.

SEQ ID 1 Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Sulfolobus solfataricus*
SEQ ID 2 Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Sulfolobus acidocaldarius*
SEQ ID 3 Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Sulfolobus tokodaii*
50 **SEQ ID 4** Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Pyrococcus furiosus*
SEQ ID 5 Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Pyrococcus horikoshii*
SEQ ID 6 Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Pyrococcus abyssi*
SEQ ID 7 Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Methanococcus thermolithotrophicus*
SEQ ID 8 Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Methanococcus voltae*
55 **SEQ ID 9** Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Methanococcus jannaschii*
SEQ ID 10 Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Methanopyrus kandleri*
SEQ ID 11 Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Methanoterris igneus*
SEQ ID 12 Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Pyrobaculum aerophilum*

	SEQ ID 13	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i>
	SEQ ID 14	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Aeropyrum pernix</i>
	SEQ ID 15	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Archaeoglobus fulgidus</i>
5	SEQ ID 16	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Pyrococcus abyssi</i> (adenilato quinasa monomérica (Adke))
	SEQ ID 17	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Pyrococcus furiosus</i> modificada genéticamente para proporcionar una mayor estabilidad
	SEQ ID 18	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Pyrococcus horikoshii</i> modificada genéticamente para proporcionar una mayor estabilidad
10	SEQ ID 19	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> modificada genéticamente para proporcionar una mayor estabilidad
	SEQ ID 20	Secuencia de proteína de acetato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i>
	SEQ ID 21	Secuencia de proteína de piruvato quinasa de <i>Pyrococcus horikoshii</i>
	SEQ ID 22	Secuencia de proteína de piruvato quinasa de <i>Sulfolobus solfataricus</i>
15	SEQ ID 23	Secuencia de proteína de piruvato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i>
	SEQ ID 24	Secuencia de proteína de piruvato quinasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>
	SEQ ID 25	Secuencia de proteína de acetato quinasa de <i>Methanosarcina thermophila</i>
	SEQ ID 26	Secuencia de ADN que codifica la adenilato quinasa de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
20	SEQ ID 27	Secuencia de ADN que codifica la adenilato quinasa de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> , en la que el uso de codones se ha optimizado para la expresión del gen en <i>E-coli</i> .
	SEQ ID 28	Secuencia de ADN que codifica la adenilato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i>
	SEQ ID 29	Secuencia de ADN que codifica la adenilato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i> , en la que el uso de codones se ha optimizado para la expresión del gen en <i>E-coli</i> .
25	SEQ ID 30	Secuencia de ADN que codifica la adenilato quinasa de <i>Archaeoglobus fulgidus</i> , en la que el uso de codones se ha optimizado para la expresión del gen en <i>E-coli</i> .
	SEQ ID 31	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> , en la que el uso de codones se ha optimizado para la expresión del gen en <i>E-coli</i> (SEQ ID 27).
	SEQ ID 32	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i> , en la que el uso de codones se ha optimizado para la expresión del gen en <i>E-coli</i> (SEQ ID 29).
30	SEQ ID 33	Secuencia de proteína de sustrato de transglutaminasa
	SEQ ID 34	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> fusionada en el extremo N-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII)
	SEQ ID 35	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> fusionada en el extremo C-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII)
35	SEQ ID 36	Secuencia de la proteína de adenilato quinasa de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> fusionada en el extremo N-terminal y C-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII)
	SEQ ID 37	Secuencia de ADN de secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII) fusionada al extremo 5' de la adenilato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i> .
40	SEQ ID 38	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i> fusionada en el extremo N-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII).
	SEQ ID 39	Secuencia de ADN de secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII) fusionada al extremo 3' de adenilato quinasa de <i>Thermotoga</i> .
	SEQ ID 40	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i> fusionada en el extremo C-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII).
45	SEQ ID 41	Secuencia de ADN de secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII) fusionada al extremo 5' y 3' de adenilato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i> .
	SEQ ID 42	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i> fusionada en el extremo N- y C-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII).
50	SEQ ID 43	Secuencia de ADN de la construcción de gen completa de Sup35 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
	SEQ ID 44	Secuencia de proteína de Sup35 completa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
	SEQ ID 45	Secuencia de ADN de sup35N (dominio N-terminal) con codones predispuestos para la expresión óptima en <i>E. coli</i> .
	SEQ ID 46	Secuencia de proteína de sup35N (dominio N-terminal).
55	SEQ ID 47	Secuencia de ADN de adenilato quinasa de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> con codones predispuestos en <i>E. coli</i> fusionada en el extremo N-terminal con el dominio N-terminal de Sup35 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SEQ ID 48	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> fusionada en el extremo N-terminal con el dominio N-terminal de Sup35 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SEQ ID 49	Secuencia de ADN de adenilato quinasa de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> con codones predispuestos en <i>E. coli</i> fusionada en el extremo N-terminal con el dominio C-terminal de Sup35 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
60	SEQ ID 50	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> fusionada en el extremo C-terminal con el dominio N-terminal Sup35 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SEQ ID 51	Secuencia de ADN de Sup35N fusionada en el extremo 5' de la adenilato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i> .
65	SEQ ID 52	Secuencia de proteína de adenilato quinasa de <i>Thermotoga maritima</i> fusionada en el extremo N-terminal con Sup35N.
	SEQ ID 53	Secuencia de ADN de Sup35N fusionada en el extremo 3' de adenilato quinasa de <i>Thermotoga</i>

maritima

- SEQ ID 54** Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Thermotoga maritima* fusionada en el extremo C-terminal con Sup35N
- 5 **SEQ ID 55** Secuencia de ADN que codifica un péptido corto de Sup35 capaz de agregarse para formar fibrillas de amiloide; para su uso como péptido de fusión con genes de tAK.
- SEQ ID 56** Péptido amiloide derivado de Sup35
- SEQ ID 57** Secuencia de ADN que codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa)
- SEQ ID 58** Secuencia de proteína de una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa)
- 10 **SEQ ID 59** Secuencia de ADN para un gen sintético que codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa) optimizada para la expresión en *E. coli*
- SEQ ID 60** Secuencia de ADN para un gen sintético que codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa) optimizada para la expresión en *E. coli* fusionada en el extremo 5' de un gen que codifica la tAK de *Thermotoga maritima*.
- 15 **SEQ ID 61** Secuencia de proteína de una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa) fusionada en el extremo N-terminal de la adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*.
- SEQ ID 62** Secuencia de proteína de una proteína de la cubierta del bacteriófago MS2
- SEQ ID 63** Secuencia de proteína de un monómero de proteína de la cubierta del bacteriófago PP7
- SEQ ID 64** Secuencia de proteína de un dímero de proteína de la cubierta del bacteriófago PP7
- 20 **SEQ ID 65** Secuencia de la proteína *CsgA* de *E. coli*
- SEQ ID 66** Secuencia de proteína de *Salmonella AgfA*
- SEQ ID 67** Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Thermotoga maritima* fusionada al extremo N de *CsgA* de *E. coli*
- SEQ ID 68** Secuencia de proteína de la proteína hidrofobina 3 de la especie *Fusarium*
- 25 **SEQ ID 69** Secuencia de proteína de la proteína hidrofobina 5 de la especie *Fusarium*
- SEQ ID 70** Secuencia de proteína de la proteína similar al cemento de *Balanus albicostatus* (19K)
- SEQ ID 71** Secuencia de proteína de la proteína similar al cemento de *Megabalanus rosa* (20k)
- SEQ ID 72** Secuencia de proteína de fusión de la proteína de percebe de *Balanus albicostatus* con la tAK de *Thermotoga maritima*; fusión N-terminal
- 30 **SEQ ID 73** Secuencia de proteína de fusión de la proteína de percebe *Balanus albicostatus* con la tAK de *Thermotoga maritima*; fusión C-terminal
- SEQ ID 74** Secuencia de proteína de *Balanus albicostatus* adsorbente específica de calcita
- SEQ ID 75** Secuencia de proteína de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe
- SEQ ID 76** Secuencia de proteína de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe
- 35 **SEQ ID 77** Secuencia de proteína de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe
- SEQ ID 78** Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *E. coli*
- SEQ ID 79** Secuencia de proteína de piruvato quinasa de *E. coli*
- SEQ ID 80** Secuencia de proteína de acetato quinasa de *E. coli*
- SEQ ID 81** Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Methanococcus voltae* (OMV)
- 40 **SEQ ID 82** Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Methanococcus thermolithotrophicus* (MTH).
- SEQ ID 83** Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Bacillus globisporus*
- SEQ ID 84** Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Bacillus subtilis*

LISTADO DE SECUENCIAS

45 **[0153]**

SEQ ID NO:1

50 Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Thr Thr Val Leu Ser Phe Ala Asp Lys Ile Leu Thr
 Glu Lys Gly Ile Ser Lys Ile Val Asn Tyr Gly Asp Tyr Met Leu Asn Thr Ala Leu Lys Glu Gly Tyr Val Lys Ser
 55 Arg Asp Glu Ile Arg Lys Leu Gln Ile Glu Lys Gln Arg Glu Leu Gln Ala Leu Ala Ala Arg Arg Ile Val Glu Asp
 Leu Ser Leu Leu Gly Asp Glu Gly Ile Gly Leu Ile Asp Thr His Ala Ile Arg Thr Pro Ala Gly Tyr Leu Pro Gly
 Leu Pro Arg His Val Ile Glu Val Leu Ser Pro Lys Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile Ile Leu Glu
 60 Arg Gln Lys Arg Asp Ser Ser Arg Ala Arg Thr Asp Tyr Ser Asp Thr Ala Val Ile Asn Glu Val Ile Gln Phe Ala
 Arg Tyr Ser Ala Met Ala Ser Ala Val Leu Val Gly Ala Ser Val Lys Val Val Val Asn Gln Glu Gly Asp Pro Ser
 Ile Ala Ala Ser Glu Ile Ile Asn Ser Leu Met

65

SEQ ID NO: 2

Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn
 5 Gln Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp
 Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu
 Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly
 10 Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile Ile Leu Ser
 Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe
 Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val Asn Val Glu Gly Asp Pro
 15 Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser Met Lys

SEQ ID NO: 3

Met Ser Lys Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Thr Thr Val Leu Ser Lys Val Lys Glu Ile
 20 Leu Glu Glu Lys Lys Ile Asn Asn Lys Ile Val Asn Tyr Gly Asp Tyr Met Leu Met Thr Ala Met Lys Leu Gly Tyr
 Val Asn Asn Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Val Glu Lys Gln Lys Gln Leu Gln Ile Glu Ala Ala Arg Gly Ile
 25 Ala Asn Glu Ala Lys Glu Gly Gly Asp Gly Leu Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr
 Leu Pro Gly Leu Pro Lys Tyr Val Ile Glu Glu Ile Asn Pro Arg Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Val
 Ile Leu Asp Arg Gln Lys Arg Asp Thr Ser Arg Ser Arg Ser Asp Tyr Ser Asp Glu Arg Ile Ile Ser Glu Thr Ile
 30 Asn Phe Ala Arg Tyr Ala Ala Met Ala Ser Ala Val Leu Val Gly Ala Thr Val Lys Ile Val Ile Asn Val Glu Gly
 Asp Pro Ala Val Ala Ala Asn Glu Ile Ile Asn Ser Met Leu

SEQ ID NO: 4

Met Pro Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Ile Thr Arg Leu Ala Leu Gln Arg Thr Lys
 35 Ala Lys Phe Arg Leu Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Val Lys Ala Gly Leu Val Lys His Arg
 Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Lys Ile Gln Arg Glu Leu Gln Met Lys Ala Ala Lys Lys Ile Thr Glu Met Ala
 40 Lys Glu His Pro Ile Leu Val Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly Tyr Met Leu Gly Leu Pro Tyr Glu
 Val Val Lys Thr Leu Asn Pro Asn Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg Leu Arg
 45 Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala
 Ala Ile Ala Tyr Ala Met His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly Leu Glu Glu Ala Val
 50 Asn Glu Leu Val Lys Ile Leu Asp Leu Ala Val Asn Glu Tyr Ala

SEQ ID NO: 5

Met Pro Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Ile Thr Lys Leu Ala Leu Gln Arg Thr Arg
 55 Ala Lys Phe Lys Leu Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Leu Lys Leu Lys Leu Val Lys His Arg
 Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Glu Val Gln Arg Glu Leu Gln Met Asn Ala Ala Lys Lys Ile Ala Glu Met
 60 Ala Lys Asn Tyr Pro Ile Leu Leu Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly Tyr Leu Leu Gly Leu Pro Tyr
 Glu Val Ile Lys Ile Leu Asn Pro Asn Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg Leu Arg
 Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala Ala Ile
 65 Thr Tyr Ala Met His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly Leu Glu Glu Ala Val Asn
 Glu Leu Val Lys Ile Leu Asp Leu Ala Val Lys Glu Tyr Ala

SEQ ID NO: 6

5 Met Ser Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Ile Thr Arg Leu Ala Leu Gln Arg Thr Lys
 Ala Lys Phe Lys Leu Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Val Lys Ala Gly Leu Val Asn His Arg
 Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Glu Ile Gln Arg Asp Leu Gln Met Lys Val Ala Lys Lys Ile Ser Glu Met
 10 Ala Arg Gln Gln Pro Ile Leu Leu Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly Tyr Leu Leu Gly Leu Pro Tyr
 Glu Val Ile Lys Thr Leu Asn Pro Asn Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg Leu
 Arg Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala
 15 Ala Ile Ala Tyr Ala Met His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly Leu Glu Glu Ala Val
 Asn Glu Leu Val Glu Ile Leu Asp Leu Ala Val Lys Glu Tyr Ala

SEQ ID NO: 7

20
 Met Lys Asn Lys Leu Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Thr Thr Ile Thr Gln Lys Ala Met Glu Lys
 Leu Ser Glu Glu Gly Ile Asn Tyr Lys Met Val Asn Phe Gly Thr Val Met Phe Glu Val Ala Gln Glu Glu Asn
 25 Leu Val Glu Asp Arg Asp Gln Met Arg Lys Leu Asp Pro Asp Thr Gln Lys Arg Ile Gln Lys Leu Ala Gly Arg
 Lys Ile Ala Glu Met Val Lys Glu Ser Pro Val Val Val Asp Thr His Ser Thr Ile Lys Thr Pro Lys Gly Tyr Leu
 Pro Gly Leu Pro Val Trp Val Leu Asn Glu Leu Asn Pro Asp Ile Ile Ile Val Val Glu Thr Ser Gly Asp Glu Ile
 30 Leu Ile Arg Arg Leu Asn Asp Glu Thr Arg Asn Arg Asp Leu Glu Thr Thr Ala Gly Ile Glu Glu His Gln Ile Met
 Asn Arg Ala Ala Ala Met Thr Tyr Gly Val Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Ile Gln Asn Lys Asn Asn Leu Leu
 Asp Tyr Ala Val Glu Glu Leu Ile Ser Val Leu Arg

SEQ ID NO: 8

35
 Met Lys Asn Lys Val Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Ser Thr Thr Ser Ser Gln Leu Ala Met Asp
 40 Asn Leu Arg Lys Glu Gly Val Asn Tyr Lys Met Val Ser Phe Gly Ser Val Met Phe Glu Val Ala Lys Glu Glu
 Asn Leu Val Ser Asp Arg Asp Gln Met Arg Lys Met Asp Pro Glu Thr Gln Lys Arg Ile Gln Lys Met Ala
 45 Gly Arg Lys Ile Ala Glu Met Ala Lys Glu Ser Pro Val Ala Val Asp Thr His Ser Thr Val Ser Thr Pro Lys Gly
 Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Trp Val Leu Asn Glu Leu Asn Pro Asp Leu Ile Ile Val Val Glu Thr Thr Gly Asp
 Glu Ile Leu Met Arg Arg Met Ser Asp Glu Thr Arg Val Arg Asp Leu Asp Thr Ala Ser Thr Ile Glu Gln His Gln
 50 Phe Met Asn Arg Cys Ala Ala Met Ser Tyr Gly Val Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Val Gln Asn Arg Asn
 Gly Leu Leu Asp Gln Ala Val Glu Glu Leu Thr Asn Val Leu Arg

55

60

65

SEQ ID NO: 9

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

SEQ ID NO: 10

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

SEQ ID NO: 11

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

SEQ ID NO: 12

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

SEQ ID NO: 13

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

20 **SEQ ID NO: 14**

Met Lys Val Arg His Pro Phe Lys Val Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Lys Thr Thr Val Ile Lys Glu
 25 Leu Gln Gly Leu Ala Glu Lys Glu Gly Val Lys Leu His Ile Val Asn Phe Gly Ser Phe Met Leu Asp Thr Ala
 Val Lys Leu Gly Leu Val Glu Asp Arg Asp Lys Ile Arg Thr Leu Pro Leu Arg Arg Gln Leu Glu Leu Gln Arg
 Glu Ala Ala Lys Arg Ile Val Ala Glu Ala Ser Lys Ala Leu Gly Gly Asp Gly Val Leu Ile Ile Asp Thr His Ala
 30 Leu Val Lys Thr Val Ala Gly Tyr Trp Pro Gly Leu Pro Lys His Val Leu Asp Glu Leu Lys Pro Asp Met Ile Ala
 Val Val Glu Ala Ser Pro Glu Glu Val Ala Ala Arg Gln Ala Arg Asp Thr Thr Arg Tyr Arg Val Asp Ile Gly Gly
 Val Glu Gly Val Lys Arg Leu Met Glu Asn Ala Arg Ala Ala Ser Ile Ala Ser Ala Ile Gln Tyr Ala Ser Thr Val
 35 Ala Ile Val Glu Asn Arg Glu Gly Glu Ala Ala Lys Ala Ala Glu Glu Leu Leu Arg Leu Ile Lys Asn Leu

SEQ ID NO: 15

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

60

65

SEQ ID NO: 16

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

SEQ ID NO: 17

20 Met Pro Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Ile Thr Arg Leu Ala Leu Gln Arg Thr Lys
 Ala Lys Phe Arg Leu Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Val Lys Ala Gly Leu Val Lys His Arg
 25 Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Xaa Ile Gln Arg Glu Leu Gln Met Lys Ala Ala Lys Lys Ile Xaa Glu Met
 Ala Lys Glu His Pro Ile Leu Val Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly Tyr Xaa Leu Gly Leu Pro Tyr
 Glu Val Val Lys Thr Leu Asn Pro Asn Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg Leu
 30 Arg Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala
 Ala Ile Xaa Tyr Ala Met His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly Leu Glu Glu Ala
 Val Asn Glu Leu Val Lys Ile Leu Asp Leu Ala Val Asn Glu Tyr Ala

SEQ ID NO: 18

35 Met Pro Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Ile Thr Lys Leu Ala Leu Gln Arg Thr Arg
 40 Ala Lys Phe Lys Leu Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Leu Lys Leu Xaa Leu Val Lys His Arg
 Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Glu Val Gln Arg Glu Leu Gln Met Asn Ala Ala Lys Lys Ile Ala Glu Met
 Ala Lys Asn Tyr Pro Ile Leu Leu Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly Tyr Leu Leu Gly Leu Pro Tyr
 45 Glu Val Ile Lys Ile Leu Asn Pro Asn Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg Leu Arg
 Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala Ala Ile
 Xaa Tyr Ala Met His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly Leu Glu Glu Ala Val Asn
 50 Glu Leu Val Lys Ile Leu Asp Leu Ala Val Lys Glu Tyr Ala

SEQ ID NO: 19

55 Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu
 Asp Asn Gln Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala
 Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala
 60 Glu Glu Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Xaa
 Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile Ile
 Leu Ser Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile
 65 Asn Phe Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val Asn Val Glu Gly
 Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser Met Lys

SEQ ID NO: 20

5 Met Arg Val Leu Val Ile Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ile Lys Tyr Gln Leu Ile Glu Met Glu Gly Glu Lys Val Leu
 Cys Lys Gly Ile Ala Glu Arg Ile Gly Ile Glu Gly Ser Arg Leu Val His Arg Val Gly Asp Glu Lys His Val Ile Glu
 Arg Glu Leu Pro Asp His Glu Glu Ala Leu Lys Leu Ile Leu Asn Thr Leu Val Asp Glu Lys Leu Gly Val Ile
 10 Lys Asp Leu Lys Glu Ile Asp Ala Val Gly His Arg Val Val His Gly Gly Glu Arg Phe Lys Glu Ser Val Leu Val
 Asp Glu Glu Val Leu Lys Ala Ile Glu Glu Val Ser Pro Leu Ala Pro Leu His Asn Pro Ala Asn Leu Met Gly Ile
 Lys Ala Ala Met Lys Leu Leu Pro Gly Val Pro Asn Val Ala Val Phe Asp Thr Ala Phe His Gln Thr Ile Pro Gln
 15 Lys Ala Tyr Leu Tyr Ala Ile Pro Tyr Glu Tyr Tyr Glu Lys Tyr Lys Ile Arg Arg Tyr Gly Phe His Gly Thr Ser
 His Arg Tyr Val Ser Lys Arg Ala Ala Glu Ile Leu Gly Lys Lys Leu Glu Glu Leu Lys Ile Ile Thr Cys His Ile Gly
 Asn Gly Ala Ser Val Ala Ala Val Lys Tyr Gly Lys Cys Val Asp Thr Ser Met Gly Phe Thr Pro Leu Glu Gly
 20 Leu Val Met Gly Thr Arg Ser Gly Asp Leu Asp Pro Ala Ile Pro Phe Phe Ile Met Glu Lys Glu Gly Ile Ser Pro
 Gln Glu Met Tyr Asp Ile Leu Asn Lys Lys Ser Gly Val Tyr Gly Leu Ser Lys Gly Phe Ser Ser Asp Met Arg
 Asp Ile Glu Glu Ala Ala Leu Lys Gly Asp Glu Trp Cys Lys Leu Val Leu Glu Ile Tyr Asp Tyr Arg Ile Ala Lys
 25 Tyr Ile Gly Ala Tyr Ala Ala Ala Met Asn Gly Val Asp Ala Ile Val Phe Thr Ala Gly Val Gly Glu Asn Ser Pro
 Ile Thr Arg Glu Asp Val Cys Ser Tyr Leu Glu Phe Leu Gly Val Lys Leu Asp Lys Gln Lys Asn Glu Glu Thr
 Ile Arg Gly Lys Glu Gly Ile Ile Ser Thr Pro Asp Ser Arg Val Lys Val Leu Val Val Pro Thr Asn Glu Glu Leu
 30 Met Ile Ala Arg Asp Thr Lys Glu Ile Val Glu Lys Ile Gly Arg

SEQ ID NO: 21

35 Met Arg Arg Met Lys Leu Pro Ser His Lys Thr Lys Ile Val Ala Thr Ile Gly Pro Ala Thr Asn Ser Lys Lys Met
 Ile Lys Lys Leu Ile Glu Ala Gly Met Asn Val Ala Arg Ile Asn Phe Ser His Gly Thr Phe Glu Glu His Ala Lys
 Ile Ile Glu Met Val Arg Glu Gln Ser Gln Lys Leu Asp Arg Arg Val Ala Ile Leu Ala Asp Leu Pro Gly Leu Lys
 40 Ile Arg Val Gly Glu Ile Lys Gly Gly Tyr Val Glu Leu Glu Arg Gly Glu Lys Val Thr Leu Thr Thr Lys Asp Ile
 Glu Gly Asp Glu Thr Thr Ile Pro Val Glu Tyr Lys Asp Phe Pro Lys Leu Val Ser Lys Gly Asp Val Ile Tyr Leu
 Ser Asp Gly Tyr Ile Val Leu Arg Val Glu Asp Val Lys Glu Asn Glu Val Glu Ala Val Val Ile Ser Gly Gly Lys
 45 Leu Phe Ser Arg Lys Gly Ile Asn Ile Pro Lys Ala Tyr Leu Pro Val Glu Ala Ile Thr Pro Arg Asp Ile Glu Ile
 Met Lys Phe Ala Ile Glu His Gly Val Asp Ala Ile Gly Leu Ser Phe Val Gly Asn Val Tyr Asp Val Leu Lys Ala
 Lys Ser Phe Leu Glu Arg Asn Gly Ala Gly Asp Thr Phe Val Ile Ala Lys Ile Glu Arg Pro Asp Ala Val Arg Asn
 50 Phe Asn Glu Ile Leu Asn Ala Ala Asp Gly Ile Met Ile Ala Arg Gly Asp Leu Gly Val Glu Met Pro Ile Glu Gln

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

SEQ ID NO: 22

5 Met Arg Lys Thr Lys Ile Val Ala Thr Leu Gly Pro Ser Ser Glu Glu Lys Val Lys Glu Leu Ala Glu Tyr Val Asp
 Val Phe Arg Ile Asn Phe Ala His Gly Asp Glu Thr Ser His Arg Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Arg Thr Tyr Ala Pro
 Glu Ser Ser Ile Ile Val Asp Leu Pro Gly Pro Lys Leu Arg Leu Gly Glu Leu Lys Glu Pro Ile Glu Val Lys Lys
 10 Gly Asp Lys Ile Val Phe Ser Gln Lys Asp Gly Ile Pro Val Asp Asp Glu Leu Phe Tyr Ser Ala Val Lys Glu
 Asn Ser Asp Ile Leu Ile Ala Asp Gly Thr Ile Arg Val Arg Val Lys Ser Lys Ala Lys Asp Arg Val Glu Gly Thr
 Val Ile Glu Gly Gly Ile Leu Leu Ser Arg Lys Gly Ile Asn Ile Pro Asn Val Asn Leu Lys Ser Gly Ile Thr Asp
 15 Asn Asp Leu Lys Leu Leu Lys Arg Ala Leu Asp Leu Gly Ala Asp Tyr Ile Gly Leu Ser Phe Val Ile Ser Glu
 Asn Asp Val Lys Lys Val Lys Glu Phe Val Gly Asp Glu Ala Trp Val Ile Ala Lys Ile Glu Lys Ser Glu Ala Leu
 Lys Asn Leu Thr Asn Ile Val Asn Glu Ser Asp Gly Ile Met Val Ala Arg Gly Asp Leu Gly Val Glu Thr Gly Leu
 20 Glu Asn Leu Pro Leu Ile Gln Arg Arg Ile Val Arg Thr Ser Arg Val Phe Gly Lys Pro Val Ile Leu Ala Thr Gln
 Val Leu Thr Ser Met Ile Asn Ser Pro Ile Pro Thr Arg Ala Glu Ile Ile Asp Ile Ser Asn Ser Ile Met Gln Gly Val
 Asp Ser Ile Met Leu Ser Asp Glu Thr Ala Ile Gly Asn Tyr Pro Val Glu Ser Val Arg Thr Leu His Asn Ile Ile
 Ser Asn Val Glu Lys Ser Val Lys His Arg Pro Ile Gly Pro Leu Asn Ser Glu Ser Asp Ala Ile Ala Leu Ala Ala
 25 Val Asn Ala Ser Lys Val Ser Lys Ala Asp Val Ile Val Val Tyr Ser Arg Ser Gly Asn Ser Ile Leu Arg Val Ser
 Arg Leu Arg Pro Glu Arg Asn Ile Ile Gly Val Ser Pro Asp Pro Arg Leu Ala Lys Lys Phe Lys Leu Cys Tyr Gly
 Val Ile Pro Ile Ser Ile Asn Lys Lys Met Gln Ser Ile Asp Glu Ile Ile Asp Val Ser Ala Lys Leu Met Gln Glu Lys
 30 Ile Lys Asp Leu Lys Phe Lys Lys Ile Val Ile Val Gly Gly Asp Pro Lys Gln Glu Ala Gly Lys Thr Asn Phe Val
 Ile Val Lys Thr Leu Glu Gln Gln Lys Lys

SEQ ID NO: 23

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

SEQ ID NO: 24

5 Met Arg Arg Val Lys Leu Pro Ser His Lys Thr Lys Ile Val Ala Thr Ile Gly Pro Ala Thr Asn Ser Arg Lys Met
 Ile Lys Gln Leu Ile Lys Ala Gly Met Asn Val Ala Arg Ile Asn Phe Ser His Gly Ser Phe Glu Glu His Ala Arg
 Val Ile Glu Ile Ile Arg Glu Glu Ala Gln Lys Leu Asp Arg Arg Val Ala Ile Leu Ala Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ile
 Arg Val Gly Glu Ile Lys Gly Gly Tyr Val Glu Leu Lys Arg Gly Glu Lys Val Ile Leu Thr Thr Lys Asp Val Glu
 10 Gly Asp Glu Thr Thr Ile Pro Val Asp Tyr Lys Gly Phe Pro Asn Leu Val Ser Lys Gly Asp Ile Ile Tyr Leu Asn
 Asp Gly Tyr Ile Val Leu Lys Val Glu Asn Val Arg Glu Asn Glu Val Glu Ala Val Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu
 Phe Ser Arg Lys Gly Val Asn Ile Pro Lys Ala Tyr Leu Pro Val Glu Ala Ile Thr Pro Lys Asp Phe Glu Ile Met
 15 Lys Phe Ala Ile Glu His Gly Val Asp Ala Ile Gly Leu Ser Phe Val Gly Ser Val Tyr Asp Val Leu Lys Ala Lys
 Ser Phe Leu Glu Lys Asn Asn Ala Glu Asp Val Phe Val Ile Ala Lys Ile Glu Arg Pro Asp Ala Val Arg Asn
 Phe Asp Glu Ile Leu Asn Ala Ala Asp Gly Ile Met Ile Ala Arg Gly Asp Leu Gly Val Glu Met Pro Ile Glu Gln
 20 Leu Pro Ile Leu Gln Lys Lys Leu Ile Arg Lys Ala Asn Met Glu Gly Lys Pro Val Ile Thr Ala Thr Gln Met Leu
 Val Ser Met Thr Thr Glu Lys Val Pro Thr Arg Ala Glu Val Thr Asp Val Ala Asn Ala Ile Leu Asp Gly Thr Asp
 Ala Val Met Leu Ser Glu Glu Thr Ala Ile Gly Lys Phe Pro Ile Glu Thr Val Glu Met Met Gly Lys Ile Ala Lys
 25 Val Thr Glu Glu Tyr Arg Glu Ser Phe Gly Leu Ser Arg Ile Arg Glu Phe Met Glu Ile Lys Lys Gly Thr Ile Lys
 Glu Ala Ile Thr Arg Ser Ile Ile Asp Ala Ile Cys Thr Ile Asp Ile Lys Phe Ile Leu Thr Pro Thr Arg Thr Gly Arg
 Thr Ala Arg Leu Ile Ser Arg Phe Lys Pro Lys Gln Trp Ile Leu Ala Phe Ser Thr Asn Glu Arg Val Cys Asn
 30 Asn Leu Met Phe Ser Tyr Gly Val Tyr Pro Phe Cys Leu Glu Glu Gly Phe Asp Glu Asn Asp Ile Val Arg Leu
 Ile Lys Gly Leu Gly Leu Val Glu Ser Asp Asp Met Val Leu Met Thr Glu Gly Lys Pro Ile Glu Lys Thr Val Gly
 Thr Asn Ser Ile Lys Ile Phe Gln Ile Ala

35 **SEQ ID NO: 25**

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

SEQ ID NO: 26

atgaagattg glattgtaac tggaaftcct ggtgtaggga aaagtactgt ctggctaaa gtaaaagaga tattggataa tcaaggata
 aataacaaga tcataaatta tggagatttt aigttagcaa cagcaftaaa attaggctat gctaaagafa gagaagaaat gagaaaatta
 5 tctgtagaaa agcagaagaa atgcagatt galgcggcfa aaggfatagc tgaagaggca agagcaggte gagaaggata tctgtcata
 gatagcaatg ctgtgatacg tacacctct ggataftac ctggtfacc gtcatafca attacagaaa faaafccgtc tgfiaottt
 ttactggaag ctgatoctaa gataatatta tcaaggcaaa agagagatac aacaaggaat agaaatgatt atagtacga atcagltata
 10 ttgaaacca faaactfocg tagatafca gctactgct ctgcaglatt agccggttct actgftaagg taattgtaa cgtggaagga
 gatcctagta tagcagctaa tgagalaata aggtctatga agtaa

SEQ ID NO: 27

atgaaaaatg glatcgtac cggatcccg ggigtggfa aatctaccgt tctggctaaa gtaaaagaaa tctggacaaa ccagggtac
 aacaacaaaa tcaataacta cggtagcttc aigtctggca ccgtctgaa actgggtlac gctaaagacc gtagcagaaat gctaaactg
 20 tctgtgaaa aacagaaaaa actgcagatc gaccgtcfa aaggtatgc tgaagaagct ctgctggte gfgaaggfta cctgtcacc
 gacacccacg ctgtatccg taccocgtct ggftaccgc cgggtctgc gicttacgtt atcaccgaaa tcaaccgtc tgfiaottt
 ctgtggaag ctgaccgaa aatcaactg tctgtcaga aactgacac caccgtaac cgtaacact actctgaga atctgtatc
 25 ctgaaacca tcaactcgc tcttacct gctaccgtt ctgctgtct ggctggttct accgtaaaag ttactgfaa cgtggaaggt
 gaccocfca tctgtctaa cgaatcacc cgttctatga aatag

SEQ ID NO: 28

atgatggct accitgtct tctaggacct ccagggtcag gaaaaggaa cctaccgaa agaitgcagg aaataaccgg gattcctcat
 atatccaccg gtagacttt cagggacatt gtaaaaaag agaaccgca gctgggaaa aagataaaag agatcatgga
 35 aaggggagaa ctgttcccg aogaaactgt gaaccagggt gtgaaaagaa gactctcaga aaaagattgt gaaagaggat tcaactgga
 cggctatcca agaaccgtg ctaccggga atctctgac ggtctttga aaactcaaaa caaagagctc accgctcctg tactcttga
 agttctgag gaagtggctg ttacaggct caccggcaga aggatctgc cgaatgttg aagaatttac aattgattt cgtccctcc
 40 aaaaagaagac gaactgtcg atgattgaa agtgaagctc gttcagagag aagaccgaca agaagaaca gtagacaca
 gatacaaggt ttactcaga aagacacagc cagtgaatga ttactacat aaaaagggca ttctcaaacg agtggatggt
 45 accataggaa tagacaactg gatcgtgaa gtgttaaaga taatagggtg gagtgataaa tga

SEQ ID NO: 29

atgatggct atctggltt tctggcca ccggggcag gcaaggfac atagcagaaa cgtttaccgg aaatcacogg catcccgac
 atagcacgg gtagacttt togigatatt gtaaaaaagg aaaatgaca attaggttag aaaatfaag aaatfatgga ggcggcgag
 55 ttgggtccgg acaactggt gaatgaagtt gtaaacctc ggtctctga aaaggaitgc gaaogggct ttatttggga cggftaccg
 cgtacagtag ctaccgaga gttctgac ggtctctga agactcaga faaggagta accgctcgg tctgttoga ggtgctgaa
 gagggtctg ttacggctt gaaccggcgg cgtatctgc cgaatgttg togtattac aactgattt caactctcc aaaagaagat
 60 gaactgtg atgactcaa agtaaaactg gtgcaaccgg aagatgata agaggaaact gtagccacc gctacaaagt atactgga
 aaaacccaac cggftatga ttattgat aaaaaaggca tttagaacg cgtgatgg accatcggca tggataact gattccgaa
 gttctcaaaa taattgggtg gagtgataaa

SEQ ID NO: 30

atgaacctga tttctctggg tccgcctggg gcaggcaaag gcaccaggc gaaacgtgtg tctgaaaagt acggtatccc gcagattag
 accggogafa tctctcgtga agcggttgc aagggtacgg aactggggaa aaaggcgaaa gaatatatgg acaaagggga
 5 acitgttccg gatgaagtag ttattggaat cgtgaaagaa cgcctccagc aaccggattg tgagaagggc ttattctgg acggtttcc
 gctacgtta gcacaagccg aagctctgga cgaatgtta aaagaattga ataagaaaat tgaocccgta atcaacgtgg tcttaccgga
 agaggaagtt gtcaagcgtta ttacctatcg tgcacttgc cgcacttgcg ggcctcgtta ccatctcatt tatgcacctc caaaagagga
 10 taataaatgt gataaatgog gcggtgagct ttatcagcgt gatgacgata aagaagagac agtccggcag cgttaccgtg tctataaaca
 gaacacagag ccattgatcg attattaccg taaaaagggga atctctatg aigtggatgg tactaaagac atcgaaggag ttgggaaaga
 aattgaggcg attctggaaa aaattaaaag c

SEQ ID NO: 31

Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn
 20 Gln Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp
 Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu
 25 Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly
 Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile Ile Leu Ser
 Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe
 30 Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val Asn Val Glu Gly Asp Pro
 Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser Met Lys

SEQ ID NO: 32

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

SEQ ID NO: 33

Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Gly Gly

SEQ ID NO: 34

Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Gly Gly Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr
 Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gln Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu
 5 Ala Thr Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys
 Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His
 Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe
 10 Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile Ile Leu Ser Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr Ser
 Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr
 Val Lys Val Ile Val Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser Met Lys

SEQ ID NO: 35

Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn
 Gln Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp
 Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu
 20 Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly
 Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile Ile Leu Ser
 Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe
 25 Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val Asn Val Glu Gly Asp Pro
 Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser Met Lys Gly Gly Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu

SEQ ID NO: 36

Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Gly Gly Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr
 Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gln Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu
 35 Ala Thr Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys
 Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His
 Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe
 40 Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile Ile Leu Ser Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr Ser
 Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser
 45 Thr Val Lys Val Ile Val Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser Met Lys Gly Gly
 Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu

SEQ ID NO: 37

atgaafcaag aacaagtcag cccgctgggc ggcacatcag cctatctggt ttctctggg ccacoggggg caggcaaagg tacctatgog
 aaacgtilac aggaaatcac cggcatcccg cacattagca cggggogacat ttctctgat atgtcaaaa aggaaaatga cgaattaggt
 5 aagaaaatta aagaaatfat ggagcggcgc gagtgggtgc cggacgaaet ggtgaatgaa gttgcaaac gtcggctgic tgaaaaggat
 tggaaacgtg gctllattit ggacggllac ccgcgtacag tagctcagge agagttctc gaogggcttc tgaagactca gaataaggag
 ltaacggctg cggictgtit cgaggtgcct gaagaggtgg tegtacagcg tctgacogcg cggogtatct gcccgaagtg tggctgtatt
 10 tacaacctga ttccacttc tccaaaagaa gatgaactgt gtgatgactg caaagtaaaa ctgggcaac gccaagatga taaagaggaa
 actgtgogcc atcgtacaaa agtatatctg gaaaaaaccc aaccggitat cgattattat gataaaaaag gcatittgaa acgcggtgat
 gggaccatcg gcalcgataa cgtgattgoc gaagtlcica aaatcattgg gtggagtgat aaatagggtg acgc
 15

SEQ ID NO: 38

Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Gly Gly Ile Ile Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys
 20 Gly Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His Ile Ser Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys
 Lys Glu Asn Asp Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp Glu Leu Val
 25 Asn Glu Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys Asp Cys Glu Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr
 Val Ala Gln Ala Glu Phe Leu Asp Gly Phe Leu Lys Thr Gln Asn Lys Glu Leu Thr Ala Ala Val Leu Phe Glu
 Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg Leu Thr Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu Ile
 30 Ser Leu Pro Pro Lys Glu Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu Val Gln Arg Glu Asp Asp Lys Glu
 Glu Thr Val Arg His Arg Tyr Lys Val Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys Gly Ile
 Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Ile Ala Glu Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys
 35

SEQ ID NO: 39

atgatggcct atctggttit tcttggcca ccgggggcag gcaaaggtag ctatgcgaaa cgtttacagg aaatcacgg catccgcac
 40 attagcaagg ggcacattt tegtgatatt gtcaaaaagg aaaatgacga attaggtaag aaaattaaag aaattatgga ggcggcgag
 ttggtccgg acgaactggt gaaigaagtt gtcaaacgic ggctgctga aaaggattgc gaacgtggct ttattitgga cggttaccg
 cgtacagtag ctaggcaga gttctcagc ggctfctga agactcagaa taaggagta acggctgog tctgttoga ggtgcctgaa
 45 gaggtggctg ltcagcgtct gaccgcggcg cgtatctgcc cgaagtgtgg tegtattac aacctgatt cacttctcc aaaagaagat
 gaactgtgtg atgactgcaa agtaaaaactg gtgcaacogc aagatgataa agaggaaact gtgcgccalc getacaaagt atatctgaa
 aaaaccaac cggitaloga ttattatgat aaaaaaggca ttgtgaaacg cgttgaigg accatcggca tegtataact gattgocgaa
 50 gttccaaaa tcaitgggtg gegtataaa ctggggcgca atcaagaaca agtcagcccg ctgtaa

55

60

65

SEQ ID NO: 40

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

SEQ ID NO: 41

atgaatcaag aacaagtcag cccgctgggc ggcacatcgc cctatctggt tttctctggt ccaaccggggg caggcaaaagg taactatgcg
 aaaogttfac aggaaatcac eggcaccccg cacattagca cgggcgacat tttctgcat atgtcaaaa aggaaaatga cgaattaggi
 25 aagaaaatia aagaaattat ggagcggggc gaggttgggc cggacgaact ggtagaalgaa gttgtcaaac gtggctgic tgaaaaggat
 tggaaacgtg gcttatttt ggaoggttac ccgcgtacag tagctcagc agagttctc gacggcttc tgaagactca gaataaggag
 ttaacggctg cggctctgtt cgaggtgctt gaagaggtgg tcttcagcg tctgacggcg cggcgtatct gccgaagtg tggctgtatt
 30 tacaacctga ttcaacttc tcaaaaagaa gatgaactgt gtgatgactg caaaqtaaaa ctggtgcaac gogaagaiga taaagaggaa
 actgtgcgcc atcgctacaa agtatatctg gaaaaaaccc aaccggttat cgattattat gataaaaaag gcattitgaa accgctgtat
 gggaccatcg gcatcgataa cgtgattgoc gaagttctca aaatcattgg gtggagtgat aaactggggc gcaatcaaga acaagtcagc
 35 ccgctgtaa

SEQ ID NO: 42

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

SEQ ID NO: 43

gattcaaaccc aaggcaacaa tcagcaaac taccagcaat acagccagaa cggtaaccaa caacaaggta acaacagata
 ccaaggttat caagcttaca atgctcaagc ccaacctggg ggtgggtact accaaaaatta ccaaggttat tctgggtacc aacaaggtgg
 65 ctatcaacag tacaatccc agccgggtta ccagcaacag tataatctc aaggaggcta tcaacagtac aatctcaag gccgttatca

gcaccaattc aatccacaag gtgcccgfgg aaattacaaa aacttcaact acaataacaa ttgcaagga tatcaagctg
 gtttocaacc acagttctaa ggtatgtctt tgaacgactt tcaaaagcaa caaaagcagg ccgctcccaa aocaaagaag actttgaagc
 5 ttgtctccag ttctgtatc aagttggcca atgctaccaa gaaggtgac acaaaacctg ccgaatctga taagaaagag gaagagaagt
 ctgctgaaac caaagaacca actaaagagc caacaaaggt cgaagaacca gtaaaaagg aggagaaaac agtccagact
 gaagaaaaga cggaggaaaa atcggaactt ccaaaggtag aagaocftaa aatctctgaa tcaacacata ataccaacaa tgccaatgtt
 10 accagtgcctg atgocitgat caaggaacag gaagaagaag tggatgacga agttgitaac gatalgittg gtggtaaaga tcaagtttct
 ttaattttca tgggicattg tgatgccgtt aaatctacta tgggtggtaa tctactatac ttgactggct ctgtggataa gagaactatt
 gagaaatag aaagagaagc caaggatgca ggcagacaag gttggtactt gtcatgggic atggalacca acaagaaga
 15 aagaaatgal gctaagacta tcaagttgg laaggocctac ttgaaaactg aaaaaaggcg ttalaccata ttgatgctc ctggtcataa
 aatgtacgtt tccgagaiga tccgtgtgoc ttctcaagct gatgttggtg ttgtgctat tccggcaga aagggtagt acgaaaaccg
 ttltgagaga ggtggicaaa ctctgtaaca ccocctattg gccaagacc aaggtgtaa laagatggtt gtcctctgaa ataagatgga
 20 tgaccaacc gtaactggt ctaaggaacg ttaogacca atgtgagta atgtcagcaa ttcttga

SEQ ID NO: 44

Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr Gln Gln Tyr Ser Gln Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn Asn
 25 Arg Tyr Gln Gly Tyr Gln Ala Tyr Asn Ala Gln Ala Gln Pro Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn Tyr Gln Gly Tyr Ser
 Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro Asp Ala Gly Tyr Gln Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr
 30 Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln His Gln Phe Asn Pro Gln Gly Gly Arg Gly Asn Tyr Lys Asn Phe
 Asn Tyr Asn Asn Asn Leu Gln Gly Tyr Gln Ala Gly Phe Gln Pro Gln Ser Gln Gly Met Ser Leu Asn Asp Phe
 Gln Lys Gln Gln Lys Gln Ala Ala Pro Lys Pro Lys Lys Thr Leu Lys Leu Val Ser Ser Ser Cys Ile Lys Leu Ala
 35 Asn Ala Thr Lys Lys Val Asp Thr Lys Pro Ala Glu Ser Asp Lys Lys Glu Glu Glu Lys Ser Ala Glu Thr Lys
 Glu Pro Thr Lys Glu Pro Thr Lys Val Glu Glu Pro Val Lys Lys Glu Glu Lys Pro Val Gln Thr Glu Glu Lys Thr
 Glu Glu Lys Ser Glu Leu Pro Lys Val Glu Asp Leu Lys Ile Ser Glu Ser Thr His Asn Thr Asn Asn Ala Asn
 40 Val Thr Ser Ala Asp Ala Leu Ile Lys Glu Gln Glu Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Val Asn Asp Met Phe Gly
 Gly Lys Asp His Val Ser Leu Ile Phe Met Gly His Val Asp Ala Gly Lys Ser Thr Met Gly Gly Asn Leu Leu
 Tyr Leu Thr Gly Ser Val Asp Lys Arg Thr Ile Glu Lys Tyr Glu Arg Glu Ala Lys Asp Ala Gly Arg Gln Gly Trp
 45 Tyr Leu Ser Trp Val Met Asp Thr Asn Lys Glu Glu Arg Asn Asp Gly Lys Thr Ile Glu Val Gly Lys Ala Tyr
 Phe Glu Thr Glu Lys Arg Arg Tyr Thr Ile Leu Asp Ala Pro Gly His Lys Met Tyr Val Ser Glu Met Ile Gly Gly
 Ala Ser Gln Ala Asp Val Gly Val Leu Val Ile Ser Ala Arg Lys Gly Glu Tyr Glu Thr Gly Phe Glu Arg Gly Gly
 50 Gln Thr Arg Glu His Ala Leu Leu Ala Lys Thr Gln Gly Val Asn Lys Met Val Val Val Val Asn Lys Met Asp
 Asp Pro Thr Val Asn Trp Ser Lys Glu Arg Tyr Asp Gln Cys Val Ser Asn Val Ser Asn Phe Leu

SEQ ID NO: 45

atggactcta accagggtaa caaccagcag aactaccagc agtactctca gaacggtaac cagcagcagg gtaacaaccg
 55 ttaccagggt taccaggctt acaacgctca ggctcagcog ggtggtggtt actaocagaa ctaccagggt tactcoggat atcaacaggg
 60 tggttaccaa caatataac cagacgtctg ttaccagcag cagtacaacc ccaggggtgg ttaccagcag facaaccgcc aaggcggata
 tcaaacaccg ttaactcgc aggggtgctg tggtaactac aaaaacttca actacaacaa caacctgcag ggttaccagg ctggttaa

SEQ ID NO: 46

Met Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr Gln Gln Tyr Ser Gln Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn
 Asn Arg Tyr Gln Gly Tyr Gln Ala Tyr Asn Ala Gln Ala Gln Pro Gly Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn Tyr Gln Gly Tyr
 Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro Asp Ala Gly Tyr Gln Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly
 Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln His Gln Phe Asn Pro Gln Gly Gly Arg Gly Asn Tyr Lys Asn
 Phe Asn Tyr Asn Asn Asn Leu Gln Gly Tyr Gln Ala Gly

SETT ID NO: 47

atggactcta accagggtaa caaccagcag aactaccagc agtactctca gaacggtaac cagcagcagg gtaacaaccg
 ttaccaggtt taccaggtt acaacgctca ggctcagcgg ggagggggtt actaccagaa ctaccaggtt tactcgggtt atcagcaagg
 tggctaccaa caatataatc cagacgctgg ctatcaacag caatataatc ctacgggtgg ttaccagcag tacaaccgcg aaggcgggta
 tcaacaccag ttcaatcgcg aggggtggcg tggtaciac aaaaactica actacaacaa caacctgcag ggttaccagg ctggaattat
 gaagatcggc attgtgacgg goattcgggg cgttggcaaa agcaccgttc tggcaaagggt gaaggagatc ctggacaacc agggcaltaa
 taacaaaati atlaattaig gtgatttat cctggcgacc gcctgaagc tggctacgc aaaagatcgt gacgaaatgc gcaaacgtgag
 cgtggaaaaa cagaagaagc tgcagattga tgcggcgaag ggcattgagg aagaggcacc cgcggggggc gaaggctacc
 tgtttatcga taccatcggc gtgatcggca ccccgagcgg ttatctgcgg ggcctgcctt ctactgtat tacggaaatc aacccgagcg
 ttattttct gctggaggca gatccgaaga ttattctgag ccgccagaag ccgatataca cccgcaaccg caacgattat agcagcggaaa
 gggitatcct ggagaccatc aactttgccc gctatcgggc aaccgcgagc ggggtctgg caggctctac cgtlaaagtg atcgtgaacg
 tggaggggta tcaagcacc gcggcgaacg aaatcattcg cagcatgaaa taagtgcagc c

SEQ ID NO: 48

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

SEQ ID NO: 49

atgaagatcg gcattgtgac cggcattcgg ggcggtggca aaagcaccgt tctggcaaag gtgaaggaga tctggacaa ccagggcatt
 aataacaaaa ttattaatta tgggtatttt atgctggcga ccgcgctgaa gctgggctac gcaaaaagatc gtgacgaaat gcgcaaacgt

agcgtggaaa aacagaagaa gctgcagatt gatgoggoga agggcattgc ggaagaggca cggcggggog gogaaggcta
 octgittalc gatacccag cgggtgaccc caccccgagc gggtatctgc cgggocctgc gcttaccgtg attaccgaaa tcaaccogag
 5 cgtattttt ctgctggagg cagatocgaa gattattctg agccggcaga agcgggatac caccogcaac cgcaacgatt atagcgacga
 aagcgittat ctggagacca tcaacttgc ggcctatgog gcaaccogca goggggtct ggcaggctct accgtaaaag tgalcgtgaa
 cgtggagggf gatccaagca tggcggcgaa cgaatcatt cgcagcatga aacagtcgag tatggactct aaccagggta
 10 acaaccagca gaactaccag cagtactctc agaacggtaa ccagcagcag ggtaacaacc gttaccaggg ttaccaggct
 tacaacgctc aggcacagcc ggggtggggt tactaccaga actaccaggg ttactccggf taccagcaag gtggctacca acaatataat
 ccagaocctg gotatcaaca gcaatataat cctcagggtg gttaccagca gtacaaccog caaggogggf atcaacacca gttcaatccg
 cagggtggc: gggtaacta caaaaactc aactacaaca acaacctgca ggggtaccag gctggtaag tggagc

SEQ ID NO: 50

Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn
 20 Gln Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp
 Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu
 25 Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly
 Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile Ile Leu Ser
 Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe
 30 Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val Asn Val Glu Gly Asp Pro
 Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser Met Lys Gln Ser Ser Met Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn
 Tyr Gln Gln Tyr Ser Gln Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn Asn Arg Tyr Gln Gly Tyr Gln Ala Tyr Asn Ala
 35 Gln Ala Gln Pro Gly Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn Tyr Gln Gly Tyr Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr
 Asn Pro Asp Ala Gly Tyr Gln Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr
 Gln His Gln Phe Asn Pro Gln Gly Gly Arg Gly Asn Tyr Lys Asn Phe Asn Tyr Asn Asn Asn Leu Gln Gly Tyr
 40 Gln Ala Gly

SEQ ID NO: 51

atggactcta accagggtaa caaccagcag aactaccagc agtactctca gaacggtaac cagcagcagg gtaacaaccg
 45 ttaccagggf taccaggctt acaacgctca ggctcagccg ggtgggggtt actaccagaa ctaccagggf tactccggf atcagcaagg
 tggctaccaa caataataic cagaocctgg ctatcaacag caataataic ctcaggggtg ttaccagcag tacaaccogc aaggcggf
 50 tcaacaccag tcaatccgc aggggtgctg tggtaactac aaaaactca actacaacaa caacctgcag ggttaccagg ctggaattat
 gatggcciat ctggttttc ttggtccacc gggggcagcc aaaggtacct atgcgaaaac ttaccaggaa atcaccggca tccgcacat
 tagcaogggc gacattttc gtgatattgt caaaaaggaa aatgacgaaf taggtaagaa aafaaagaa atfatggagc goggogagf
 55 ggtgccggac gaactgggga atgaagtgt caaacctcgg ctgctcgaaa aggatggca acgtggctt attttggac gtlaccogc
 tacagtagct caggcagagf ttctgacgg ctctcgaag actcagaata aggagtaac ggctcggctc ctgtcagag tgcctgaaga
 ggtggctggt cagcgtctga cggcggggog tatctcccg aagtgtggc gtaattaca cotgattca ctctocaa aagaagatga
 60 actgtgtgat gactgcaag taaaactgtt gcaaccogaa gatgataaag aggaaactgt ggcctatgc tacaagat atctggaaaa
 aaccaaccg gttatcgatt atlatgataa aaaaggcatt ttgaaacogc ttgatgggac catoggcac gataacgtga ttgccgaagt
 tctcaaaaic atgggtgga gtgataaata g

SEQ ID NO: 52

Met Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr Gln Gln Tyr Ser Gln Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn
 Asn Arg Tyr Gln Gly Tyr Gln Ala Tyr Asn Ala Gln Ala Gln Pro Gly Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn Tyr Gln Gly Tyr
 5 Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro Asp Ala Gly Tyr Gln Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly
 Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln His Gln Phe Asn Pro Gln Gly Gly Arg Gly Asn Tyr Lys Asn
 Phe Asn Tyr Asn Asn Asn Leu Gln Gly Tyr Gln Ala Gly Ile Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro
 10 Gly Ala Gly Lys Gly Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His Ile Ser Thr Gly Asp Ile Phe Arg
 Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp
 Glu Leu Val Asn Glu Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys Asp Cys Glu Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr
 15 Pro Arg Thr Val Ala Gln Ala Glu Phe Leu Asp Gly Phe Leu Lys Thr Gln Asn Lys Glu Leu Thr Ala Ala Val
 Leu Phe Glu Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg Leu Thr Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr
 Asn Leu Ile Ser Leu Pro Pro Lys Glu Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu Val Gln Arg Glu Asp
 20 Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg Tyr Lys Val Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys
 Lys Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Ile Ala Glu Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser
 Asp Lys

25

SEQ ID NO: 53

Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Thr Ala Thr Cys Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Thr Gly Gly
 30 Thr Cys Cys Ala Cys Cys Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Gly Gly Cys Ala Ala Ala Gly Gly Thr Ala Cys Cys
 Thr Ala Thr Gly Cys Gly Ala Ala Ala Cys Gly Thr Thr Thr Ala Cys Ala Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys
 Cys Gly Gly Cys Ala Thr Cys Cys Cys Gly Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ala Gly Cys Ala Cys Gly Gly Gly Cys
 35 Gly Ala Cys Ala Thr Thr Thr Thr Thr Cys Gly Thr Gly Ala Thr Ala Thr Thr Gly Thr Cys Ala Ala Ala Ala
 Gly Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Cys Gly Ala Ala Thr Thr Ala Gly Gly Thr Ala Ala Gly Ala Ala Ala
 Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr Gly Gly Ala Gly Cys Gly Cys Gly Gly Cys Gly Ala Gly
 40 Thr Thr Gly Gly Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Cys Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Thr Gly Ala
 Ala Gly Thr Thr Gly Thr Cys Ala Ala Ala Cys Gly Thr Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr Cys Thr Gly Ala Ala Ala
 Ala Gly Gly Ala Thr Thr Gly Cys Gly Ala Ala Cys Gly Thr Gly Gly Cys Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Gly
 45 Gly Ala Cys Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Cys Gly Cys Gly Thr Ala Cys Ala Gly Thr Ala Gly Cys Thr Cys
 Ala Gly Gly Cys Ala Gly Ala Gly Thr Thr Thr Cys Thr Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Cys Cys Thr
 Gly Ala Ala Gly Ala Cys Thr Cys Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Ala Ala Cys Gly Gly
 50 Cys Thr Gly Cys Gly Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Gly Ala Gly Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly Ala
 Ala Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Cys Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Thr Cys Thr Gly Ala Cys Cys
 Gly Cys Gly Cys Gly Gly Cys Gly Thr Ala Thr Cys Thr Gly Cys Cys Cys Gly Ala Ala Gly Thr Gly Thr Gly
 55 Gly Thr Cys Gly Thr Ala Thr Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr
 Cys Cys Thr Cys Cys Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Thr Gly Thr Gly Ala
 Thr Gly Ala Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Ala Ala Cys
 60 Gly Cys Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Gly

65

5 Cys Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Thr Ala Cys Ala Ala Ala Gly Thr Ala Thr Ala Thr Cys Thr Gly Gly
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Cys Cys Cys Ala Ala Cys Cys Gly Gly Thr Thr Ala Thr Cys Gly Ala Thr Thr Ala Thr
 10 Thr Ala Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys Ala Thr Thr Thr Thr Gly Ala Ala Ala Cys Gly
 Cys Gly Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly Cys Ala Thr Cys Gly Ala Thr Ala
 Ala Cys Gly Thr Gly Ala Thr Thr Gly Cys Cys Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Thr Cys Ala Ala Ala Thr Cys
 15 Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Cys Gly Ala Gly
 Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Cys Thr Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Ala Ala Cys Ala Ala Cys Cys
 Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala
 20 Gly Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Thr Ala
 Cys Ala Ala Cys Gly Cys Thr Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Ala Gly Cys Cys Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr
 Gly Gly Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Thr Ala
 25 Cys Thr Cys Cys Gly Gly Thr Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Ala Cys
 Cys Ala Ala Cys Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Gly Cys Thr Gly Gly Cys Thr Ala
 Thr Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Gly Thr Gly
 30 Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Ala Ala Gly Gly
 Cys Gly Gly Thr Thr Ala Thr Cys Ala Ala Cys Ala Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Thr Cys Cys Gly
 Cys Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr Cys Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Ala Ala
 35 Cys Thr Thr Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly
 Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Thr Cys Gly Ala Cys Gly
 Cys

SEQ ID NO: 54

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

SEQ ID NO: 55

ggtaacaacc agcagaacta c

65

SEQ ID NO: 56

Gly Asn Asn Gin Gln Asn Tyr

5 SEQ ID NO: 57

atgatgatgg cgtctaagga cgciaatca agcgtggatg gogctagtgg cgcctggcag ttggtaccgg aggtlaalgc ttctgacct
 10 ctgcaatgg atcctgtage aggtctctog acagcagfeg cgaactgtgg acaagfcaat cctatfgato cotggataat taataatft
 gtgcaagccc cccaaggtga attactatf lcccaaaata ataccocgg tgalgtttg ttgattga gttgggloc caalcitaat cctftctgc
 locatctat acaaatgat aatggtggg ttgtaacaf gagagfcagg attatgctag ctgtaatgc cttactgog ggggaagataa
 15 tagttctg calaccocct ggtttggtf cacataatct tactatagca caagcaactc tottccaca tctgattgct gatgttagga
 ctctagacc ccttgaggf cctttggaag atgttaggaa tctctctf cafaaafat agagaaatca acaaaccatg cgcctgtgt
 gcatgctga caccocctc cgcactggg gggiaactgg tgalctttf gtagtgcag ggcagatf gactgccc agictgatt faatfctf
 20 gttttagtc cctctacgg tggagcagaa aaccaggccc tccactcc caaatctgcc atgagttct ctgtotaact cactgccc
 tctccaatc aglagtatgg gcattcccc agacaatgc cagagctgc agtccaaaa tggctgggtf actctggatg gcccctggt
 tggcaccacc ccagttcat tctcacatf tccaagafa agaggacct ccaatggcac tgaatcaac ctactgaaf tggatggcac
 acccttcc cctttgagg gcctgccc ccttggtf cagaactc ggtgtgiga ttggcatac aatatgacac agtttggca
 25 ttctagocag acccagfat atgtagacac caccctgac actttgtcc ccatctfgg tcaattcag gcaaatggca ttggcagtg
 taatfatgt ggtgtctta gctggattc cccocata caaccogctg gctccaagt tgaacttgg aagatccca atlatgggic
 aagtlatag gaggcaacac atctagccc ttctgtatc cccctggtf tggagaggt atgtctf ttcatgcaa aaatgccc
 30 tctgtgtct tataattgc cctgtctat accacaagag tacattcac atctgtctag tgaacaagcc cctactgtag gtgagctgc
 cctgtccac fatgtgacc ctgalacgg tggaaatct ggggaatca aagcataccc tgaatgttc ctactgtg tcccaatgg
 gctagctog ggicacaaac agctgcogaf caatgggic ttgtcttg ttcaatgggt giccagatt latcaatfa agcctgtggg
 35 aactgocagc tggcaagag gtaggttgg totgocoga faa

SEQ ID NO: 58

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

60

65

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

SEQ ID NO: 59

atgatgatgg ctctaaaga cgtacctct tctgtgacg gtgctctgg tctgggtcag ctggtccgg aagtaacgc tctgaccog
 25 ctggctatgg acccgggtgc tggttctct acccgtgtg ctaccogtg tcaggtaac ccatogacc cgtggatcat caacaactc
 gttcaggctc cgcaggggtga atcaccatc tctccgaaca acaccocggg tgaactctg ttgacctgt ctctgggtcc gcaactgaac
 ccgttctctc tgcacctgtc tcatatgac aaccggttgg ttgtaacat gctgttctg atcatctgg ctgtaacgc ttccacct
 30 ggtaaaaatca tctttctg catcccgccg ggtttcgggt ctcaaacct gaacctcct caggctaccc tgttcccgca cgttatcct
 gactgtctga cctggacc ccatogaagt cctctggaag accgtctgaa cgtctcttc cacaacaac accgtaacca gcagacctg
 cgtctgggtt gcatctgta caccocctc cgtaccogtg gtggtaccg tgaacttct gttgtctg gtctgttat gacctcccg
 35 tctccgact tcaactct gttctgggt ccgccagccg ttgaacagaa aaccocctcc ttccacctc cgaacctcc gctgtctct
 ctgttaact ctgtctcc gctccgact tctctatgg gttctctcc ggacaacct cagtctgtc agttccagaa cgtctgttc
 acctggacc gtctctgtt tggtaacc cccgttctc tctctacgt tctaaaaatc cgtgtaact ctaccgtac cgttatcaac
 40 ctgaccgaac tggacgttac cccgttccac ccttogaag gtcggctcc gatcgggtc ccggaacctg gtggttccga ctggcacaic
 aacatgacc agttcgtca ctctctcag acccagtac accgttac caccocggac acctcttc cgcacctggg tctatccag
 gctaaaggta tgggtctgg taactaagt ggtgtctgt ctggatct tccocctct caccocctg gttctcagg tgaactgtg
 45 aaaatccga actaccgttc tctatcac gaagctacc acctgctcc gttgtttac ccgcocgggt tgggtgaagt tctgttctc
 tctatgta aaaatccgg tccgggtct tacaacctc cgtgctct gcccaggaa tcatctct acctggctc tgaacaggct
 ccgacctg gtgaagctc tctctctc tacgtgacc ccgacaccg tctgaacct ggtgaattca aagctaac ggaocgttc
 50 ctgacctg tccgaaccg tctctctt ggtccgac agctccgat caaccgtgt tctgttctg tctctgggt tctctgttc taccagctga
 aaccgggtg taccctct tctctctg gctctggg tctctctgt tag

SEQ ID NO: 60

atgatgatgg ctctaaaga cgtacctct tctgtgacg gtgctctgg tctgggtcag ctggtccgg aagtaacgc tctgaccog
 55 ctggctatgg acccgggtgc tggttctct acccgtgtg ctaccogtg tcaggtaac ccatogacc cgtggatcat caacaactc
 gttcaggctc cgcaggggtga atcaccatc tctccgaaca acaccocggg tgaactctg ttgacctgt ctctgggtcc gcaactgaac
 60 ccgttctctc tgcacctgtc tcatatgac aaccggttgg ttgtaacat gctgttctg atcatctgg ctgtaacgc ttccacct
 ggtaaaaatca tctttctg catcccgccg ggtttcgggt ctcaaacct gaacctcct caggctaccc tgttcccgca cgttatcct
 65

gacgttcgta cccctggacc gatogaagtt ccgctggaag acgttcgtaa cgttcgttc cacaacaacg accgtaacca
 gcagaccatg cgtctggltt gcctgctgta caccocgctg cgtaccggcg gggglaccgg tgactcttc gttgtctg gtcgtgtat
 5 gacctgccg tctccggact tcaacttctt gttcctggtt ccgcgcaccg ttgaacagaa aaccgcctcg tcaacctgc egaacctgcc
 gctgtctct ctgtctaac ctgctctcc gctgcgcac icctctatgg gtaictctcc ggacaacgtt cagtctgttc agttccagaa cggctgttc
 acctggacg gtcgtctggt tggtaaccac ccggttctc tctctacgt tctctctct cgtggtaoct ctaacggtae cgttatcaac
 10 ctgaccgaac tggacggtae ccggtccac ccgttcgaag gtcggctctc gatccggttc ccggacctgg gtcgttcgca ctggacatac
 aacatgacc agttccgta ctctctcag acccagtae acgttgacac caccocggac acctctgtc cgcacctggg ttctatccag
 gctaacggta tgggtctgg taactaogtt ggtgtctgt ctggatctc tccgcctct caccgcctg gttctcaggt tgacctggtg
 15 aaaatccga actacggttc tctctacc gaagctacc acctggctc gtcgtttac ccgcggggt tgggtgaagt tctggtttc
 ttctgtctc aaatccggg tccgggtct tacaacctgc cgtgcctct gcgcaggaa tacatctc acctggctc tgaacaggt
 ccgaccttg tgaagctgc tctctcacc tccgtgacc ccgacaccg tctgaacctg ggtgaaltca aagctacc ccgaccttc
 20 ctgacctgag ttccgaaccg tctctctt ggtccgcag agctgcgat caacgggtt ttctttctg ttctgggt ttctgttc taccagctga
 aaccgggtg taccctct tctctctg gtcgtctgg tctgcctgt atgatggct atctggttt tctgttca ccggggcag
 gcaaaggtae ctatccgaaa cgtttaccg aaatcaccg caccocgac atagcaccg gcgacattt tctgatatt gtaaaaaagg
 25 aaaatgaca ataggttaag aaaataaag aaatctga gcgcggcag ttgttccg accaactggt gaatgaagtt gtaaaact
 ggtctctga aaaggattc gaacgtggt itatttga ccgtaccg cgtacagtag ctccaggca gttctcag ccctctga
 agactcagaa taaggacta accgtcgc tctgttga ggtccctgaa gaggtgctg ttccagctc gaccgcggg cgtatctcc
 30 cgaagtgtg tctattac acctgatt cactctcc aaaagaagat gaactgtg atgactgaa agtaaaactg gtcacccg
 aagatgata agaggaaact gtcgccatc gctacaaagt atactggaa aaaocccac ccgttatca ttattatgata aaaaaaggca
 ttgaaaac cgttatgg accatggca tctataact gattccgaa gttctcaaaa tctttgggt gagtgataa

SEQ ID NO: 61

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

ES 2 588 181 T3

Ala Pro Ser Val Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu Val Leu Val Phe Phe Met Ser Lys Met Pro Gly Pro Gly
Ala Tyr Asn Leu Pro Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr Ile Ser His Leu Ala Ser Glu Gln Ala Pro Thr Val Gly Glu
5 Ala Ala Leu Leu His Tyr Val Asp Pro Asp Thr Gly Arg Asn Leu Gly Glu Phe Lys Ala Tyr Pro Asp Gly Phe
Leu Thr Cys Val Pro Asn Gly Ala Ser Ser Gly Pro Gln Gln Leu Pro Ile Asn Gly Val Phe Val Phe Val Ser
Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln Leu Lys Pro Val Gly Thr Ala Ser Ser Ala Arg Gly Arg Leu Gly Leu Arg Arg
10 Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gln Glu Ile Thr
Gly Ile Pro His Ile Ser Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp Glu Leu Gly Lys Lys Ile
Lys Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp Glu Leu Val Asn Glu Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu
15 Lys Asp Cys Glu Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala Gln Ala Glu Phe Leu Asp Gly Phe
Leu Lys Thr Gln Asn Lys Glu Leu Thr Ala Ala Val Leu Phe Glu Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg Leu
Thr Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu Ile Ser Leu Pro Pro Lys Glu Asp Glu Leu Cys
20 Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu Val Gln Arg Glu Asp Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg Tyr Lys Val Tyr
Leu Glu Lys Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile
Asp Asn Val Ile Ala Glu Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys

SEQ ID NO: 62

Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn
30 Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val Arg Gln
Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu
Leu Pro Val Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu
35 Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
Tyr

SEQ ID NO: 63

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

SEQ ID NO: 64

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln
55 Ile Phe Glu Glu Lys Val Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn Gly Ala Lys
Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp Val Val Asp Ser Gly Leu Pro Lys Val Arg Tyr Thr
Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys
60 Ser Leu Val Ala Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg Tyr Gly Ser Lys Thr Ile
Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys
Val Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val

Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp Val Val Asp Ser Gly Leu Pro Lys Val Arg Tyr Thr Gln Val Trp Ser
 His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala
 Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg

5

SEQ ID NO: 65

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

20

SEQ ID NO: 66

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

35

SEQ ID NO: 67

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

60

65

ES 2 588 181 T3

SEQ ID NO: 68

Met Gln Phe Ser Thr Leu Thr Thr Val Phe Ala Leu Val Ala Ala Ala Val Ala Ala Pro His Gly Ser Ser Gly
5 Gly Asn Asn Pro Val Cys Ser Ala Gln Asn Asn Gln Val Cys Cys Asn Gly Leu Leu Ser Cys Ala Val Gln Val
Leu Gly Ser Asn Cys Asn Gly Asn Ala Tyr Cys Cys Asn Thr Glu Ala Pro Thr Gly Thr Leu Ile Asn Val Ala
Leu Leu Asn Cys Val Lys Leu Leu

SEQ ID NO: 69

Met Lys Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Leu Leu Gly Ala Val Val Ser Ala Leu Pro Ala Asn Glu Lys Arg Gln
15 Ala Tyr Ile Pro Cys Ser Gly Leu Tyr Gly Thr Ser Gln Cys Cys Ala Thr Asp Val Leu Gly Val Ala Asp Leu
Asp Cys Gly Asn Pro Pro Ser Ser Pro Thr Asp Ala Asp Asn Phe Ser Ala Val Cys Ala Glu Ile Gly Gln Arg
Ala Arg Cys Cys Val Leu Pro Ile Leu Asp Gln Gly Ile Leu Cys Asn Thr Pro Thr Gly Val Gln Asp

SEQ ID NO: 70

Val Pro Pro Pro Cys Asp Leu Ser Ile Lys Ser Lys Leu Lys Gln Val Gly Ala Thr Ala Gly Asn Ala Ala Val Thr
25 Thr Thr Gly Thr Thr Ser Gly Ser Gly Val Val Lys Cys Val Val Arg Thr Pro Thr Ser Val Glu Lys Lys Ala Ala
Val Gly Asn Thr Gly Leu Ser Ala Val Ser Ala Ser Ala Ala Asn Gly Phe Phe Lys Asn Leu Gly Lys Ala Thr
Thr Glu Val Lys Thr Thr Lys Asp Gly Thr Lys Val Lys Thr Lys Thr Ala Gly Lys Gly Lys Thr Gly Gly Thr Ala
30 Thr Thr Ile Gln Ile Ala Asp Ala Asn Gly Gly Val Ser Glu Lys Ser Leu Lys Leu Asp Leu Leu Thr Asp Gly Leu
Lys Phe Val Lys Val Thr Glu Lys Lys Gln Gly Thr Ala Thr Ser Ser Ser Gly His Lys Ala Ser Gly Val Gly His
Ser Val Phe Lys Val Leu Asn Glu Ala Glu Thr Glu Leu Glu Leu Lys Gly Leu

SEQ ID NO: 71

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

SEQ ID NO: 72

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

5 Lys Ala Ala Met Lys Leu Leu Pro Gly Val Pro Asn Val Ala Val Phe Asp Thr Ala Phe His Gln Thr Ile
 Pro Gln Lys Ala Tyr Leu Tyr Ala Ile Pro Tyr Glu Tyr Tyr Glu Lys Tyr Lys Ile Arg Arg Tyr Gly Phe His Gly
 10 Thr Ser His Arg Tyr Val Ser Lys Arg Ala Ala Glu Ile Leu Gly Lys Lys Leu Glu Glu Leu Lys Ile Ile Thr Cys
 His Ile Gly Asn Gly Ala Ser Val Ala Ala Val Lys Tyr Gly Lys Cys Val Asp Thr Ser Met Gly Phe Thr Pro Leu
 Glu Gly Leu Val Met Gly Thr Arg Ser Gly Asp Leu Asp Pro Ala Ile Pro Phe Phe Ile Met Glu Lys Glu Gly Ile
 15 Ser Pro Gln Glu Met Tyr Asp Ile Leu Asn Lys Lys Ser Gly Val Tyr Gly Leu Ser Lys Gly Phe Ser Ser Asp
 Met Arg Asp Ile Glu Glu Ala Ala Leu Lys Gly Asp Glu Trp Cys Lys Leu Val Leu Glu Ile Tyr Asp Tyr Arg Ile
 Ala Lys Tyr Ile Gly Ala Tyr Ala Ala Ala Met Asn Gly Val Asp Ala Ile Val Phe Thr Ala Gly Val Gly Glu Asn
 20 Ser Pro Ile Thr Arg Glu Asp Val Cys Ser Tyr Leu Glu Phe Leu Gly Val Lys Leu Asp Lys Gln Lys Asn Glu
 Glu Thr Ile Arg Gly Lys Glu Gly Ile Ile Ser Thr Pro Asp Ser Arg Val Lys Val Leu Val Val Pro Thr Asn Glu
 Glu Leu Met Ile Ala Arg Asp Thr Lys Glu Ile Val Glu Lys Ile Gly Arg Val Pro Pro Pro Cys Asp Leu Ser Ile
 25 Lys Ser Lys Leu Lys Gln Val Gly Ala Thr Ala Gly Asn Ala Ala Val Thr Thr Thr Gly Thr Thr Ser Gly Ser Gly
 Val Val Lys Cys Val Val Arg Thr Pro Thr Ser Val Glu Lys Lys Ala Ala Val Gly Asn Thr Gly Leu Ser Ala Val
 Ser Ala Ser Ala Ala Asn Gly Phe Phe Lys Asn Leu Gly Lys Ala Thr Thr Glu Val Lys Thr Thr Lys Asp Gly
 30 Thr Lys Val Lys Thr Lys Thr Ala Gly Lys Gly Lys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Thr Ile Gln Ile Ala Asp Ala Asn
 Gly Gly Val Ser Glu Lys Ser Leu Lys Leu Asp Leu Leu Thr Asp Gly Leu Lys Phe Val Lys Val Thr Glu Lys
 Lys Gln Gly Thr Ala Thr Ser Ser Ser Gly His Lys Ala Ser Gly Val Gly His Ser Val Phe Lys Val Leu Asn Glu
 Ala Glu Thr Glu Leu Glu Leu Lys Gly Leu

SEQ ID NO: 73

35 Val Pro Pro Pro Cys Asp Leu Ser Ile Lys Ser Lys Leu Lys Gln Val Gly Ala Thr Ala Gly Asn Ala Ala Val Thr
 Thr Thr Gly Thr Thr Ser Gly Ser Gly Val Val Lys Cys Val Val Arg Thr Pro Thr Ser Val Glu Lys Lys Ala Ala
 Val Gly Asn Thr Gly Leu Ser Ala Val Ser Ala Ser Ala Ala Asn Gly Phe Phe Lys Asn Leu Gly Lys Ala Thr
 40 Thr Glu Val Lys Thr Thr Lys Asp Gly Thr Lys Val Lys Thr Lys Thr Ala Gly Lys Gly Lys Thr Gly Gly Thr Ala
 Thr Thr Ile Gln Ile Ala Asp Ala Asn Gly Gly Val Ser Glu Lys Ser Leu Lys Leu Asp Leu Leu Thr Asp Gly Leu
 Lys Phe Val Lys Val Thr Glu Lys Lys Gln Gly Thr Ala Thr Ser Ser Ser Gly His Lys Ala Ser Gly Val Gly His
 45 Ser Val Phe Lys Val Leu Glu Ala Glu Thr Glu Leu Glu Leu Lys Gly Leu Met Arg Val Leu Val Ile Asn Ser
 Gly Ser Ser Ser Ile Lys Tyr Gln Leu Ile Glu Met Glu Gly Glu Lys Val Leu Cys Lys Gly Ile Ala Glu Arg Ile
 Gly Ile Glu Gly Ser Arg Leu Val His Arg Val Gly Asp Glu Lys His Val Ile Glu Arg Glu Leu Pro Asp His Glu
 50 Glu Ala Leu Lys Leu Ile Leu Asn Thr Leu Val Asp Glu Lys Leu Gly Val Ile Lys Asp Leu Lys Glu Ile Asp Ala
 Val Gly His Arg Val Val His Gly Gly Glu Arg Phe Lys Glu Ser Val Leu Val Asp Glu Glu Val Leu Lys Ala Ile
 Glu Glu Val Ser Pro Leu Ala Pro Leu His Asn Pro Ala Asn Leu Met Gly Ile Lys Ala Ala Met Lys Leu Leu
 55 Pro Gly Val Pro Asn Val Ala Val Phe Asp Thr Ala Phe His Gln Thr Ile Pro Gln Lys Ala Tyr Leu Tyr Ala Ile
 Pro Tyr Glu Tyr Tyr Glu Lys Tyr Lys Ile Arg Arg Tyr Gly Phe His Gly Thr Ser His Arg Tyr Val Ser Lys Arg
 Ala Ala Glu Ile Leu Gly Lys Lys Leu Glu Glu Leu Lys Ile Ile Thr Cys His Ile Gly Asn Gly Ala Ser Val Ala Ala
 60 Val Lys Tyr Gly Lys Cys Val Asp Thr Ser Met Gly Phe Thr Pro Leu Glu Gly Leu Val Met Gly Thr Arg Ser
 Gly Asp Leu Asp Pro Ala Ile Pro Phe Phe Ile Met Glu Lys Glu Gly Ile Ser Pro Gln Glu Met Tyr Asp Ile Leu
 Asn Lys Lys Ser Gly Val Tyr Gly Leu Ser Lys Gly Phe Ser Ser Asp Met Arg Asp Ile Glu Glu Ala Ala Leu

65

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

SEQ ID NO: 74

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

SEQ ID NO: 75

Ser Lys Leu Pro Cys Asn Asp Glu His Pro Cys Tyr Arg Lys Glu Gly Gly Val Val Ser Cys Asp Cys Lys

SEQ ID NO: 76

Ser Lys Leu Pro Ser Asn Asp Glu His Pro Ser Tyr Arg Lys Glu Gly Gly Val Val Ser Ser Asp Ser Lys

SEQ ID NO: 77

Lys Thr Ile Thr Cys Asn Glu Asp His Pro Cys Tyr His Ser Tyr Glu Glu Asp Gly Val Thr Lys Ser Asp Cys Asp Cys Glu

SEQ ID NO: 78

Met Arg Ile Ile Leu Leu Gly Ala Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Gln Ala Gln Phe Ile Met Glu Lys Tyr Gly Ile
 35 Pro Gln Ile Ser Thr Gly Asp Met Leu Arg Ala Ala Val Lys Ser Gly Ser Glu Leu Gly Lys Gln Ala Lys Asp Ile
 Met Asp Ala Gly Lys Leu Val Thr Asp Glu Leu Val Ile Ala Leu Val Lys Glu Arg Ile Ala Gln Glu Asp Cys Arg
 40 Asn Gly Phe Leu Leu Asp Gly Phe Pro Arg Thr Ile Pro Gln Ala Asp Ala Met Lys Glu Ala Gly Ile Asn Val
 Asp Tyr Val Leu Glu Phe Asp Val Pro Asp Glu Leu Ile Val Asp Arg Ile Val Gly Arg Arg Val His Ala Pro Ser
 Gly Arg Val Tyr His Val Lys Phe Asn Pro Pro Lys Val Glu Gly Lys Asp Asp Val Thr Gly Glu Glu Leu Thr
 45 Thr Arg Lys Asp Asp Gln Glu Glu Thr Val Arg Lys Arg Leu Val Glu Tyr His Gln Met Thr Ala Pro Leu Ile Gly
 Tyr Tyr Ser Lys Glu Ala Glu Ala Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Lys Val Asp Gly Thr Lys Pro Val Ala Glu Val Arg
 Ala Asp Leu Glu Lys Ile Leu Gly

SEQ ID NO: 79

5 Met Lys Lys Thr Lys Ile Val Cys Thr Ile Gly Pro Lys Thr Glu Ser Glu Glu Met Leu Ala Lys Met Leu Asp
 Ala Gly Met Asn Val Met Arg Leu Asn Phe Ser His Gly Asp Tyr Ala Glu His Gly Gln Arg Ile Gln Asn Leu
 Arg Asn Val Met Ser Lys Thr Gly Lys Thr Ala Ala Ile Leu Leu Asp Thr Lys Gly Pro Glu Ile Arg Thr Met Lys
 10 Leu Glu Gly Gly Asn Asp Val Ser Leu Lys Ala Gly Gln Thr Phe Thr Phe Thr Thr Asp Lys Ser Val Ile Gly
 Asn Ser Glu Met Val Ala Val Thr Tyr Glu Gly Phe Thr Thr Asp Leu Ser Val Gly Asn Thr Val Leu Val Asp
 Asp Gly Leu Ile Gly Met Glu Val Thr Ala Ile Glu Gly Asn Lys Val Ile Cys Lys Val Leu Asn Asn Gly Asp Leu
 Gly Glu Asn Lys Gly Val Asn Leu Pro Gly Val Ser Ile Ala Leu Pro Ala Leu Ala Glu Lys Asp Lys Gln Asp
 15 Leu Ile Phe Gly Cys Glu Gln Gly Val Asp Phe Val Ala Ala Ser Phe Ile Arg Lys Arg Ser Asp Val Ile Glu Ile
 Arg Glu His Leu Lys Ala His Gly Gly Glu Asn Ile His Ile Ile Ser Lys Ile Glu Asn Gln Glu Gly Leu Asn Asn
 Phe Asp Glu Ile Leu Glu Ala Ser Asp Gly Ile Met Val Ala Arg Gly Asp Leu Gly Val Glu Ile Pro Val Glu Glu
 20 Val Ile Phe Ala Gln Lys Met Met Ile Glu Lys Cys Ile Arg Ala Arg Lys Val Val Ile Thr Ala Thr Gln Met Leu
 Asp Ser Met Ile Lys Asn Pro Arg Pro Thr Arg Ala Glu Ala Gly Asp Val Ala Asn Ala Ile Leu Asp Gly Thr Asp
 Ala Val Met Leu Ser Gly Glu Ser Ala Lys Gly Lys Tyr Pro Leu Glu Ala Val Ser Ile Met Ala Thr Ile Cys Glu
 25 Arg Thr Asp Arg Val Met Asn Ser Arg Leu Glu Phe Asn Asn Asp Asn Arg Lys Leu Arg Ile Thr Glu Ala Val
 Cys Arg Gly Ala Val Glu Thr Ala Glu Lys Leu Asp Ala Pro Leu Ile Val Val Ala Thr Gln Gly Gly Lys Ser Ala
 Arg Ala Val Arg Lys Tyr Phe Pro Asp Ala Thr Ile Leu Ala Leu Thr Thr Asn Glu Lys Thr Ala His Gln Leu Val
 30 Leu Ser Lys Gly Val Val Pro Gln Leu Val Lys Glu Ile Thr Ser Thr Asp Asp Phe Tyr Arg Leu Gly Lys Glu
 Leu Ala Leu Gln Ser Gly Leu Ala His Lys Gly Asp Val Val Val Met Val Ser Gly Ala Leu Val Pro Ser Gly Thr
 Thr Asn Thr Ala Ser Val His Val Leu

35 **SEQ ID NO: 80**

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

65

SEQ ID NO: 81

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

SEQ ID NO: 82

Met Lys Asn Lys Leu Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Gly Thr Thr Ile Thr Gln Lys Ala Met Glu Lys
 20 Leu Ser Glu Glu Gly Ile Asn Tyr Lys Met Val Asn Phe Gly Thr Val Met Phe Glu Val Ala Gln Glu Glu Asn
 Leu Val Glu Asp Arg Asp Gln Met Arg Lys Leu Asp Pro Asp Thr Gln Lys Arg Ile Gln Lys Leu Ala Gly Arg
 25 Lys Ile Ala Glu Met Val Lys Glu Ser Pro Val Val Val Asp Thr His Ser Thr Ile Lys Thr Pro Lys Gly Tyr Leu
 Pro Gly Leu Pro Val Trp Val Leu Asn Glu Leu Asn Pro Asp Ile Ile Ile Val Val Glu Thr Ser Gly Asp Glu Ile
 Leu Ile Arg Arg Leu Asn Asp Glu Thr Arg Asn Arg Asp Leu Glu Thr Thr Ala Gly Ile Glu Glu His Gln Ile Met
 30 Asn Arg Ala Ala Ala Met Thr Tyr Gly Val Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Ile Gln Asn Lys Asn Asn Leu Leu
 Asp Tyr Ala Val Glu Glu Leu Ile Ser Val Leu Arg

SEQ ID NO: 83

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

SEQ ID NO: 84

Met Asn Leu Val Leu Met Gly Leu Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Gln Gly Glu Arg Ile Val Glu Asp Tyr Gly Ile
 55 Pro His Ile Ser Thr Gly Asp Met Phe Arg Ala Ala Met Lys Glu Glu Thr Pro Leu Gly Leu Glu Ala Lys Ser Tyr
 Ile Asp Lys Gly Glu Leu Val Pro Asp Glu Val Thr Ile Gly Ile Val Lys Glu Arg Leu Gly Lys Asp Asp Cys Glu
 60 Arg Gly Phe Leu Leu Asp Gly Phe Pro Arg Thr Val Ala Gln Ala Glu Ala Leu Glu Glu Ile Leu Glu Glu Tyr
 Gly Lys Pro Ile Asp Tyr Val Ile Asn Ile Glu Val Asp Lys Asp Val Leu Met Glu Arg Leu Thr Gly Arg Arg Ile

65

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

10 **[0154]** La presente invención se describe a continuación en realizaciones específicas en los siguientes ejemplos y con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La **Figura 1** muestra la actividad de enzimas adenilato quinasa (AK) después del tratamiento a 70°C (A), 80°C (B) y 90°C (C);

15 la **figura 2** muestra la estabilidad de una serie de enzimas AK expresadas de forma recombinante en *E. coli*. Los genes que codifican las enzimas AK fueron clonados y expresados tal como se describe en el Ejemplo 3. Se expresaron todos los genes a partir del vector pET28a, a excepción del clon I de *S.acidocaldarius* que se expresó a partir de pET3a tal como se describió anteriormente. Los niveles de expresión fueron similares para cada clon, pero una parte de la enzima de *Pyrococcus furiosus* (P. fu) estaba en la fracción insoluble y esto probablemente ha reducido la cantidad de esta enzima que se está ensayando. La estabilidad de las enzimas recombinantes se midió tras la incubación a 80°C durante 30 minutos en un lisado de *E. coli* en bruto en diluciones en serie de 10 veces de 1 mg/ml de proteína celular total (de manera que la columna 12 es equivalente a 1 fg/ml de proteína total). Las enzimas de *Thermotoga maritima* y *Archaeoglobus fulgidus* mostraron significativamente una mayor estabilidad que las otras enzimas ensayadas, aunque las enzimas restantes (*Sulfolobus solfataricus* (S. so P2) y *Aeropyrum pernix* P. fu) mostraron una actividad similar a la enzima de *S.acidocaldarius* utilizada como base de los ensayos anteriores (datos marcados como S. ac I);

25 las **figuras 3A y 3B** muestran los niveles relativos de actividad de la adenilato quinasa no reportera (Figura 3A) y ATP (Figura 3B) en una variedad de muestras de interés para el diagnóstico clínico. Las muestras de donantes sanos se evaluaron para los niveles de ATP generados por la adenilato quinasa no reportera (después de la adición de ADP como sustrato; Figura 3A) o presentes de forma natural en la muestra (Figura 3B). Esta información se puede utilizar para ayudar en la decisión de qué etapas de reducción de ruido de ruido de fondo deben incluirse en los ensayos para muestras particulares, aunque esta información no excluye su uso en cualquier tipo de ensayo, en particular donde las infecciones pueden influir en los niveles de ruido de ruido de fondo de ATP o quinasa reportera. Las muestras son sangre completa y suero de oveja, homogeneizado de cerebro de ratón (MBH; representativo de muestras de biopsia de tejido), leche de vaca, y dos muestras de saliva (1 y 2) recogidas utilizando el procedimiento del ácido cítrico ("ca") o un dispositivo con hisopo ("r"). Las unidades relativas de luz generadas a partir del ensayo en bruto se convierten en unidades de ATP en base a una curva estándar;

30 las **figuras 4A y 4B** muestran la inhibición diferencial de quinasa reportera y quinasa no reportera de tejido (endógena) utilizando Ap5a (sal de diadenosin pentafofosfato pentasódico) (Figura 4A) y el efecto de Ap5a en la luciferasa (Figura 4B). Las adenilato quinasa de *S. acidocaldarius* o *T. maritima* se purificaron como se ha descrito anteriormente. La mioquinasa de conejo (adenilato quinasa de músculo) se obtuvo de Sigma. Se incubaron 100 ng de cada enzima con el inhibidor a las concentraciones mostradas en tampón de reacción (MgAc15 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,75) durante 5 minutos. Se añadió ADP a una concentración final de 70 µM y la mezcla de reacción se incubó antes de la adición de luciferina y luciferasa. Las RLU generadas después de la detección con luciferasa/luciferina se convirtieron a unidades de ATP equivalentes utilizando una curva estándar y los resultados se muestran en la Figura 4A. Se calculó una IC₅₀ (la concentración de inhibidor que reduce la actividad de la enzima en un 50%) y proporciona valores de 10,4 µM (Sac), 4,3 µM (Tma) y 0,06 µM (mioquinasa de conejo). La presencia de Ap5A no tiene un efecto perjudicial sobre la actividad de la luciferasa (ver Figura 4B);

35 la **figura 5** muestra la configuración de un dispositivo de flujo lateral para la detección de un analito en una muestra; la **figura 6** muestra la configuración de un dispositivo de filtración para la detección de un analito en una muestra;

50 las **figuras 7A y 7B** muestran los efectos de los inhibidores adicionales de la actividad de ruido de ruido de fondo derivada de tejidos o muestras de mamíferos y/o el ruido de ruido de fondo de otras fuentes (por ejemplo, contaminación de levadura). Los experimentos se llevaron a cabo esencialmente como se describe para la figura 4. No se observó ningún efecto adverso sobre la actividad de la luciferasa para ninguno de los inhibidores examinados (resultados no mostrados). La adenilato quinasa de levadura se obtuvo de Sigma. Higo. Figura 7A; comparación de la inhibición de las adenilato quinasa por Ap6A, MAK = AK de músculo de conejo (mioquinasa); YAK = AK de levadura; SAC = Ak de *S. acidocaldarius*; TMA = AK de *T. maritima* AK. Figura 7B; comparación de Ap5A y Ap6A para la inhibición de la adenilato quinasa de ruido de ruido de fondo contaminante de células de mamífero (MAK) o levadura (YAK). Ap4A (no mostrado) y Ap6A producen perfiles similares a Ap5A para diferenciar entre un ejemplo de una adenilato quinasa reportera monomérica (bacteriana) (de *Thermotoga maritima*) y un ejemplo de una adenilato quinasa trimérica (arquea) de *Sulfolobus acidocaldarius* cuando cualquiera se compara con un ejemplo representativo de adenilato quinasa no reportera de tejido de mamífero (Figura 7A). Ap4A (no mostrado) y Ap6A no permiten en un ensayo distinguir entre las enzimas bacterianas y de arquea y una enzima de origen fúngico (representada aquí por la AK de *Saccharomyces cerevisiae*) (Figura 7B). En este caso Ap5A todavía se puede utilizar para distinguir las adenilato quinasa reporteras de la enzima de levadura.

65 **Ejemplo 1 - Purificación de enzimas adenilato quinasa nativas**

[0155] La biomasa se produjo a partir de veinticuatro microorganismos diversos (Tabla 3).

5 [0156] Se representaron ocho miembros de las arqueas ("Archaea") junto con dieciséis bacterias aeróbicas y anaeróbicas diversas. Las AK de cada uno de estos organismos se purificaron por cromatografía de afinidad usando absorción y desorción selectiva de Cibacron Blue 3A (Blue Sepharose). Todas las enzimas se caracterizaron posteriormente y se purificaron por filtración en gel (Superdex G200). Esto permitió la identificación de la fracción principal de AK y estimación de la masa molecular.

10 Tabla 3: Lista de los organismos cultivados para producir biomasa para el aislamiento de las AK

Organismo	Dominio	Crecimiento	T ₀₀₁	PH ₀₀₃
1 Aeropyrum pernix	Arquea	aeróbica	95°C	7,0
2 Alicyclobacillus acidocaldarius	Bacteria	aeróbica	65°C	3,5
3 Aquifex pyrophilus	Bacteria	microaerófilo	85°C	6,5
4 Bacillus caldotenax BT1	Bacteria	aeróbica	65°C	7,0
5 especies de Bacillus PS3	Bacteria	aeróbica	65°C	7,0
6 Bacillus stearothermophilus 11057	Bacteria	aeróbica	65°C	7,0
7 Bacillus stearothermophilus 12001	Bacteria	aeróbica	65°C	7,0
8 Bacillus thermocatenulatus	Bacteria	aeróbica	65°C	7,0
9 Clostridium stercorarium	Bacteria	anaeróbica	55°C	7,0
10 Melothermus ruber	Bacteria	aeróbica	60°C	6,5
11 Pyrococcus furiosus	Arquea	anaeróbica	95°C	7,5
12 Pyrococcus horikoshii	Arquea	anaeróbica	95°C	7,0
13 Pyrococcus Woesel	Arquea	anaeróbica	95°C	7,0
14 Rhodothermus marinus	Bacteria	aeróbica	70°C	6,5
15 Sulfolobus acidocaldarius 98-3	Arquea	aeróbica	75°C	2,5
16 Sulfolobus shibatae B21	Arquea	aeróbica	75°C	2,5
17 Sulfolobus solfataricus P2	Arquea	aeróbica	75°C	2,5
18 Thermoanaerobacter ethanolicus	Bacteria	anaeróbica	65°C	6,0
19 Thermoanaerobacter thermosulfurogenes	Bacteria	anaeróbica	65°C	6,5
20 Thermobrachium celere	Bacteria	anaeróbica	60°C	7,0
21 Thermococcus litoralis	Arquea	anaeróbica	85°C	6,5
22 Thermus aquaticus YT1	Bacteria	aeróbica	70°C	8,0
23 Thermus caldophilus GK24	Bacteria	aeróbica	70°C	8,0
24 Thermus thermophilus HB8	Bacteria	aeróbica	70°C	8,0

Ejemplo 2 - Análisis de estabilidad de adenilato quinazas nativas

15 [0157] Se evaluó la estabilidad a 70, 80 y 90°C de adenilato quinazas aisladas a partir de biomasa de organismos, y los resultados se muestran en la figura 1.

20 [0158] Las adenilato quinazas se aislaron de la biomasa por cromatografía de afinidad usando absorción y desorción selectiva de Cibacron Blue 3A (Blue Sepharose). Las muestras eluidas de las columnas se diluyeron 1:10000 y, a continuación, se añadieron 10 µl de cada una a un pocillo de microtitulación. Se añadieron 2,5 µl de apirasa a cada

pocono para destruir el ATP presente en el tampón de elución, y se incubó a 37°C durante 30 minutos. La apirasa se inactivó mediante tratamiento térmico a 65°C durante 20 minutos.

5 [0159] Se añadió sustrato ADP y se incubó a 70 (panel A), 80 (panel B) o 90°C (panel C) durante 30 minutos y se enfrió hasta 25°C antes de la adición de 10 µl de reactivo D-luciferina-luciferasa. El ATP producido se midió como RLU en un luminómetro de placas.

Ejemplo 3 - Expresión y purificación de adenilato quinasas recombinantes

10 [0160] Se aseguraron los clones que expresaban AK representativas y se produjeron AK recombinantes de las arqueas *Sulfolobus acidocaldarius* y la bacteria, *Bacillus stearothermophilus*. Los plásmidos se transformaron en *E. coli* y los extractos celulares mostraban que contenían bandas de proteínas en electroforesis correspondientes a las masas moleculares esperadas de las AK. La actividad AK se midió después de incubación a la temperatura apropiada (80°C para AK de *Sulfolobus acidocaldarius* y 60°C para AK de *Bacillus stearothermophilus*).

15 [0161] Se establecieron procedimientos de purificación para ambas AK e incluían un tratamiento térmico inicial de incubación durante 20 min a 80°C, para inactivar y agregar proteínas derivadas de *E. coli*, seguido de cromatografía de afinidad y filtración en gel. La cromatografía de afinidad implicaba la adsorción de la enzima en Blue Sepharose, seguido de la elución específica con una baja concentración de cofactores de AK (AMP + ATP e iones magnesio). El ATP y AMP (Sigma) en el tampón de elución se degradaron por incubación con apirasa mesófila, que se inactiva fácilmente mediante tratamiento térmico posterior. La cromatografía de filtración en gel se escaló para utilizar una columna Superdex de grado de preparación para permitir la preparación de grandes cantidades de ambas enzimas.

20 [0162] Se diseñaron cebadores para la amplificación por PCR de los genes de AK de los organismos identificados durante el cribado de enzimas nativas candidatas.

25 [0163] Los microorganismos se cultivaron usando condiciones de crecimiento definidas individualmente y se aisló el ADN genómico y se utilizó como plantilla para la amplificación por PCR de los genes de adenilato quinasa de cada organismo. Los genes de adenilato quinasa amplificados por PCR de los organismos, *Thermotoga maritima*, *Aeropyrum pernix*, *Sulfolobus acidocaldarius* y *Sulfolobus solfataricus* se subclonaron en el vector, pET28a, y se transformaron en una cepa de *E. coli* potenciada en codones que expresaban ARNt raros (Zdanovsky et al. 2000). Esta cepa de *E. coli* es adecuada para aumentar los niveles de expresión de genes ricos en AT.

30 [0164] El éxito de la transformación se evaluó mediante un estudio de mini-expresión, y los resultados se analizaron por SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivo antes y después de la inducción con IPTG. También se utilizó SDS-PAGE para analizar los sobrenadantes después de la inclusión de una etapa de tratamiento térmico, que consistió en el calentamiento de la muestra a 80°C durante 20 minutos antes de desarrollarlo en el gel SDS-PAGE para separar las proteínas lábiles al calor presentes en la muestra.

Ejemplo 4 - Análisis de la estabilidad de adenilato quinasas recombinantes

35 [0165] La estabilidad de las enzimas tAK recombinantes se evaluó en lisados celulares de *E. coli* en bruto.

40 [0166] Las células se cultivaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 3 y se lisaron por sonicación. La actividad de AK del extracto en bruto se determinó antes y después del tratamiento térmico a 80°C durante 30 minutos, seguido de dilución en serie de 10 veces.

45 [0167] Los resultados (véase la figura 2) demuestran que una amplia variedad de enzimas recombinantes son adecuadas para el uso en el procedimiento de la presente invención. Las AK particularmente preferidas son las de *T. maritima*, *A. fulgidus* y *S. solfataricus*. Dichas enzimas probablemente proporcionan un mayor rango dinámico para el ensayo bioluminiscente, si es necesario, para proporcionar aún más sensibilidad.

Ejemplo 5 - Modificación genética de adenilato quinasas para mejorar la estabilidad

50 [0168] Los mutantes dirigidos al sitio se construyeron en el gen de AK de *P.furiosus*, *P.horikoshii* y *S.acidocaldarius* tal como se muestra en los Ejemplos 6-8 y las SEQ ID 17-19, respectivamente, utilizando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia.

55 [0169] Además de los cambios específicos identificados en cada gen, las regiones subrayadas en la secuencia de *S.acidocaldarius* forman la región de empaquetamiento del núcleo de la estructura de trímero de la adenilato quinasa de arquea. Por lo tanto, las sustituciones de aminoácidos que alteran el empaquetamiento de esta región es probable que tengan un efecto importante en la disminución de la estabilidad térmica y física de la enzima. A la inversa, las sustituciones de aminoácidos que mejoran el empaquetamiento del núcleo, en particular los residuos hidrófobos con cadenas laterales grandes, pueden estabilizar la enzima al calor u otros procesos. Por lo tanto, además de las mutaciones específicas ya descritas, se utilizaron una serie de estrategias "selectivas" con transposición de genes localizados de secuencias de genes relacionados en estas regiones (esencialmente como se

describe en Stemmer (1994) Nature 370: 389-391 y Crameri et al (1996) Nature Biotech. 14: 315-319) y mutagénesis basada en PCR aleatoria usando oligonucleótidos degenerados o mezclas de nucleótidos modificados (por ejemplo Vartanian et al (1996) Nucleic Acid Res.24: 2627-2633). Una serie de estas modificaciones muestran una estabilidad alterada cuando se evaluaron mediante expresión recombinante en *E. coli* y un ensayo rápido de la actividad de la adenilato quinasa en células lisadas a alta temperatura.

Ejemplo 6 - Adenilato quinasa de *Pyrococcus furiosus* modificadas genéticamente para proporcionar una mayor estabilidad (SEQ ID N° 17).

[0170] MPFVVIITGI PGVVKSTITR LALQRTKAKF RLINFGDLMF EEAVKAGLVK HRDEMRKLPL (K A E) IQRELQMKAKKI (T A A) EMAKE HPILVDTHAT IKTPHGY (M A L) LG LPYEWKTLN PNFVIVIEAT PSEILGRRLR DLKRDRDVET EEQIQRHQDL NRAAAIAYAM HSNALIKIIE NHEDKGLEEA VNELVKILDL AVNEYA

[0171] Las mutaciones en uno o más o todos los sitios indicados modifican la estabilidad de la enzima. Además de los tres cambios definidos resaltados, la modificación de la alanina en la posición 157 a otro residuo pequeño hidrófobo (tal como I, L) o resto hidrófobo más grande (por ejemplo, F) aumenta la estabilidad de la proteína recombinante. Por lo tanto, hay 35 variantes posibles a través de la combinación de modificaciones en estos sitios. La modificación del aminoácido 157 a un residuo polar, tal como T (como se observa en la posición equivalente en AdkA de *P.horikoshii*), S, Y, D, E, K, R da lugar a una disminución en la estabilidad.

Ejemplo 7 - Adenilato quinasa de *Pyrococcus horikoshii* modificadas genéticamente para proporcionar una mayor estabilidad (SEQ ID N° 18).

[0172] La modificación de uno o ambos de los residuos que se muestran en negrita y subrayado aumenta la estabilidad de la enzima (son posibles 3 variantes).

MPFVVIITGI PGVVKSTITK LALQRTRAKF KLINFGDLMF EEALKLGLVK HRDEMRKLPL EVQRELQMNA AKKIAEMAKN YPILLDTHAT IKTPHGYLLG LPYEVIKILN PNFVIVIEAT PSEILGRRLR DLKRDRDVET EEQIQRHQDL NRAAAIAYAM HSNALIKIIE NHEDKGLEEA VNELVKILDL AVKEYA

Ejemplo 8 - Adenilato quinasa a partir de *Sulfolobus acidocaldarius* modificada genéticamente para proporcionar una mayor estabilidad (SEQ ID N° 19).

[0173] La modificación de los residuos subrayados mostrados puede aumentar la estabilidad de la enzima.

MKIGIVTGIP GVGKSTVLAK VKEILDNQGI NNKIINYGDF MLATAKLG Y AKDRDEMRKL SVEKQKQLQI) DAAKGIAEEA RAGGEGYLF DTHAVIRTPS GY (A a M) PGLPSYV ITEINPSVIF LLEADPKIIL SRQKRDTRRN RNDYSDESVI LET/NFARYA ATASAVLAGS TVKVIVNVEG DPSIAANEII RSMK

Ejemplo 9 - Expresión de acetato y piruvato quinasa

[0174] Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 3, se expresaron acetato y piruvato quinasa:

SEQ ID No. 20 - Acetato quinasa de *Thermotoga maritima*
 SEQ ID No. 21 - Piruvato quinasa de *Pyrococcus horikoshii*
 SEQ ID No. 22 - Piruvato quinasa de *Sulfolobus sulfataricus*
 SEQ ID No. 23 - Piruvato quinasa de *Thermotoga maritima*
 SEQ ID No. 24 - Piruvato quinasa de *Pyrococcus furiosus*
 SEQ ID No. 25 - Acetato quinasa de *Methanosarcina thermophila*
 SEQ ID No. 78 - Adenilato quinasa de *E.coli*
 SEQ ID No. 79 - Piruvato quinasa de *E.coli*
 SEQ ID No. 80 - Acetato quinasa de *E. coli*
 SEQ ID No. 81 - Adenilato quinasa de *Methanacoccus voltae* (MVO)
 SEQ ID No. 82 - Adenilato quinasa de *Methanococcus thermolithotrophicus* (MTH)
 SEQ ID No. 83 - Adenilato quinasa de *Bacillus globisporus*
 SEQ ID No. 84 - adenilato quinasa de *Bacillus subtilis*

Ejemplo 10 - Detección de hepatitis C en una muestra de fluido oral

[0175] Se desarrollan anticuerpos contra los antígenos de superficie de la hepatitis C derivados de proteínas estructurales (por ejemplo E1 y E2) o proteínas no estructurales (por ejemplo, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) utilizando procedimientos estándar. De forma breve, las proteínas se expresan como proteínas recombinantes en *E. coli*, o se sintetizan como péptidos inmunogénicos cortos. Los péptidos cortos se conjugan a un portador adecuado, tal como HLA, y se inyectan intramuscularmente en conejos o cobayas a concentraciones de aproximadamente 100 µg/ml. Se utiliza adyuvante completo de Freund para la primera etapa de inmunización, con adyuvante incompleto utilizado posteriormente.

[0176] Se recoge suero policlonal después de tres estimulaciones mensuales durante un transcurso de tiempo de 3 meses. Se purifica IgG de la sangre y se conjuga con tAK de Tma usando química de acoplamiento estándar. De forma breve, el anticuerpo se derivatiza con SPDP (Pierce Chemical Company) en una relación molar de 3 SPDP a 1 tAK de Tma. El sulfhidrilo libre en Tma es liberado mediante un tratamiento limitado con DTT y la proteína reacciona con el anticuerpo derivatizado. El conjugado anticuerpo-tAK se separa a continuación mediante cromatografía de filtración en gel.

[0177] Se recoge una muestra de fluido crevicular oral mediante un dispositivo de toma de muestras adecuado. El dispositivo se calienta durante 1 minuto a 90°C en un horno seco y a continuación se mezcla con 1 ml de solución que contiene el conjugado de anticuerpo policlonal anti-HCV-tAK. El hisopo se enjuaga entonces en agua fría para eliminar cualquier conjugado no unido y se inserta en un tubo reactivo que contiene una mezcla de reactivos que comprende Mg-ADP, luciferina y luciferasa. Se incuba el hisopo durante 2 minutos y a continuación todo el tubo reactivo se introduce en un monitor de higiene de mano y se realiza la lectura inmediatamente.

Ejemplo 11 - Detección del estado inmune en una muestra de suero o sangre completa, por ejemplo, después de la inmunización con la vacuna contra el sarampión o en una fase temprana después de la exposición al virus del sarampión infeccioso

[0178] Se utiliza un fragmento de la glicoproteína del sarampión, otros componentes de la superficie del virus del sarampión o el virus del sarampión inactivado por calor para recubrir un soporte sólido, tal como una tira reactiva. Se aplica una muestra de sangre completa, diluida 1:2 con PBS que incluye hasta 2M de urea para inactivar cualquier quinasa no reportera, a la tira reactiva y se deja que se unan los anticuerpos contra los componentes del sarampión (etapa de unión 1; 5 minutos a 30°C). Se añade apirasa a la muestra de sangre para inactivar cualquier ATP durante esta fase. Después de un breve enjuague con solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7,4), la tira reactiva se sumerge en una solución que contiene IgG anti-humana conjugada a tAK y se incuba (etapa de unión 2: 5 minutos a 30°C). Una vez más la tira reactiva se enjuaga brevemente y a continuación se coloca dentro de un tubo reactivo. Se añadieron simultáneamente luciferina/luciferasa y ADP y se midió la reacción utilizando un luminómetro de mano después de 5 minutos.

Ejemplo 12 - Preparación de muestras para la detección de norovirus en muestras de heces

[0179] El norovirus se mide rutinariamente en muestras diarreicas (es decir, muestras de heces) para fines de diagnóstico clínico.

[0180] A fin de reducir los niveles de actividad quinasa contaminante se diluye la muestra de heces entre 1:2 y 1:4 con un tampón diseñado para inactivar la quinasa contaminante. Este tampón incluye uno o más de los siguientes componentes:

urea 2 M; guanidina 2 M; SDS al 1%; desoxicolato al 1%; Triton X100 al 1%

[0181] La adición de los componentes anteriores también hace que el antígeno de norovirus sea más fácilmente detectable por los conjugados de anticuerpos descritos en el siguiente ejemplo, aumentando la señal de ensayo, así como reduciendo el ruido del ensayo. Opcionalmente, también se puede añadir apirasa a la muestra para destruir cualquier ATP que pueda estar presente.

[0182] Los mismos tipos de aditivos también se pueden usar como componentes de procesamiento de la muestra para la detección de norovirus en el vómito, una muestra que sería útil para detectar el norovirus, pero que, hasta la fecha, no ha sido adecuada para el análisis.

Ejemplo 13 - Ensayo de flujo lateral para la detección de norovirus y/o la toxina C-dificile en una muestra de heces

[0183] Se prepara un conjugado de quinasa reportera mediante la conjugación de la adenilato quinasa de *P.abysyi* a la proteína VP1 de norovirus o fragmentos de la misma (por ejemplo, el dominio P (que se encuentra entre los aminoácidos 362 y 703), el dominio P2 (aminoácidos 414-589), o sub-fragmentos del dominio P1 (aa 362-413 o 590-703). Las posiciones dentro del norovirus corresponden a la numeración tal como se describe en Chen R, Neill JD, Estes MK, Prasad BV. X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. Proc Natl Acad Sci USA (2006) 103 p8048-53.

[0184] Se prepara un dispositivo de flujo lateral esencialmente como se muestra en la Figura 5. La zona de recepción de muestras se recubre con un anticuerpo o anticuerpos anti-norovirus (para proporcionar la detección de la gama antigénicamente diversa de aislados clínicos). El conjugado de quinasa reportera (descrito anteriormente) se une a continuación a la zona de recepción de muestras a través de los anticuerpos.

[0185] La muestra clínica de heces se procesa como se describe en el Ejemplo 12 anterior y se aplica a la zona de recepción de muestras del dispositivo. En presencia de norovirus, el conjugado de quinasa reportera se desplaza y

migra a la zona de detección, a través de la zona de reducción de ruido de fondo. La zona de reducción de ruido de fondo comprende una membrana de intercambio aniónico que retiene cualquier ATP contenido en la muestra original. Mediante el uso de un tampón a pH neutro (tal como PBS) el ATP se retiene en la membrana de intercambio aniónico, mientras el conjugado de quinasa reportera pasa a través, ya que permanece por debajo del punto isoeléctrico y por lo tanto es catiónico. La quinasa no reportera previamente se ha eliminado en la fase de preparación de la muestra (véase el ejemplo 12).

[0186] El dispositivo de flujo lateral se separa a continuación en dos y la zona de detección se coloca entonces en un tubo reactivo que contiene ADP, luciferina y luciferasa. La presencia de norovirus en la muestra original se determina mediante la medición de la emisión de luz con un tiempo de ensayo de 2-5 minutos.

[0187] De manera similar, un dispositivo de flujo lateral puede estar provisto para detectar la presencia de la toxina A o B de *C. difficile* en una muestra. Los anticuerpos contra estas dianas están bien descritos en la literatura y se pueden conjugar con adenilato quinasa(s) como se ha descrito anteriormente. La muestra de heces se procesa como en el ejemplo 12 y el ensayo de flujo lateral se lleva a cabo como se ha descrito.

[0188] Opcionalmente, un dispositivo puede estar provisto para detectar la presencia de la toxina o toxinas de *C. difficile* o norovirus en una muestra, lo que permite el diagnóstico diferencial de las muestras clínicas a realizar. La muestra se procesa como se describe en el Ejemplo 12 y se mezcla con reactivos de diagnóstico para norovirus y toxina o toxinas de *C. difficile* en la misma reacción. La muestra puede desarrollarse en dos dispositivos de flujo lateral separados establecidos para capturar sólo una de las dos dianas o preferiblemente en un único dispositivo con dos ventanas de captura. Estos dos dispositivos o dos ventanas se ensayan a continuación por separado para determinar la presencia de una o más de las especies diana.

Ejemplo 14 - Detección de Legionella en una muestra de agua

[0189] El ensayo se lleva a cabo utilizando un dispositivo tal como se establece en la Figura 6.

[0190] Se toma una muestra de agua de una torre de refrigeración en el punto de mantenimiento de rutina. Habitualmente se añaden 50 ml de agua a una jeringa que ya contiene esferas de látex recubiertas con anticuerpo anti-legionella (anticuerpo A; o fragmento del mismo) y la quinasa reportera de *A. fulgidus* conjugada químicamente a un segundo anticuerpo anti-legionella (anticuerpo B). Opcionalmente, los anticuerpos A y B pueden ser el mismo anticuerpo, siempre que haya múltiples sitios de unión en la superficie de la legionela. Preferiblemente, son diferentes anticuerpos que reconocen diferentes epítomos de la legionela. Si la legionella está presente en la muestra de agua, se une a las esferas de látex a través de anticuerpos A. La quinasa reportera se une a la esfera de látex a través de la interacción del anticuerpo B con la legionella ya unida.

[0191] La jeringa se agita continuamente durante 5 minutos a mano o bien opcionalmente dentro de un agitador automatizado adecuado. La jeringa se aplica a un dispositivo de filtración que contiene un filtro diseñado para permitir el paso libre del agua, quinasa no reportera, ATP, conjugado de quinasa reportera no complejo, y cualquier microorganismo no complejo, pero que conservará algo unido a la esfera de látex. Por lo tanto, cualquier quinasa reportera unida a la esfera de látex será retenida en el filtro.

[0192] El filtro se retira de la carcasa del filtro y se transfirió a un tubo reactivo. La presencia de legionella se evalúa mediante la adición de ADP, luciferina y luciferasa y la medición de la emisión de luz utilizando un luminómetro portátil.

Ejemplo 15 - Detección de Clamidia en una muestra de hisopo

[0193] Se utiliza un dispositivo de hisopos para recoger una muestra vaginal del individuo de prueba. El hisopo se coloca en un tubo reactivo que contiene 1 M de urea para ayudar a descomponer el tejido y 2 μ M de Ap5A de concentración final que bloquea la actividad de cualquier quinasa no reportera. La presencia de Ap5A no tiene un efecto perjudicial sobre la actividad de la luciferasa (véase Figura 4B), por lo tanto, incluso si está presente en la mezcla de reacción final no afecta negativamente a los límites de detección.

[0194] Se prepara un conjugado de quinasa reportera mediante la conjugación de la adenilato quinasa de *S. solfataricus* a un antígeno de Clamidia. Un antígeno de Clamidia adecuado es la proteína principal de la membrana externa (MoMP), que está presente en muchas copias en la superficie de Clamidia. También se han descrito una serie de proteínas de membrana polimórficas y pueden representar antígenos diana adecuado para la detección específica y sensible. Pueden generarse anticuerpos para esta proteína, o péptidos derivados del mismo de acuerdo con protocolos convencionales.

[0195] Se prepara un dispositivo de flujo lateral como se indica en la figura 5. La zona de recepción de muestras del dispositivo se recubre con un anticuerpo para un antígeno de Clamidia. El conjugado de quinasa reportera se aplica a continuación sobre la zona de recepción de muestras del dispositivo, y se une a la misma a través de la interacción entre el antígeno del conjugado y el anticuerpo recubierto.

[0196] A continuación, se deposita un pequeño volumen de la muestra sobre la zona de recepción de muestras del dispositivo. Cualquier antígeno de *Clamidia* presente en la muestra desplaza el conjugado de quinasa reportera de la zona de recepción de muestras y permite el flujo del conjugado de quinasa reportera a la zona de detección en la que se puede medir. El dispositivo se coloca a continuación en un tubo reactivo, y con ADP y los reactivos luciferina/luciferasa. La señal de emisión de luz se mide en menos de 5 minutos.

[0197] Como antígeno alternativo, se pueden emplear los anticuerpos producidos contra el lipopolisacárido bacteriano de *Clamidia* y conjugarse con la quinasa reportera. Esta diana multivalente puede proporcionar una mayor sensibilidad y especificidad que otras dianas. Opcionalmente más de uno de los antígenos diana se puede combinar para amplificar la señal detectada.

Ejemplo 16 - Detección de *Listeria* en una muestra de alimento

[0198] Se inmoviliza una muestra de alimento sospechosa de contener *Listeria* sobre una placa de microtitulación mediante la unión no específica de componentes de la muestra a la placa, el tratamiento de la placa para evitar una unión no específica adicional a la misma y lavado.

[0199] Se prepara un conjugado de quinasa reportera mediante la conjugación de un anticuerpo específico para *Listeria* a la piruvato quinasa de *S. solfataricus*.

[0200] El conjugado de quinasa reportera se aplica a la placa y se deja que se una, antes de un nuevo lavado/recuperación. La placa se calienta a continuación hasta aproximadamente 90°C durante aproximadamente 1 minuto en un tampón de extracción de células (en un ciclador térmico) para desnaturalizar cualquier AK no reportera presente y liberar cualquier ATP que pueda estar atrapado dentro del microorganismo. La placa se enfría a continuación hasta 37°C y se añade una ATPasa termolábil, tal como apirasa. La placa se incuba durante aproximadamente 5 minutos para eliminar el ATP de ruido de fondo, a continuación las temperaturas se elevan hasta aproximadamente 90°C para desnaturalizar la ATPasa termolábil.

[0201] A continuación, se añaden simultáneamente ADP y una mezcla de luciferina y luciferasa a la placa. La quinasa actúa en la ADP para generar ATP, que posteriormente reacciona con la luciferina/luciferasa para producir luz. La emisión de luz se mide usando un luminómetro de mano y es directamente proporcional a la concentración del microorganismo presente.

Ejemplo 17 - Detección de *Salmonella* en una muestra de alimento

[0202] Se prepara una fase sólida mediante el recubrimiento de esferas magnéticas con un primer anticuerpo policlonal anti-salmonella desarrollado en una cobaya.

[0203] Se prepara un conjugado de quinasa reportera mediante la conjugación de la adenilato quinasa de *T. maritima* a un segundo anticuerpo policlonal anti-salmonella desarrollado en una cobaya.

[0204] La muestra de alimento a analizar se dispersa en un tampón que contiene 1 M de urea más 2 µM de Ap5A y se mezcla durante 5 minutos en presencia de las esferas magnéticas y el conjugado de quinasa reportera. Esta mezcla puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o a una temperatura elevada. Si la *Salmonella* está presente en la muestra de alimento, se unirá al primer anticuerpo anti-salmonella en la esfera magnética. A su vez, el conjugado de quinasa reportera se unirá a la esfera magnética a través de la interacción entre el segundo anticuerpo anti-salmonella y la salmonella ya unida.

[0205] Las esferas magnéticas se recogen a continuación por la atracción a un imán fuerte y se lavan con un tampón neutro. El imán con esferas unidas se transfiere a un tubo reactivo y se añaden simultáneamente ADP, luciferina y luciferasa. La señal de emisión de luz se lee en un luminómetro, preferiblemente de mano, en 5 minutos.

Ejemplo 18 - Validación de los procesos de esterilización de líquidos en grandes volúmenes

Preparación de Indicador 1

[0206] Se prepara un primer indicador por unión covalente de 0,1 mg de piruvato quinasa de *Sulfolobus solfataricus* a una tira de poliestireno.

Preparación de Indicador 2

[0207] Se prepara un segundo indicador uniendo 0,1mg de adenilato quinasa de *A. fulgidus* a la cara interna de una membrana semipermeable, tal como un tubo de diálisis. La quinasa de *A. fulgidus* contiene un residuo de cisteína de origen natural reactiva (es decir, no unida a disulfuro dentro de la enzima nativa), que puede hacerse reaccionar con BMPH (Pierce). Esto genera un grupo capaz de reaccionar con carbohidratos oxidados, tal como se generan, por

ejemplo, mediante el tratamiento de tubos Visking con un agente oxidante adecuado. La enzima se hace reaccionar con la superficie de membrana oxidada para generar un indicador unido covalentemente.

Validación

5 [0208] El indicador se une a continuación en el gran volumen de líquido y se lleva a cabo el proceso de esterilización (tal como, esterilización en autoclave, el paso de gases oxidantes u otra esterilización química).

10 [0209] Se extrae el indicador del gran volumen de líquido en la finalización del proceso, y se mide la actividad residual de la quinasa. Para lograr la medición, los indicadores se incuban primero en presencia de apirasa, a una concentración de 10 µg/ml durante 2 minutos. La apirasa puede inactivarse mediante la adición de Ap5A a una concentración de 5 µM. Los dos indicadores pueden leerse a continuación de forma independiente mediante la adición de un reactivo combinado que contiene ADP, luciferina y luciferasa. La medición se realiza en 5 minutos utilizando un luminómetro de mano, tal como un monitor de higiene.

15 [0210] En este ejemplo, cualquier quinasa no reportera que pudiera estar presente se destruye por las condiciones de tratamiento y, por tanto, no se requieren etapas específicas de reducción de la quinasa. La actividad residual se compara a continuación con un valor umbral definido.

20 Ejemplo 19 - Validación del rendimiento de ciclos de lavado de ropa utilizando detergentes biológicos

Preparación de Indicador 1

25 [0211] Se prepara un primer indicador mediante reticulación de una adenilato quinasa de *S.solfataricus* en una varita de poliestireno flexible utilizando un procedimiento basado en la formación de enlaces disulfuro. En este procedimiento, la adenilato quinasa se deriva con un agente heterobifuncional, tal como de 6-(3'-[2-piridilditio]propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo (SPDP; compañía química Pierce, Reino Unido) en una proporción de entre 1-3 SPDP:proteína. La quinasa derivatizada se reduce a continuación mediante reacción con un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT) o ácido 2-mercaptoetanosulfónico (MESNA), el agente reductor se elimina mediante diálisis, y la quinasa se hace reaccionar con una superficie de poliestireno derivatizada con maleimida. Habitualmente, 0,1 mg de quinasa está presente en el indicador.

Preparación de Indicador 2

35 [0212] Se prepara un segundo indicador mediante la adherencia no específica de una adenilato quinasa de *S. acidocaldarius* sobre una tira de poliestireno de alta unión a proteínas. La quinasa se prepara a una concentración de 0,5-2 mg/ml en un tampón de bicarbonato (pH 9,6), que contiene opcionalmente el agente estabilizante sorbitol a entre 0,1 y 2% p/v. La quinasa en tampón de unión se incuba a continuación con la tira de poliestireno de alta unión a proteínas durante un período de 1-2 horas a 22°C (o 4°C durante la noche). La quinasa residual se elimina mediante lavado en una solución salina tamponada con fosfato. Habitualmente, 0,1 mg de quinasa está presente en el indicador.

Validación de los ciclos de lavado

45 [0213] La lavadora se carga con los artículos a lavar, y el indicador se fija en un soporte adecuado en el interior de una lavadora (para facilitar su recuperación). A continuación, se realiza el ciclo de lavado. A la finalización del ciclo, se extrae el indicador y se evalúa la actividad residual de la quinasa. En este ejemplo, el proceso de lavado elimina y/o inactiva cualquier quinasa no reportera y cualquier ATP residual, por lo tanto, no interfieren con el ensayo. La presencia de la quinasa reportera se determina mediante la adición de ADP, seguido en 1 minuto por la adición de luciferina y luciferasa.

50 [0214] Si la medición de la actividad de quinasa residual es igual a o por debajo de un nivel umbral predeterminado, entonces la carga se depura para su posterior procesamiento.

55 Ejemplo 20 - Preparación de un dispositivo indicador basado en fibrina

Preparación de fusiones de tAK para la reticulación a fibrina

60 [0215] Se añade una secuencia de sustrato de transglutaminasa (MNQEQVSPGG - SEQ ID No: 33) al extremo N-terminal, C-terminal, o ambos N- y C-terminales, de la adenilato quinasa de *S. acidocaldarius* codificada por un gen de clones optimizado en codones. Esta construcción se transfiere como un fragmento NdeI - Sall en un vector de expresión interno (pMTL 1015; tal como se describe en el documento WO 2005/123764). La construcción de expresión se confirma mediante secuenciación de ADN y se transfiere a huéspedes de expresión BL21 o RV308 para la expresión posterior.

65

[0216] De manera similar, se fusiona el gen de tAK resintetizado de *Thermatoga maritima* (SEQ ID 29) a la secuencia de la transglutaminasa en las tres orientaciones identificadas anteriormente. La clonación y la preparación del sistema de expresión son también como se ha descrito anteriormente.

5 [0217] Las construcciones de fusión también se pueden expresar en otras combinaciones de vector de expresión-huésped con la adición de etiquetas de afinidad para la purificación posterior. Particularmente útil en este contexto son los vectores de expresión que añaden etiquetas de 6-histidina en los extremos N-terminal o C-terminal de las proteínas de fusión, modificaciones que ayudan a la purificación y detección, pero no interfieren con las propiedades intrínsecas de las proteínas de fusión. Los vectores para este tipo de modificación incluyen vectores de la serie pET (Novagen/Merck) y vectores de la serie pQE (Qiagen).

15 [0218] Para generar material para los dispositivos indicadores, se cultivan cepas de expresión inicialmente en fermentadores de 8 litros esencialmente bajo condiciones de cultivo estáticas. De forma breve, las cepas se preparan como reservas de semillas y, posteriormente, se diluyen en los 8 litros de medio de crecimiento (caldo terrífico modificado que contiene glucosa adicional). Los cultivos se cultivan bajo condiciones de fermentación estándar hasta que los cultivos alcanzan una densidad óptica (DO a 600 nm), demostrando que están entrando en condiciones estacionarias (típicamente alrededor de DO = 5). A continuación, se mantienen los fermentadores en condiciones mínimamente aireadas durante un máximo de 12 horas antes de la recogida de material mediante centrifugación continua.

20 **Purificación de fusiones de tAK**

[0219] El material recogido se purifica a continuación según el siguiente protocolo.

25 **Tampón A:** 20 mM de Tris-HCl; 900 mM de NaCl, pH 7,5
Tampón de lavado: 20 mM de Tris-HCl; 200 mM de NaCl, pH 7,5
Tampón B: 20 mM de Tris-HCl; 200 mM de NaCl, pH 7,5
 10 mM de ATP; 10 mM de AMP; 10 mM de MgCl₂
Tampón de MgAc: 15 mM de MgAc (1M Fluka Biochemika), pH 6,8

- 30 1. Pesar pasta celular congelada (10 g) y se vuelve a suspender en 3x volumen (30 ml) de tampón A, pH 7,5.
2. Someter a ultrasonidos en hielo (~12.000khz) utilizando 25 ciclos de 30 segundos conectado/30 segundos sin conectar. Tomar 1 ml de muestra.
- 35 3. La solución de células sonicadas se centrifuga a 6.000 rpm durante 30 min a 4°C. Se vierte el sobrenadante cuidadosamente y se toma una muestra de 1 ml.
4. El sobrenadante se trata con calor a 80°C en un baño de agua durante 20 minutos. Se toma una muestra de 1 ml (Esta etapa es una etapa opcional, dependiendo de la estabilidad térmica de las proteínas de fusión).
5. La solución tratada con calor se centrifuga a 6.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se vierte el sobrenadante y se toma una muestra de 1 ml
- 40 6. Filtrar la muestra con un filtro de baja unión de 0,2 µm antes de cargar en la columna
7. Equilibrar la columna de flujo rápido de Blue Sepharose con 5 volúmenes de columna (CV) de tampón A
8. Cargar la muestra. Lavar la columna con tampón de lavado a 0 2 ml/noche durante la noche
9. Eluir la proteína con 100% de tampón B a una velocidad de flujo de 1 ml/mm. Recoger el producto en fracciones de 2,5 ml.
- 45 10. Una vez se han eluido todas las proteínas, lavar la columna con 100% de tampón B a 5 ml/min para 5 CV.
11. Reequilibrar la columna con 5 CV de tampón A.
12. Enjuagar la columna con 5 CV de etanol al 20% para almacenar a 4°C.

50 [0220] Opcionalmente, se aplican procedimientos de purificación de proteínas adicionales para obtener un producto de mayor pureza. La cromatografía de intercambio iónico en resinas de flujo rápido SP-Sepharose o resinas de flujo rápido Q-Sepharose es particularmente eficaz.

[0221] Las muestras se analizan a continuación utilizando un formato de ensayo estándar para identificar las fracciones que contienen actividad máxima de la adenilato quinasa. Esto se confirma mediante análisis de SDS-PAGE utilizando técnicas estándar. De manera breve, el procedimiento de ensayo se lleva a cabo utilizando el siguiente protocolo:

- 55 1. Diluir la fusión de tAK purificada 1:1000 y 1:10.000 en tampón de MgAc. Añadir 100 µl por pocillo.
2. Tratar con apirasa (50 µl/pocillo a 2,5 unidades por ml de concentración de solución madre; apirasa de patata de grado VI de Sigma) e incubar durante 30 minutos a 30°C, con agitación, para eliminar el ATP
- 60 3. Incubar la placa a 70°C durante 10 minutos para desnaturalizar la apirasa.
4. Añadir 50 µl/pocillo de ADP (275 µM de ADP en tampón MgAc) y sellar. Incubar a 70°C durante 20 minutos.
5. Extraer la placa y dejar enfriar hasta temperatura ambiente durante 20 minutos, calentar el reactivo de luciferasa/luciferina (L/L) hasta temperatura ambiente durante 20 minutos.
6. Añadir 200 µl de ATP estándar a 1 o 2 pocillos vacíos por placa.
- 65 7. Establecer inyectoros en un luminómetro y administrarlos con el reactivo L/L (reactivo ATP, Biotherma). Inyectar 30

μ de reactivo L/L/pocillo.

8. Leer luz generada inmediatamente usando el luminómetro.

[0222] Las fracciones con actividad quinasa máxima se dializan a continuación extensamente frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS pH 7,4) y se almacenan hasta su utilización. Opcionalmente, puede prepararse una fusión entre tAK y la molécula de fibrinógeno de longitud completa para proporcionar medios adicionales para incorporar la actividad enzimática dentro de la película de fibrina.

Deposición de fusiones de tAK sobre un soporte sólido

[0223] La fusión tAK-fibrina se diluye a alrededor de 200 μg/ml en PBS o tampón de bicarbonato (pH 9,6) y se aplica a un soporte sólido de acero inoxidable de grado 316L, plástico, vidrio o tela. Se deja que la proteína se adhiera a la superficie durante un máximo de 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C.

[0224] Opcionalmente, se añaden moléculas portadoras adicionales en esta etapa, por ejemplo, sacarosa a concentraciones de hasta 1% p/v, albúmina de hasta 1 mg/ml, mucina de cerdo de hasta 0,5% p/v. La adición de dichos portadores puede ser particularmente importante para ciertos tipos de indicador, pero la presencia del portador no debería interferir con la interacción posterior y la reticulación a la película de fibrina aplicada en la etapa siguiente.

Superposición de suciedad que contiene fibrina y reticulación a la fusión fibrina-tAK

[0225] Se añade una solución que contiene fibrinógeno para efectuar la reticulación del indicador a la suciedad de prueba que contiene fibrina (matriz biológica).

[0226] Se mezcla nueva una solución que contiene hasta 3 mg/ml de fibrinógeno (que contiene Factor XIII), 2,5 mM de CaCl₂ y trombina (hasta 5 unidades NIH por ml) y se añade a la superficie recubierta del soporte sólido. La reacción se deja proceder a temperatura ambiente durante un máximo de 30 minutos, dependiendo del nivel de reticulación necesario. Opcionalmente, se añaden en esta etapa albúmina (hasta 80 mg/ml) y hemoglobina (hasta 80 mg/ml) para proporcionar una estimulación más difícil y más realista para la limpieza de suciedad de tipo sangre. Después de la reticulación, se extrae el líquido residual y se deja secar el dispositivo indicador.

[0227] Opcionalmente, se añade la fusión de tAK-péptido de fibrina a la solución de suciedad de prueba que contiene fibrina (matriz biológica) antes de su adición a la superficie de soporte sólido. La reticulación del péptido de fibrina a la matriz se puede aumentar mediante la adición de más Factor XIII y/o la ampliación de la duración de la reacción. La reticulación también aumenta mediante el uso de la proteína de fusión tAK con péptidos de fibrina añadidos a ambos extremos de la molécula. Opcionalmente se podría añadir una fusión de fibrinógeno-tAK directamente a esta solución para proporcionar más reticulación del indicador.

Reticulación química covalente de tAK a fibrina o fibrinógeno.

[0228] La tAK se puede unir químicamente a la fibrina, péptidos de fibrina o fibrinógeno por una amplia gama de procedimientos familiares para los que trabajan en el sector. Por ejemplo, las preparaciones de proteína purificada para fibrinógeno o fibrina se obtienen de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma). La tAK de *S.acidocaldarius* se prepara como se ha descrito anteriormente. La tAK se derivatiza mediante el reactivo que reacciona a amida SPDP (SPDP (3-(2-piridilditio)-propionato de N-Succinimidilo; empresa química Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fibrina o fibrinógeno también se derivatiza utilizando el mismo protocolo. La tAK derivatizada se reduce por reacción con mercaptoetanol para dar un grupo sulfhidrilo reactivo. Éste se mezcla a continuación con la fibrina derivatizada con SPDP provocando la formación de enlaces covalentes entre las dos moléculas. Las concentraciones de los participantes en la reacción deben determinarse empíricamente siguiendo las directrices dentro de la instrucciones del fabricante para SPDP. tAK-fibrina o fibrinógeno unidos químicamente se pueden utilizar indistintamente o además de la proteína de fusión.

Usos de los indicadores de fibrina-tAK

Uso en un desinfectador de lavadora

[0229] Se prepara un indicador como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, el soporte sólido es una tira rectangular de acero inoxidable de 55 mm x 5 mm x 0,75 mm, que puede estar recubierta en una o ambas superficies. Una o preferiblemente varias tiras indicadoras están colocados dentro de la cámara del desinfectador de la lavadora. De manera óptima, pueden estar colocadas en sitios que pueden ser los más difíciles de limpiar, proporcionando el más alto grado de certeza de que el proceso de lavado ha sido eficaz. Alternativamente, pueden colocarse para controlar la función de los múltiples brazos de pulverización (es decir, donde pueden ser independientes uno de otro). Las tiras indicadoras se agarran a los estantes u otra subestructura de la cámara de desinfección de la lavadora para garantizar que no se mueven durante el tratamiento de lavado. La orientación de los dispositivos de sustitución puede modificarse para proporcionar más información acerca de la eficacia del

proceso de lavado, por ejemplo mediante su colocación de manera que la superficie recubierta está en ángulo recto con la dirección de pulverización de agua.

5 [0230] Se añade la carga de instrumento y se realiza el ciclo de desarrollo estándar. Al final del desarrollo, se extraen los dispositivos de la cámara y se evalúa la presencia de fusión de tAK residual, tal como se describe a continuación, antes de la extracción de los instrumentos y de cualquier tratamiento posterior. Opcionalmente los dispositivos se pueden extraer durante el proceso de lavado al interrumpir el proceso en puntos cuidadosamente definido o al usar una máquina que proporciona un procedimiento de extracción del indicador durante el desarrollo.

10 **Uso en el procedimiento de prueba de un endoscopio**

15 [0231] El dispositivo indicador para el control de un sistema de reprocesamiento de un endoscopio es esencialmente similar al que se describe anteriormente. Se coloca una superficie indicadora de tamaño similar, representativa de cualquiera de los componentes de acero inoxidable dentro de un endoscopio, el tubo de PTFE u otros materiales relevantes, dentro de una cámara tubular. Ésta está unida, a través de tornillos adecuados, accesorios de empuje o bayoneta al extremo frontal del endoscopio o, más preferiblemente, al extremo que hace contacto con los tejidos del paciente. Se coloca dentro de la unidad de reprocesamiento del endoscopio y los extremos del tubo del endoscopio y el dispositivo indicador están acoplados a los puertos de la unidad. El proceso se ejecuta como es habitual y el dispositivo indicador se extrae al final del desarrollo para el análisis, antes del procesado posterior o el retorno del endoscopio a su uso.

Medios para evaluar el rendimiento de limpieza

25 [0232] El dispositivo indicador se extrae al final del proceso de prueba. La tira indicadora se coloca entonces en un tubo reactivo con ADP, luciferina y luciferasa, añadidos de forma simultánea, leyéndose la señal en un luminómetro de mano en 2 minutos.

Ejemplo 21 - Preparación de la fusión tAK-Sup35

30 [0233] Se generan clones que contienen el dominio N-terminal de Sup35 de *Saccharomyces cerevisiae* fusionado a cualquiera de los extremos N- o C-terminal, o ambos extremos, de adenilato quinasas de cualquiera de *S.acidocaldarius* o *T.maritima* mediante técnicas de manipulación de ADN convencionales. Todos los clones se transfieren como fragmentos NdeI-Sall en el vector de expresión pMTL1015 y se verifican sus secuencias. Las construcciones de expresión se usan para transformar las cepas de expresión BL21 o RV308 y desarrollar material en condiciones de fermentación a gran escala, pero con aireación mínima.

40 [0234] La expresión y purificación de una fusión tAK-Sup35 es esencialmente igual que para las fusiones de péptido de fibrina descritas en el Ejemplo 20, excepto que el uso de la etapa de desnaturalización térmica (Etapa 4) no es parte del protocolo de purificación. De manera breve, la pasta celular del fermentador se resuspende en tampón A, y se lisa por sonicación. El residuo celular se extrae (no se utiliza tratamiento térmico habitualmente para este tipo de fusiones) y el sobrenadante se usa para la purificación en columna tal como se describe en el Ejemplo 20.

45 [0235] En ciertas condiciones de crecimiento, las proteínas de fusión pueden ser insolubles, siendo aparente como cuerpos de inclusión dentro de las células. En este caso, los sedimentos celulares se preparan y se lisan de la misma manera, pero la fracción insoluble resultante, que contiene los cuerpos de inclusión, se recogen por centrifugación. Este material se lava en un tampón (por ejemplo, PBS) que contiene Triton X100 (hasta concentraciones del 5%). Después de cada lavado, el sedimento que contiene las proteínas de fusión se separa por centrifugación. Después de 5 lavados, los cuerpos de inclusión se resolubilizan en PBS que contiene urea 8 M y se agitan suavemente durante un máximo de 30 minutos. Cualquier material insoluble residual se separa por centrifugación. El material solubilizado con urea se dializa contra hasta 5 x 10 volúmenes de PBS para eliminar la urea y permitir que las proteínas de fusión se replieguen. Opcionalmente, la urea puede eliminarse más rápidamente por pulverización de la preparación solubilizada con urea a través de una aguja de calibre fino en 100 volúmenes de PBS o tampón A agitados rápidamente, tal como se utiliza para la purificación. Se deja que el material repose a temperatura ambiente con agitación durante un máximo de 30 minutos antes de su procesamiento posterior.

55 [0236] La purificación posterior de las fusiones se lleva a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 20. El sobrenadante de las células lisadas o los cuerpos de inclusión solubilizados y replegados se carga en una columna de flujo rápido Blue Sepharose equilibrada previamente. Después de un lavado intenso en tampón A y, posteriormente, en tampón de lavado, la proteína se eluye utilizando tampón B. Las fracciones máximas se determinan por análisis SDS-PAGE y ensayo de la enzima. Las fracciones se agrupan a continuación y se dializan en PBS.

Conversión de tAK Sup35 a una forma de amiloide

[0237] Las fusiones Sup35-Tak cuando se ensamblan en fibrillas son más representativas de las proteínas amiloides, tales como priones, que son moléculas clave contra las que evaluar la eficacia de los procesos de descontaminación.

5 [0238] La forma amiloide de las fusiones Sup35-Tak se genera mediante el replegamiento de la proteína soluble purificada o mediante la modificación de las condiciones usadas para la diálisis de las preparaciones de cuerpos de inclusión resolubilizados con urea. En el primer caso, se induce un cambio conformacional mediante la exposición de las proteínas de fusión a las condiciones de alrededor de pH 4 (por ejemplo, mediante diálisis en una solución adecuadamente tamponada a pH 7,4 que contiene opcionalmente hasta 1 M de NaCl). En el segundo caso, las proteínas de fusión resolubilizadas con urea 8 M/PBS se dializan durante 6-12 horas a temperatura ambiente contra urea 2 M, NaCl 300 mM, en PBS (pH 7,4). Alternativamente, se puede inducir la fibrilización mediante diálisis frente a Tris 20 mM pH 8,0 EDTA 10 mM, en condiciones de incubación similares. Opcionalmente, las proteínas de fusión se pueden incorporar en las fibrillas que contienen Sup35 normal. Esto se consigue mediante la mezcla de las fusiones con Sup35 no fusionada expresada de la misma manera, a relaciones entre 1:1 y 1:10 de fusión:Sup35.

15 **Deposición de fusiones tAK-Sup35 sobre soporte sólido.**

[0239] La deposición de las fibrillas sobre un soporte sólido se efectúa mediante la adsorción simple de proteínas en un tampón adecuado (por ejemplo, PBS pH 7,4 tampón de bicarbonato pH 9,6) en presencia de altos niveles de NaCl. El uso de superficies cargadas o prerrecubiertas (por ejemplo, plásticos recubiertos con poli-L-lisina) es útil para proporcionar superficies que pueden unirse de manera más eficaz a las proteínas de fusión. Opcionalmente, las fibrillas se pueden depositar en un portador adecuado, tal como sacarosa (hasta 1%), mucina de cerdo (hasta 0,5%), o albúmina (hasta 1 mg/ml).

25 **Superposición de suciedad de prueba**

[0240] Una suciedad de prueba (matriz biológica) se superpone sobre la preparación amiloide adherida sobre la superficie tal como se ha descrito anteriormente.

30 [0241] Las matrices biológicas adecuadas en las que se incluye el indicador de amiloide incluyen por ejemplo, mucina al 0,5%, con o sin albúmina, una suciedad de prueba comercial (tal como la fabricada por Browne) o cualquiera de las suciedades de prueba identificadas en los documentos de guía expedidos por los comités de normas nacionales e internacionales (por ejemplo, suciedad de Edimburgo, tal como se detalla en HTM 01/01 (Reino Unido).

35 **Ensamblaje de fibrillas de amiloide en la suciedad de ensayo**

[0242] Dada la capacidad de los amiloides de autoensamblarse en matrices complejas, es posible que la fusión amiloide-tAK se mezcle con componentes de suciedad antes de la formación de fibrillas y el posterior depósito sobre las superficies. Esto proporciona más opciones para los indicadores en los que las fibrillas de amiloide pueden mezclarse y entrelazarse con otros componentes de suciedad proporcionando un tipo diferente de matriz que puede ser más difícil de eliminar de las superficies.

45 **Uso del indicador de tAK-Sup35 para evaluar la eliminación de priones de las superficies en un proceso de lavado**

[0243] Se prepara un indicador como se ha descrito anteriormente como fibrillas y se seca sobre una superficie de acero en presencia de mucina al 0,5%. El indicador se coloca dentro de la cámara de un desinfectador de lavadora en localizaciones predeterminadas. Se añade la carga de instrumento. El proceso se inicia de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se registra cualquier proceso finalizado. Al final del proceso, y antes de que cualquier instrumento se extraiga de la máquina, se extraen los dispositivos indicadores y se evalúan como se describe en el Ejemplo 20.

55 **Uso del indicador tAK-Sup35 para la evaluación de la inactivación de priones en un proceso basado en proteasas**

[0244] Se preparan indicadores como se ha descrito anteriormente, como fibrillas con una alta relación de Sup35 libre:Sup35-Tak (en exceso de 5:1) y se depositan sobre tiras de soporte sólido en presencia de suciedad Edimburgo. Los dispositivos indicadores se insertan en un baño de preremollo que contiene prion Prionzyme® recién hecho (Genencor International) con tratamiento de inactivación (a 60°C, pH 12). Las tiras indicadoras se sujetan al lado de la bañera de manera que los extremos de los indicadores están dentro de la masa del líquido. Se añaden los instrumentos según se requiera y se procesan durante 30 minutos. Los dispositivos indicadores se extraen de la bañera al final del proceso, antes de la extracción de los instrumentos, y se evalúan como se describe en el Ejemplo 20.

65 **Uso del indicador de tAK Sup35 para un proceso oxidativo destinado a destruir priones.**

[0245] Un indicador como se ha descrito anteriormente como fibrillas usando sólo Sup35-Tak, y se deposita sobre una superficie de acero inoxidable (opcionalmente en presencia de sacarosa al 0,1% p/v). El indicador se une a la parte interior de la tapa de un recipiente Genesis®, en el cual los instrumentos están preparados para el procesamiento y se cierra la tapa. El recipiente se inserta en la cámara de carga de un procesador adecuado para la estimulación oxidativa (por ejemplo, esterilizador de ozono 125L; TSO₃ o una tecnología de peróxido de hidrógeno en fase vapor, tal como la descrita en los documentos publicados por Fichet et al 2004; Lancet) y el proceso se desarrolla de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al final del proceso, el recipiente Génesis se saca de la cámara y los dispositivos indicadores se extraen y procesan como se describe en el Ejemplo 20.

Ejemplo 22 - Detección de una quinasa reportera en una muestra debido a una infección; uso para un ensayo rápido de infección en una muestra de paciente

[0246] Se presentó un paciente en la clínica con sospecha de infección del patógeno intracelular obligado *Burkholderia pseudomallei*. Se extrajo una muestra de sangre y se dispersó en un tampón que contenía 1 M de urea más 5 µM de Ap4A. La muestra se ensayó mediante la adición de reactivo ADP y luciferina/luciferasa, se incubó durante 2 minutos y se midió la emisión de luz en un luminómetro de mano. La señal generada es directamente proporcional a la cantidad de *B. pseudomallei* en la muestra de sangre.

Detección de una quinasa reportera en una muestra debido a una infección; usor para un ensayo rápido de infección en modelos celulares

[0247] El estudio de los patógenos bacterianos intracelulares se complica por la necesidad de hacerlos crecer en sistemas de cultivo de células de mamíferos. La medición de células viables requiere el cultivo posterior o reinfección en células huésped de mamífero, ambos procedimientos consumen mucho tiempo. Un ensayo rápido, tal como el proporcionado por la invención, es de gran valor para proporcionar información que puede ser usado en tiempo real para determinar los resultados de un experimento.

[0248] Se incubó un aislado adecuada de *B. pseudomallei* con un modelo de cultivo de células permisivas capaz de soportar el crecimiento de las bacterias dentro de la célula. El cultivo se desarrolló durante un período de tiempo apropiado para establecer la infección.

[0249] Las células se aislaron por centrifugación y se lisaron mediante resuspensión en un tampón que contenía Triton X-100 al 1%, Ap4A 5 µM. Se añadió un reactivo de detección que contenía ADP, luciferina y luciferasa y se incubó durante 5 minutos. La emisión de luz se leyó en un luminómetro de placas de 96 pocillos. La cantidad de señal generada es proporcional al número de células de *B. psudomallei* viables dentro del cultivo celular. Opcionalmente este procedimiento de ensayo rápido se puede extender para medir los efectos de las vacunas o medicamentos que reducen el número de células viables en el cultivo celular.

[0250] Por ejemplo, los anticuerpos producidos en un paciente inmunizado con una vacuna prototipo de *B. pseudomallei* se mezclan con los organismos antes de la adición al cultivo de células permisivas.

[0251] Después de un período de incubación suficiente para permitir la captación de microorganismos no neutralizados, las células se lavan y se incuban durante un período de tiempo suficiente para establecer la infección. Las células se lavan a continuación y se lisan como se describió anteriormente, de nuevo en presencia de inhibidor. La señal medida por la adición simultánea de ADP, luciferina y luciferasa es proporcional a la cantidad de microorganismos no neutralizados, dando una medida de la eficacia de la vacuna y/o la respuesta inmune generada en un individuo vacunado. Dichos procedimientos son adecuados para cribado de alto rendimiento.

[0252] En otro ejemplo, los cultivos de células infectadas se establecen como se ha descrito anteriormente. Una vez establecida la infección, se utilizan antibióticos para tratar el cultivo infectado, con el objetivo expreso de matar las bacterias dentro de las células huésped. Después de aplicar los antibióticos, los cultivos se incuban durante un tiempo suficiente para que el antibiótico tenga su efecto. Las células se lisan en presencia de inhibidor como se ha descrito anteriormente y se cuantifica el número de células viables mediante la medición de la quinasa reportera, mediante la adición de ADP, luciferina y luciferasa.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0253]

<110> Health Protection Agency

<120> sistema rápido de detección de bioluminiscencia

<130> P31981WO-MRM

ES 2 588 181 T3

<150> GB 0900151.2
 <151> 2009-01-07
 <160> 84
 5 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 195
 10 <212> PRT
 <213> Sulfolobus solfataricus
 <400> 1
 15 Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Thr Thr
 1 5 10 15
 20 Val Leu Ser Phe Ala Asp Lys Ile Leu Thr Glu Lys Gly Ile Ser His
 20 20 25 30
 25 Lys Ile Val Asn Tyr Gly Asp Tyr Met Leu Asn Thr Ala Leu Lys Glu
 35 35 40 45
 30 Gly Tyr Val Lys Ser Arg Asp Glu Ile Arg Lys Leu Gln Ile Glu Lys
 50 55 60
 35 Gln Arg Glu Leu Gln Ala Leu Ala Ala Arg Arg Ile Val Glu Asp Leu
 65 70 75 80
 40 Ser Leu Leu Gly Asp Glu Gly Ile Gly Leu Ile Asp Thr His Ala Val
 85 90 95
 45 Ile Arg Thr Pro Ala Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Arg His Val Ile
 100 105 110
 50 Glu Val Leu Ser Pro Lys Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys
 115 120 125
 55 Ile Ile Leu Glu Arg Gln Lys Arg Asp Ser Ser Arg Ala Arg Thr Asp
 130 135 140
 60 Tyr Ser Asp Thr Ala Val Ile Asn Glu Val Ile Gln Phe Ala Arg Tyr
 145 150 155 160
 65 Ser Ala Met Ala Ser Ala Val Leu Val Gly Ala Ser Val Lys Val Val
 165 170 175
 70 Val Asn Gln Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Ser Glu Ile Ile Asn
 180 185 190
 75 Ser Leu Met
 195
 <210> 2
 <211> 194

ES 2 588 181 T3

<212> PRT
<213> Sulfolobus acidocaldarius

<400> 2

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

Met Lys

55

<210> 3
<211> 197
<212> PRT
<213> Sulfolobus tokodaii

60

<400> 3

65 Met Ser Lys Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly
1 5 10 15

ES 2 588 181 T3

Lys Thr Thr Val₂₀ Leu Ser Lys Val₂₅ Lys Glu Ile Leu Glu Glu₃₀ Lys Lys
 5 Ile Asn Asn₃₅ Lys Ile Val Asn Tyr₄₀ Gly Asp Tyr Met₄₅ Leu Met Thr Ala
 10 Met Lys₅₀ Leu Gly Tyr Val₅₅ Asn Asn Arg Asp Glu₆₀ Met Arg Lys Leu Pro
 15 Val₆₅ Glu Lys Gln Lys Gln₇₀ Leu Gln Ile Glu Ala₇₅ Ala Arg Gly Ile Ala₈₀
 20 Asn Glu Ala Lys₈₅ Glu Gly Gly Asp Gly₉₀ Leu Phe Ile Asp Thr₉₅ His
 25 Ala Val Ile Arg₁₀₀ Thr Pro Ser Gly Tyr₁₀₅ Leu Pro Gly Leu Pro₁₁₀ Lys Tyr
 30 Val Ile Glu₁₁₅ Glu Ile Asn Pro Arg₁₂₀ Val Ile Phe Leu Leu₁₂₅ Glu Ala Asp
 35 Pro Lys Val₁₃₀ Ile Leu Asp Arg₁₃₅ Gln Lys Arg Asp Thr₁₄₀ Ser Arg Ser Arg
 40 Ser Asp Tyr Ser Asp Glu₁₅₀ Arg Ile Ile Ser Glu₁₅₅ Thr Ile Asn Phe Ala₁₆₀
 45 Arg Tyr Ala Ala Met₁₆₅ Ala Ser Ala Val₁₇₀ Leu Val Gly Ala Thr Val₁₇₅ Lys
 50 Ile Val Ile Asn₁₈₀ Val Glu Gly Asp Pro₁₈₅ Ala Val Ala Ala Asn₁₉₀ Glu Ile
 55 Ile Asn Ser₁₉₅ Met Leu
 <210> 4
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus furiosus
 <400> 4
 60 Met Pro Phe Val₅ Val₅ Ile Ile Thr Gly₁₀ Ile Pro Gly Val₁₅ Gly Lys Ser
 65 Thr Ile Thr Arg₂₀ Leu Ala Leu Gln Arg₂₅ Thr Lys Ala Lys Phe₃₀ Arg Leu
 Ile Asn Phe₃₅ Gly Asp Leu Met Phe₄₀ Glu Glu Ala Val₄₅ Lys Ala Gly Leu
 Val Lys His Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Lys Ile Gln Arg

ES 2 588 181 T3

	50		55		60												
5	Glu 65	Leu	Gln	Met	Lys	Ala 70	Ala	Lys	Lys	Ile	Thr 75	Glu	Met	Ala	Lys	Glu 80	
10	His	Pro	Ile	Leu	Val 85	Asp	Thr	His	Ala	Thr 90	Ile	Lys	Thr	Pro	His 95	Gly	
15	Tyr	Met	Leu	Gly 100	Leu	Pro	Tyr	Glu	Val 105	Val	Lys	Thr	Leu	Asn 110	Pro	Asn	
20	Phe	Ile	Val 115	Ile	Ile	Glu	Ala	Thr 120	Pro	Ser	Glu	Ile	Leu 125	Gly	Arg	Arg	
25	Leu	Arg 130	Asp	Leu	Lys	Arg	Asp 135	Arg	Asp	Val	Glu	Thr 140	Glu	Glu	Gln	Ile	
30	Gln 145	Arg	His	Gln	Asp	Leu 150	Asn	Arg	Ala	Ala 155	Ala	Ile	Ala	Tyr	Ala	Met 160	
35	His	Ser	Asn	Ala	Leu 165	Ile	Lys	Ile	Ile	Glu 170	Asn	His	Glu	Asp	Lys 175	Gly	
40	Leu	Glu	Glu	Ala 180	Val	Asn	Glu	Leu	Val 185	Lys	Ile	Leu	Asp	Leu 190	Ala	Val	
45	Asn	Glu	Tyr 195	Ala													
50	<210>	5															
	<211>	196															
	<212>	PRT															
	<213>	Pyrococcus horikoshii															
55	<400>	5															
60	Met 1	Pro	Phe	Val 5	Val	Ile	Ile	Thr	Gly 10	Pro	Gly	Val	Gly	Lys 15	Ser		
65	Thr	Ile	Thr	Lys 20	Leu	Ala	Leu	Gln	Arg 25	Thr	Arg	Ala	Lys	Phe 30	Lys	Leu	
70	Ile	Asn	Phe 35	Gly	Asp	Leu	Met	Phe 40	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys 45	Leu	Lys	Leu	
75	Val	Lys 50	His	Arg	Asp	Glu	Met 55	Arg	Lys	Leu	Pro	Leu 60	Glu	Val	Gln	Arg	
80	Glu 65	Leu	Gln	Met	Asn	Ala 70	Ala	Lys	Lys	Ile	Ala 75	Glu	Met	Ala	Lys	Asn 80	
85	Tyr	Pro	Ile	Leu	Leu 85	Asp	Thr	His	Ala	Thr 90	Ile	Lys	Thr	Pro	His 95	Gly	

ES 2 588 181 T3

Tyr Leu Leu Gly Leu Pro Tyr Glu Val Ile Lys Ile Leu Asn Pro Asn
 5 100 105 110
 Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg
 10 115 120 125
 Leu Arg Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile
 15 130 135 140
 Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala Ala Ile Thr Tyr Ala Met
 20 145 150 155
 His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly
 25 165 170 175
 Leu Glu Glu Ala Val Asn Glu Leu Val Lys Ile Leu Asp Leu Ala Val
 30 180 185 190
 Lys Glu Tyr Ala
 35 195
 <210> 6
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus abyssi
 40 <400> 6
 Met Ser Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser
 45 1 5 10 15
 Thr Ile Thr Arg Leu Ala Leu Gln Arg Thr Lys Ala Lys Phe Lys Leu
 50 20 25 30
 Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Val Lys Ala Gly Leu
 55 35 40 45
 Val Asn His Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Glu Ile Gln Arg
 60 50 55 60
 Asp Leu Gln Met Lys Val Ala Lys Lys Ile Ser Glu Met Ala Arg Gln
 65 65 70 75 80
 Gln Pro Ile Leu Leu Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly
 70 85 90 95
 Tyr Leu Leu Gly Leu Pro Tyr Glu Val Ile Lys Thr Leu Asn Pro Asn
 75 100 105 110
 Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg
 80 115 120 125

ES 2 588 181 T3

Leu Arg Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile
 130 135 140
 5
 Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Ala Met
 145 150 155 160
 10 His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly
 165 170 175
 15 Leu Glu Glu Ala Val Asn Glu Leu Val Glu Ile Leu Asp Leu Ala Val
 180 185 190
 20 Lys Glu Tyr Ala
 195
 <210> 7
 <211> 192
 <212> PRT
 25 <213> Methanococcus thermolithotrophicus
 <400> 7
 30 Met Lys Asn Lys Leu Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Gly
 1 5 10 15
 35 Thr Thr Ile Thr Gln Lys Ala Met Glu Lys Leu Ser Glu Glu Gly Ile
 20 25 30
 40 Asn Tyr Lys Met Val Asn Phe Gly Thr Val Met Phe Glu Val Ala Gln
 35 40 45
 45 Glu Glu Asn Leu Val Glu Asp Arg Asp Gln Met Arg Lys Leu Asp Pro
 50 55 60
 50 Asp Thr Gln Lys Arg Ile Gln Lys Leu Ala Gly Arg Lys Ile Ala Glu
 65 70 75 80
 55 Met Val Lys Glu Ser Pro Val Val Val Asp Thr His Ser Thr Ile Lys
 85 90 95
 60 Thr Pro Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Val Trp Val Leu Asn Glu
 100 105 110
 65 Leu Asn Pro Asp Ile Ile Ile Val Val Glu Thr Ser Gly Asp Glu Ile
 115 120 125
 70 Leu Ile Arg Arg Leu Asn Asp Glu Thr Arg Asn Arg Asp Leu Glu Thr
 130 135 140
 75 Thr Ala Gly Ile Glu Glu His Gln Ile Met Asn Arg Ala Ala Ala Met
 145 150 155 160

ES 2 588 181 T3

Thr Tyr Gly Val Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Ile Gln Asn Lys
 165 170 175
 5 Asn Asn Leu Leu Asp Tyr Ala Val Glu Glu Leu Ile Ser Val Leu Arg
 180 185 190
 <210> 8
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Methanococcus voltae
 <400> 8
 15 Met Lys Asn Lys Val Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Ser
 1 5 10 15
 20 Thr Thr Ser Ser Gln Leu Ala Met Asp Asn Leu Arg Lys Glu Gly Val
 20 25 30
 25 Asn Tyr Lys Met Val Ser Phe Gly Ser Val Met Phe Glu Val Ala Lys
 35 40 45
 30 Glu Glu Asn Leu Val Ser Asp Arg Asp Gln Met Arg Lys Met Asp Pro
 50 55 60
 35 Glu Thr Gln Lys Arg Ile Gln Lys Met Ala Gly Arg Lys Ile Ala Glu
 65 70 75 80
 40 Met Ala Lys Glu Ser Pro Val Ala Val Asp Thr His Ser Thr Val Ser
 85 90 95
 45 Thr Pro Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Trp Val Leu Asn Glu
 100 105 110
 50 Leu Asn Pro Asp Leu Ile Ile Val Val Glu Thr Thr Gly Asp Glu Ile
 115 120 125
 55 Leu Met Arg Arg Met Ser Asp Glu Thr Arg Val Arg Asp Leu Asp Thr
 130 135 140
 60 Ala Ser Thr Ile Glu Gln His Gln Phe Met Asn Arg Cys Ala Ala Met
 145 150 155 160
 65 Ser Tyr Gly Val Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Val Gln Asn Arg
 165 170 175
 70 Asn Gly Leu Leu Asp Gln Ala Val Glu Glu Leu Thr Asn Val Leu Arg
 180 185 190
 <210> 9
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Methanococcus jannaschii

ES 2 588 181 T3

<400> 9

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

55 <210> 10
<211> 191
<212> PRT
<213> Methanopyrus kandleri

60 <400> 10

Met Gly Tyr Val Ile Val Ala Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Ala Thr
1 5 10 15
65 Thr Val Thr Thr Glu Ala Val Lys Glu Leu Glu Gly Tyr Glu His Val
20 25 30

ES 2 588 181 T3

Asn Tyr Gly Asp Val Met Leu Glu Ile Ala Lys Glu Glu Gly Leu Val
 35 40 45
 5
 Glu His Arg Asp Glu Ile Arg Lys Leu Pro Ala Glu Lys Gln Arg Glu
 50 55 60
 10
 Ile Gln Arg Leu Ala Ala Arg Arg Ile Ala Lys Met Ala Glu Glu Lys
 65 70 75 80
 15
 Glu Gly Ile Ile Val Asp Thr His Cys Thr Ile Lys Thr Pro Ala Gly
 85 90 95
 20
 Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ile Trp Val Leu Glu Glu Leu Gln Pro Asp
 100 105 110
 Val Ile Val Leu Ile Glu Ala Asp Pro Asp Glu Ile Met Met Arg Arg
 115 120 125
 25
 Val Lys Asp Ser Glu Glu Arg Gln Arg Asp Tyr Asp Arg Ala His Glu
 130 135 140
 30
 Ile Glu Glu His Gln Lys Met Asn Arg Met Ala Ala Met Ala Tyr Ala
 145 150 155 160
 35
 Ala Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Ile Glu Asn His Asp Asp Arg
 165 170 175
 40
 Leu Glu Glu Ala Val Arg Glu Phe Val Glu Thr Val Arg Ser Leu
 180 185 190
 <210> 11
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Methanotorris igneus
 <400> 11
 50
 Met Lys Asn Lys Val Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Gly
 1 5 10 15
 55
 Thr Thr Leu Thr Gln Lys Thr Ile Glu Lys Leu Lys Glu Glu Gly Ile
 20 25 30
 60
 Glu Tyr Lys Met Val Asn Phe Gly Thr Val Met Phe Glu Val Ala Lys
 35 40 45
 65
 Glu Glu Gly Leu Val Glu Asp Arg Asp Gln Met Arg Lys Leu Asp Pro
 50 55 60
 70
 Asp Thr Gln Lys Arg Ile Gln Lys Leu Ala Gly Arg Lys Ile Ala Glu
 65 70 75 80

ES 2 588 181 T3

Met Ala Lys Glu Ser₈₅ Asn Val Ile Val Asp₉₀ Thr His Ser Thr Val₉₅ Lys

5 Thr Pro Lys Gly₁₀₀ Tyr Leu Ala Gly Leu₁₀₅ Pro Ile Trp Val₁₁₀ Leu Glu Glu

10 Leu Asn Pro₁₁₅ Asp Ile Ile Val Ile₁₂₀ Val Glu Thr Ser Ser₁₂₅ Asp Glu Ile

15 Leu Met₁₃₀ Arg Arg Leu Gly Asp₁₃₅ Ala Thr Arg Asn Arg₁₄₀ Asp Ile Glu Leu

20 Thr Ser Asp Ile Asp Glu₁₅₀ His Gln Phe Met Asn₁₅₅ Arg Cys Ala Ala Met₁₆₀

Ala Tyr Gly Val Leu₁₆₅ Thr Gly Ala Thr Val₁₇₀ Lys Ile Ile Lys Asn₁₇₅ Arg

25 Asp Gly Leu Leu₁₈₀ Asp Lys Ala Val Glu₁₈₅ Glu Leu Ile Ser Val₁₉₀ Leu Lys

30 <210> 12
<211> 197
<212> PRT
<213> Pyrobaculum aerophilum

35 <400> 12

Met Lys Ile Val Ile₅ Val Ala Leu Pro Gly₁₀ Ser Gly Lys Thr Thr Ile₁₅

40 Leu Asn Phe Val₂₀ Lys Gln Lys Leu Pro₂₅ Asp Val Lys Ile Val₃₀ Asn Tyr

45 Gly Asp Val₃₅ Met Leu Glu Ile Ala₄₀ Lys Lys Arg Phe Gly₄₅ Ile Gln His

50 Arg Asp₅₀ Glu Met Arg Lys Lys₅₅ Ile Pro Val Asp Glu₆₀ Tyr Arg Lys Val

55 Gln Glu Glu Ala Ala Glu₇₀ Tyr Ile Ala Ser Leu₇₅ Thr Gly Asp Val Ile₈₀

Ile Asp Thr His Ala₈₅ Ser Ile Lys Ile Gly₉₀ Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly₉₅

60 Leu Pro Asp Arg₁₀₀ Ile Ile Ser Lys Leu₁₀₅ Lys Pro Asp Val Ile₁₁₀ Leu Leu

65 Leu Glu Tyr₁₁₅ Asp Pro Lys Val Ile₁₂₀ Leu Glu Arg Arg Lys₁₂₅ Lys Asp Pro

Asp Arg Phe Arg Asp Leu Glu Ser Glu Glu Glu Ile Glu Met His Gln

ES 2 588 181 T3

5 Val Tyr Leu Glu₁₈₀ Lys Thr Gln Pro Val₁₈₅ Ile Asp Tyr Tyr Gly₁₉₀ Lys Lys
 Gly Ile Leu₁₉₅ Lys Arg Val Asp Gly₂₀₀ Thr Ile Gly Ile Asp₂₀₅ Asn Val Val
 10 Ala Glu Val₂₁₀ Leu Lys Ile Ile₂₁₅ Gly Trp Ser Asp Lys₂₂₀
 15 <210> 14
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Aeropyrum pernix
 20 <400> 14
 Met Lys Val Arg His₅ Pro Phe Lys Val Val₁₀ Val Val Thr Gly Val₁₅ Pro
 25 Gly Val Gly Lys₂₀ Thr Thr Val Ile Lys₂₅ Glu Leu Gln Gly Leu₃₀ Ala Glu
 30 Lys Glu Gly₃₅ Val Lys Leu His Ile₄₀ Val Asn Phe Gly Ser₄₅ Phe Met Leu
 35 Asp Thr₅₀ Ala Val Lys Leu Gly₅₅ Leu Val Glu Asp Arg₆₀ Asp Lys Ile Arg
 40 Thr Leu Pro Leu Arg Arg₇₀ Gln Leu Glu Leu Gln₇₅ Arg Glu Ala Ala Lys₈₀
 Arg Ile Val Ala Glu₈₅ Ala Ser Lys Ala Leu₉₀ Gly Gly Asp Gly Val₉₅ Leu
 45 Ile Ile Asp Thr₁₀₀ His Ala Leu Val Lys₁₀₅ Thr Val Ala Gly Tyr₁₁₀ Trp Pro
 50 Gly Leu Pro₁₁₅ Lys His Val Leu Asp Glu Leu Lys Pro Asp₁₂₅ Met Ile Ala
 55 Val Val₁₃₀ Glu Ala Ser Pro Glu Glu Val Ala Ala Arg₁₄₀ Gln Ala Arg Asp
 Thr Thr Arg Tyr Arg Val₁₅₀ Asp Ile Gly Gly Val₁₅₅ Glu Gly Val Lys Arg₁₆₀
 60 Leu Met Glu Asn Ala₁₆₅ Arg Ala Ala Ser Ile₁₇₀ Ala Ser Ala Ile Gln Tyr
 65 Ala Ser Thr Val₁₈₀ Ala Ile Val Glu Asn₁₈₅ Arg Glu Gly Glu Ala₁₉₀ Ala Lys

ES 2 588 181 T3

Ala Ala Glu Glu Leu Leu Arg Leu Ile Lys Asn Leu
 195 200

5
 <210> 15
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Archaeoglobus fulgidus

10
 <400> 15

Met Asn Leu Ile Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Gln
 1 5 10 15

Ala Lys Arg Val Ser Glu Lys Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Ser Thr Gly
 20 25 30

Asp Met Leu Arg Glu Ala Val Ala Lys Gly Thr Glu Leu Gly Lys Lys
 35 40 45

Ala Lys Glu Tyr Met Asp Lys Gly Glu Leu Val Pro Asp Glu Val Val
 50 55 60

Ile Gly Ile Val Lys Glu Arg Leu Gln Gln Pro Asp Cys Glu Lys Gly
 65 70 75 80

Phe Ile Leu Asp Gly Phe Pro Arg Thr Leu Ala Gln Ala Glu Ala Leu
 85 90 95

Asp Glu Met Leu Lys Glu Leu Asn Lys Lys Ile Asp Ala Val Ile Asn
 100 105 110

Val Val Val Pro Glu Glu Glu Val Val Lys Arg Ile Thr Tyr Arg Arg
 115 120 125

Thr Cys Arg Asn Cys Gly Ala Val Tyr His Leu Ile Tyr Ala Pro Pro
 130 135 140

Lys Glu Asp Asn Lys Cys Asp Lys Cys Gly Gly Glu Leu Tyr Gln Arg
 145 150 155 160

Asp Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg Glu Arg Tyr Arg Val Tyr Lys Gln
 165 170 175

Asn Thr Glu Pro Leu Ile Asp Tyr Tyr Arg Lys Lys Gly Ile Leu Tyr
 180 185 190

Asp Val Asp Gly Thr Lys Asp Ile Glu Gly Val Trp Lys Glu Ile Glu
 195 200 205

Ala Ile Leu Glu Lys Ile Lys Ser
 210 215

ES 2 588 181 T3

<210> 16
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus abyssi
 5
 <400> 16
 Met Asn Ile Leu Ile Phe Gly Pro Pro Gly Ser Gly Lys Ser Thr Gln
 1 5 10
 Ala Arg Arg Ile Thr Glu Arg Tyr Gly Leu Thr Tyr Ile Ala Ser Gly
 20 25 30
 Asp Ile Ile Arg Ala Glu Ile Lys Ala Arg Thr Pro Leu Gly Ile Glu
 35 40 45
 Met Glu Arg Tyr Leu Ser Arg Gly Asp Leu Ile Pro Asp Thr Ile Val
 50 55 60
 Asn Thr Leu Ile Ile Ser Lys Leu Arg Arg Val Arg Glu Asn Phe Ile
 65 70 75 80
 Met Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Pro Glu Gln Val Ile Thr Leu Glu Asn
 85 90 95
 Tyr Leu Tyr Asp His Gly Ile Lys Leu Asp Val Ala Ile Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Ile Thr Lys Glu Glu Ser Val Arg Arg Ile Ser Gly Arg Arg Ile Cys
 115 120 125
 Ser Lys Cys Gly Ala Val Tyr His Val Glu Phe Asn Pro Pro Lys Val
 130 135 140
 Pro Gly Lys Cys Asp Ile Cys Gly Gly Glu Leu Ile Gln Arg Pro Asp
 145 150 155 160
 Asp Arg Pro Glu Ile Val Glu Lys Arg Tyr Asp Ile Tyr Ser Lys Asn
 165 170 175
 Met Glu Pro Ile Ile Lys Phe Tyr Gln Lys Gln Gly Ile Tyr Val Arg
 180 185 190
 Ile Asp Gly His Gly Ser Ile Asp Glu Val Trp Glu Arg Ile Arg Pro
 195 200 205
 Leu Leu Asp Tyr Ile Tyr Asn Gln Glu Asn Arg Arg
 210 215 220
 <210> 17
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
<223> El aminoácido "X" puede ser K o E.

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (75)..(75)
<223> El aminoácido "X" puede ser T o A.

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (98)..(98)
<223> El aminoácido "X" puede ser M o L.

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (157)..(157)
<223> El aminoácido "X" puede ser A, o un residuo hidrófobo pequeño (por ejemplo, I o L) o un residuo hidrófobo grande (por ejemplo, F), que aumenta la estabilidad térmica de la enzima.

<400> 17

30 Met Pro Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser
1 5 10 15

35 Thr Ile Thr Arg Leu Ala Leu Gln Arg Thr Lys Ala Lys Phe Arg Leu
20 25 30

Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Val Lys Ala Gly Leu
35 40 45

40 Val Lys His Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Xaa Ile Gln Arg
50 55 60

45 Glu Leu Gln Met Lys Ala Ala Lys Lys Ile Xaa Glu Met Ala Lys Glu
65 70 75 80

50 His Pro Ile Leu Val Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly
85 90 95

55 Tyr Xaa Leu Gly Leu Pro Tyr Glu Val Val Lys Thr Leu Asn Pro Asn
100 105 110

Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg
115 120 125

60 Leu Arg Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile
130 135 140

65 Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala Ala Ile Xaa Tyr Ala Met
145 150 155 160

ES 2 588 181 T3

His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly
 165 170 175
 5 Leu Glu Glu Ala Val Asn Glu Leu Val Lys Ile Leu Asp Leu Ala Val
 180 185 190
 10 Asn Glu Tyr Ala
 195
 15 <210> 18
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> sintética
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (47)..(47)
 <223> El aminoácido "X" puede ser G, o puede ser cualquier otro residuo que
 aumenta la estabilidad térmica de la enzima.
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (157)..(157)
 <223> El aminoácido "X" puede ser A, o un residuo hidrófobo pequeño (por
 ejemplo I o L) o un residuo hidrófobo grande (por ejemplo F), que aumenta la
 estabilidad térmica de la enzima.
 35 <400> 18
 Met Pro Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser
 1 5 10 15
 40 Thr Ile Thr Lys Leu Ala Leu Gln Arg Thr Arg Ala Lys Phe Lys Leu
 20 25 30
 45 Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Leu Lys Leu Xaa Leu
 35 40 45
 50 Val Lys His Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Glu Val Gln Arg
 50 55 60
 55 Glu Leu Gln Met Asn Ala Ala Lys Lys Ile Ala Glu Met Ala Lys Asn
 65 70 75 80
 60 Tyr Pro Ile Leu Leu Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly
 85 90 95
 65 Tyr Leu Leu Gly Leu Pro Tyr Glu Val Ile Lys Ile Leu Asn Pro Asn
 100 105 110
 65 Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg
 115 120 125

ES 2 588 181 T3

Leu Arg Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile
 130 135 140
 5 Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala Ala Ile Xaa Tyr Ala Met
 145 150 155 160
 10 His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly
 165 170 175
 15 Leu Glu Glu Ala Val Asn Glu Leu Val Lys Ile Leu Asp Leu Ala Val
 180 185 190
 Lys Glu Tyr Ala
 195
 20 <210> 19
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> sintética
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (103)..(103)
 <223> El aminoácido "X" puede ser A o M.
 35 <400> 19
 Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr
 1 5 10 15
 40 Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gln Gly Ile Asn Asn
 20 25 30
 45 Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu
 35 40 45
 50 Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys
 50 55 60
 55 Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile
 85 90 95
 60 Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Xaa Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr
 100 105 110
 65 Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile
 115 120 125

ES 2 588 181 T3

Ile Leu Ser Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr
130 135 140

5 Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala
145 150 155 160

10 Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val
165 170 175

15 Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser
180 185 190

Met Lys

20
<210> 20
<211> 403
<212> PRT
<213> Thermotoga maritima

25
<400> 20

30 Met Arg Val Leu Val Ile Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ile Lys Tyr Gln
1 5 10 15

35 Leu Ile Glu Met Glu Gly Glu Lys Val Leu Cys Lys Gly Ile Ala Glu
20 25 30

40 Arg Ile Gly Ile Glu Gly Ser Arg Leu Val His Arg Val Gly Asp Glu
35 40 45

45 Lys His Val Ile Glu Arg Glu Leu Pro Asp His Glu Glu Ala Leu Lys
50 55 60

50 Leu Ile Leu Asn Thr Leu Val Asp Glu Lys Leu Gly Val Ile Lys Asp
65 70 75 80

55 Leu Lys Glu Ile Asp Ala Val Gly His Arg Val Val His Gly Gly Glu
85 90 95

60 Arg Phe Lys Glu Ser Val Leu Val Asp Glu Glu Val Leu Lys Ala Ile
100 105 110

65 Glu Glu Val Ser Pro Leu Ala Pro Leu His Asn Pro Ala Asn Leu Met
115 120 125

70 Gly Ile Lys Ala Ala Met Lys Leu Leu Pro Gly Val Pro Asn Val Ala
130 135 140

75 Val Phe Asp Thr Ala Phe His Gln Thr Ile Pro Gln Lys Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Tyr Ala Ile Pro Tyr Glu Tyr Tyr Glu Lys Tyr Lys Ile Arg Arg Tyr

ES 2 588 181 T3

				165					170					175		
5	Gly	Phe	His	Gly 180	Thr	Ser	His	Arg	Tyr 185	Val	Ser	Lys	Arg	Ala 190	Ala	Glu
10	Ile	Leu	Gly 195	Lys	Lys	Leu	Glu	Glu 200	Leu	Lys	Ile	Ile	Thr 205	Cys	His	Ile
15	Gly	Asn 210	Gly	Ala	Ser	Val	Ala 215	Ala	Val	Lys	Tyr	Gly 220	Lys	Cys	Val	Asp
20	Thr 225	Ser	Met	Gly	Phe	Thr 230	Pro	Leu	Glu	Gly	Leu 235	Val	Met	Gly	Thr	Arg 240
25	Ser	Gly	Asp	Leu	Asp 245	Pro	Ala	Ile	Pro	Phe 250	Phe	Ile	Met	Glu	Lys 255	Glu
30	Gly	Ile	Ser	Pro 260	Gln	Glu	Met	Tyr	Asp 265	Ile	Leu	Asn	Lys	Lys 270	Ser	Gly
35	Val	Tyr	Gly 275	Leu	Ser	Lys	Gly	Phe 280	Ser	Ser	Asp	Met	Arg 285	Asp	Ile	Glu
40	Glu	Ala 290	Ala	Leu	Lys	Gly	Asp 295	Glu	Trp	Cys	Lys	Leu 300	Val	Leu	Glu	Ile
45	Tyr 305	Asp	Tyr	Arg	Ile	Ala 310	Lys	Tyr	Ile	Gly	Ala 315	Tyr	Ala	Ala	Ala	Met 320
50	Asn	Gly	Val	Asp	Ala 325	Ile	Val	Phe	Thr	Ala 330	Gly	Val	Gly	Glu	Asn 335	Ser
55	Pro	Ile	Thr	Arg 340	Glu	Asp	Val	Cys	Ser 345	Tyr	Leu	Glu	Phe	Leu 350	Gly	Val
60	Lys	Leu	Asp 355	Lys	Gln	Lys	Asn	Glu 360	Glu	Thr	Ile	Arg	Gly 365	Lys	Glu	Gly
65	Ile	Ile 370	Ser	Thr	Pro	Asp	Ser 375	Arg	Val	Lys	Val	Leu 380	Val	Val	Pro	Thr
70	Asn 385	Glu	Glu	Leu	Met	Ile 390	Ala	Arg	Asp	Thr	Lys 395	Glu	Ile	Val	Glu	Lys 400
75	Ile	Gly	Arg													
80	<210>	21														
85	<211>	478														
90	<212>	PRT														
95	<213>	Pyrococcus horikoshii														

ES 2 588 181 T3

<400> 21

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

ES 2 588 181 T3

5 Asn Met Glu Gly Lys Pro Val Ile Thr Ala Thr Gln Met Leu Val Ser
 275 280 285
 Met Thr Met Glu Lys Val Pro Thr Arg Ala Glu Val Thr Asp Val Ala
 290 295 300
 10 Asn Ala Ile Leu Asp Gly Thr Asp Ala Val Met Leu Ser Glu Glu Thr
 305 310 315 320
 15 Ala Val Gly Lys Phe Pro Ile Glu Ala Val Glu Met Met Ala Arg Ile
 325 330 335
 20 Ala Lys Val Thr Glu Glu Tyr Arg Glu Ser Phe Gly Ile Thr Arg Met
 340 345 350
 25 Arg Glu Phe Leu Glu Gly Thr Lys Arg Gly Thr Ile Lys Glu Ala Ile
 355 360 365
 Thr Arg Ser Ile Ile Asp Ala Ile Cys Thr Ile Gly Ile Lys Phe Ile
 370 375 380
 30 Leu Thr Pro Thr Lys Thr Gly Arg Thr Ala Arg Leu Ile Ser Arg Phe
 385 390 395 400
 35 Lys Pro Lys Gln Trp Ile Leu Ala Phe Ser Thr Arg Glu Lys Val Cys
 405 410 415
 40 Asn Asn Leu Met Phe Ser Tyr Gly Val Tyr Pro Phe Cys Met Glu Glu
 420 425 430 435
 Gly Phe Asn Glu Asn Asp Ile Val Arg Leu Ile Lys Gly Leu Gly Leu
 435 440 445
 45 Val Gly Ser Asp Asp Ile Val Leu Met Thr Glu Gly Lys Pro Ile Glu
 450 455 460
 50 Lys Thr Val Gly Thr Asn Ser Ile Lys Ile Phe Gln Ile Ala
 465 470 475
 55 <210> 22
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Sulfolobus solfataricus
 60 <400> 22
 Met Arg Lys Thr Lys Ile Val Ala Thr Leu Gly Pro Ser Ser Glu Glu
 1 5 10 15
 65 Lys Val Lys Glu Leu Ala Glu Tyr Val Asp Val Phe Arg Ile Asn Phe
 20 25 30

ES 2 588 181 T3

Ala His Gly Asp Glu Thr Ser His Arg Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Arg
35 40 45

5 Thr Tyr Ala Pro Glu Ser Ser Ile Ile Val Asp Leu Pro Gly Pro Lys
50 55 60

10 Leu Arg Leu Gly Glu Leu Lys Glu Pro Ile Glu Val Lys Lys Gly Asp
65 70 75 80

15 Lys Ile Val Phe Ser Gln Lys Asp Gly Ile Pro Val Asp Asp Glu Leu
85 90 95

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

25 Thr Ile Arg Val Arg Val Lys Ser Lys Ala Lys Asp Arg Val Glu Gly
115 120 125

30 Thr Val Ile Glu Gly Gly Ile Leu Leu Ser Arg Lys Gly Ile Asn Ile
130 135 140

35 Pro Asn Val Asn Leu Lys Ser Gly Ile Thr Asp Asn Asp Leu Lys Leu
145 150 155 160

40 Leu Lys Arg Ala Leu Asp Leu Gly Ala Asp Tyr Ile Gly Leu Ser Phe
165 170 175

45 Val Ile Ser Glu Asn Asp Val Lys Lys Val Lys Glu Phe Val Gly Asp
180 185 190

50 Glu Ala Trp Val Ile Ala Lys Ile Glu Lys Ser Glu Ala Leu Lys Asn
195 200 205

55 Leu Thr Asn Ile Val Asn Glu Ser Asp Gly Ile Met Val Ala Arg Gly
210 215 220

60 Asp Leu Gly Val Glu Thr Gly Leu Glu Asn Leu Pro Leu Ile Gln Arg
225 230 235 240

65 Arg Ile Val Arg Thr Ser Arg Val Phe Gly Lys Pro Val Ile Leu Ala
245 250 255

Thr Gln Val Leu Thr Ser Met Ile Asn Ser Pro Ile Pro Thr Arg Ala
260 265 270

Glu Ile Ile Asp Ile Ser Asn Ser Ile Met Gln Gly Val Asp Ser Ile
275 280 285

Met Leu Ser Asp Glu Thr Ala Ile Gly Asn Tyr Pro Val Glu Ser Val
290 295 300

ES 2 588 181 T3

Arg Thr Leu His Asn Ile Ile Ser Asn Val Glu Lys Ser Val Lys His
 305 310 315 320
 5 Arg Pro Ile Gly Pro Leu Asn Ser Glu Ser Asp Ala Ile Ala Leu Ala
 325 330 335
 10 Ala Val Asn Ala Ser Lys Val Ser Lys Ala Asp Val Ile Val Val Tyr
 340 345 350
 15 Ser Arg Ser Gly Asn Ser Ile Leu Arg Val Ser Arg Leu Arg Pro Glu
 355 360 365
 20 Arg Asn Ile Ile Gly Val Ser Pro Asp Pro Arg Leu Ala Lys Lys Phe
 370 375 380
 Lys Leu Cys Tyr Gly Val Ile Pro Ile Ser Ile Asn Lys Lys Met Gln
 385 390 395 400
 25 Ser Ile Asp Glu Ile Ile Asp Val Ser Ala Lys Leu Met Gln Glu Lys
 405 410 415
 30 Ile Lys Asp Leu Lys Phe Lys Lys Ile Val Ile Val Gly Gly Asp Pro
 420 425 430
 35 Lys Gln Glu Ala Gly Lys Thr Asn Phe Val Ile Val Lys Thr Leu Glu
 435 440 445
 40 Gln Gln Lys Lys
 450
 <210> 23
 <211> 466
 <212> PRT
 45 <213> Thermotoga maritima
 <400> 23
 50 Met Arg Ser Thr Lys Ile Val Cys Thr Val Gly Pro Arg Thr Asp Ser
 1 5 10 15
 55 Tyr Glu Met Ile Glu Lys Met Ile Asp Leu Gly Val Asn Val Phe Arg
 20 25 30
 Ile Asn Thr Ser His Gly Asp Trp Asn Glu Gln Glu Gln Lys Ile Leu
 35 40 45
 60 Lys Ile Lys Asp Leu Arg Glu Lys Lys Lys Lys Pro Val Ala Ile Leu
 50 55 60
 65 Ile Asp Leu Ala Gly Pro Lys Ile Arg Thr Gly Tyr Leu Glu Lys Glu
 65 70 75 80

ES 2 588 181 T3

Phe Val Glu Leu Lys₈₅ Glu Gly Gln Ile Phe₉₀ Thr Leu Thr Thr Lys₉₅ Glu
 5 Ile Leu Gly Asn₁₀₀ Glu His Ile Val Ser₁₀₅ Val Asn Leu Ser Ser₁₁₀ Leu Pro
 10 Lys Asp Val₁₁₅ Lys Lys Gly Asp Thr₁₂₀ Ile Leu Leu Ser Asp₁₂₅ Gly Glu Ile
 15 Val Leu₁₃₀ Glu Val Ile Glu Thr₁₃₅ Thr Asp Thr Glu Val₁₄₀ Lys Thr Val Val
 20 Lys Val₁₄₅ Gly Gly Lys Ile₁₅₀ Thr His Arg Arg Gly₁₅₅ Val Asn Val Pro Thr₁₆₀
 25 Ala Asp Leu Ser Val₁₆₅ Glu Ser Ile Thr Asp₁₇₀ Arg Asp Arg Glu Phe₁₇₅ Ile
 30 Arg Lys Pro₁₉₅ Glu Asp Val Leu Lys₂₀₀ Ala Lys Glu Glu Ile₂₀₅ Arg Lys His
 35 Gly Lys₂₁₀ Glu Ile Pro Val Ile₂₁₅ Ser Lys Ile Glu Thr₂₂₀ Lys Lys Ala Leu
 40 Glu Arg Leu Glu Glu Ile₂₃₀ Ile Lys Val Ser Asp₂₃₅ Gly Ile Met Val Ala₂₄₀
 45 Arg Gly Asp Leu Gly₂₄₅ Val Glu Ile Pro Ile₂₅₀ Glu Glu Val Pro Ile₂₅₅ Val
 50 Val Ala Thr₂₇₅ Gln Ile Leu Glu Ser₂₈₀ Met Ile Glu Asn Pro₂₈₅ Phe Pro Thr
 55 Arg Ala₂₉₀ Glu Val Thr Asp Ile₂₉₅ Ala Asn Ala Ile Phe₃₀₀ Asp Gly Ala Asp
 60 Ala Leu Leu Leu Thr Ala₃₁₀ Glu Thr Ala Val Gly₃₁₅ Lys His Pro Leu Glu₃₂₀
 65 Ala Ile Lys Val Leu₃₂₅ Ser Lys Val Ala Lys₃₃₀ Glu Ala Glu Lys Lys₃₃₅ Leu
 70 Glu Phe Phe Arg₃₄₀ Thr Ile Glu Tyr Asp₃₄₅ Thr Ser Asp Ile Ser₃₅₀ Glu Ala

ES 2 588 181 T3

Ile Ser His Ala Cys Trp Gln Leu Ser Glu Ser Leu Asn Ala Lys Leu
 355 360 365

5 Ile Ile Thr Pro Thr Ile Ser Gly Ser Thr Ala Val Arg Val Ser Lys
 370 375 380

10 Tyr Asn Val Ser Gln Pro Ile Val Ala Leu Thr Pro Glu Glu Lys Thr
 385 390 395 400

15 Tyr Tyr Arg Leu Ser Leu Val Arg Lys Val Ile Pro Val Leu Ala Glu
 405 410 415

20 Lys Cys Ser Gln Glu Leu Glu Phe Ile Glu Lys Gly Leu Lys Lys Val
 420 425 430

25 Glu Glu Met Gly Leu Ala Glu Lys Gly Asp Leu Val Val Leu Thr Ser
 435 440 445

30 Gly Val Pro Gly Lys Val Gly Thr Thr Asn Thr Ile Arg Val Leu Lys
 450 455 460

35 Val Asp
 465

<210> 24
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus furiosus
 <400> 24

40 Met Arg Arg Val Lys Leu Pro Ser His Lys Thr Lys Ile Val Ala Thr
 1 5 10 15

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

50 Ala Gly Met Asn Val Ala Arg Ile Asn Phe Ser His Gly Ser Phe Glu
 35 40 45

55 Glu His Ala Arg Val Ile Glu Ile Ile Arg Glu Glu Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

60 Asp Arg Arg Val Ala Ile Leu Ala Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ile Arg
 65 70 75 80

65 Val Gly Glu Ile Lys Gly Gly Tyr Val Glu Leu Lys Arg Gly Glu Lys
 85 90 95

70 Val Ile Leu Thr Thr Lys Asp Val Glu Gly Asp Glu Thr Thr Ile Pro
 100 105 110

75 Val Asp Tyr Lys Gly Phe Pro Asn Leu Val Ser Lys Gly Asp Ile Ile

ES 2 588 181 T3

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

ES 2 588 181 T3

5 Met Tyr Ala Leu Pro Tyr Asp Leu Tyr Glu Lys His Gly Val Arg Lys
 165 170 175
 Tyr Gly Phe His Gly Thr Ser His Lys Tyr Val Ala Glu Arg Ala Ala
 180 185 190
 10 Leu Met Leu Gly Lys Pro Ala Glu Glu Thr Lys Ile Ile Thr Cys His
 195 200 205
 15 Leu Gly Asn Gly Ser Ser Ile Thr Ala Val Glu Gly Gly Lys Ser Val
 210 215 220
 20 Glu Thr Ser Met Gly Phe Thr Pro Leu Glu Gly Leu Ala Met Gly Thr
 225 230 235 240
 25 Arg Cys Gly Ser Ile Asp Pro Ala Ile Val Pro Phe Leu Met Glu Lys
 245 250 255
 30 Glu Gly Leu Thr Thr Arg Glu Ile Asp Thr Leu Met Asn Lys Lys Ser
 260 265 270
 35 Gly Val Leu Gly Val Ser Gly Leu Ser Asn Asp Phe Arg Asp Leu Asp
 275 280 285
 40 Glu Ala Ala Ser Lys Gly Asn Arg Lys Ala Glu Leu Ala Leu Glu Ile
 290 295 300
 45 Phe Ala Tyr Lys Val Lys Lys Phe Ile Gly Glu Tyr Ser Ala Val Leu
 305 310 315 320
 50 Asn Gly Ala Asp Ala Val Val Phe Thr Ala Gly Ile Gly Glu Asn Ser
 325 330 335
 55 Ala Ser Ile Arg Lys Arg Ile Leu Thr Gly Leu Asp Gly Ile Gly Ile
 340 345 350
 60 Lys Ile Asp Asp Glu Lys Asn Lys Ile Arg Gly Gln Glu Ile Asp Ile
 355 360 365
 65 Ser Thr Pro Asp Ala Lys Val Arg Val Phe Val Ile Pro Thr Asn Glu
 370 375 380
 Glu Leu Ala Ile Ala Arg Glu Thr Lys Glu Ile Val Glu Thr Glu Val
 385 390 395 400
 Lys Leu Arg Ser Ser Ile Pro Val
 405
 <210> 26
 <211> 585

ES 2 588 181 T3

	<212>	ADN						
	<213>	Sulfolobus acidocaldarius						
	<400>	26						
5		atgaagattg	gtattgtaac	tggaattcct	ggtgtaggga	aaagtactgt	cttggctaaa	60
		gttaaagaga	tattggataa	tcaagggtata	aataacaaga	tcataaatta	tggagatttt	120
		atgttagcaa	cagcattaa	attaggctat	gctaaagata	gagacgaaat	gagaaaatta	180
		tctgtagaaa	agcagaagaa	attgcagatt	gatgctgcta	aaggatagc	tgaagaggca	240
		agagcaggtg	gagaaggata	tctgttcata	gatacgcacg	ctgtgatagc	tacaccctct	300
10		ggatatttac	ctggtttacc	gtcatatgta	attacagaaa	taaatccgtc	tgttatcttt	360
		ttactggaag	ctgatcctaa	gataatatta	tcaaggcaaa	agagagatac	aacaaggaat	420
		agaaatgatt	atagtgcga	atcagttata	ttagaaaacca	taaacttcgc	tagatatgca	480
		gctactgctt	ctgcagattt	agccggttct	actgttaagg	taattgtaaa	cgtggaagga	540
		gatcctagta	tagcagctaa	tgagataata	aggcttatga	agtaa		585
15	<210>	27						
	<211>	585						
	<212>	ADN						
	<213>	Secuencia artificial						
20	<220>							
	<223>	sintética						
	<400>	27						
25		atgaaaatcg	gtatcgttac	cggtatcccg	ggtgttggta	aatctaccgt	tctggctaaa	60
		gttaaagaaa	tcctggacaa	ccagggtatc	aacaacaaaa	tcatacaacta	cgggtgacttc	120
		atgctggcta	ccgctctgaa	actgggttac	gctaaagacc	gtgacgaaat	gcgtaaactg	180
		tctgttgaaa	aacagaaaaa	actgcagatc	gacgctgcta	aaggatcgc	tgaagaagct	240
		cgtgctggtg	gtgaaggtta	cctgttcac	gacaccacg	ctgttatccg	taccctgctt	300
30		ggttacctgc	cggtctgccc	gtcttacggt	atcaccgaaa	tcaaccctgc	tgttatcttc	360
		ctgctggaag	ctgacccgaa	aatcatcctg	tctcgtcaga	aacgtgacac	caccctgtaac	420
		cgtaacgact	actctgacga	atctgttatc	ctggaaaacca	tcaacttcgc	tcgttacgct	480
		gctaccgctt	ctgctgttct	ggctgggtct	accgttaaag	ttatcgtaa	cgttgaaggt	540
		gaccctgcta	tcgctgctaa	cgaaatcatc	cgttctatga	aatag		585
35	<210>	28						
	<211>	663						
	<212>	ADN						
	<213>	Thermotoga maritima						
40	<400>	28						
		atgatggcgt	accttgtctt	tctaggacct	ccagggtcag	gaaaaggaac	ctacgcaaag	60
		agattgcagg	aaataacggg	gattcctcat	atatccaccg	gtgacatttt	cagggacatt	120
		gtaaaaaaag	agaacgacga	gcttgggaaa	aagataaaag	agatcatgga	aaggggagaa	180
45		ctcgttccgg	acgaactcgt	gaacgagggt	gtgaaaagaa	gactctcaga	aaaagattgt	240
		gaaagaggat	tcatactgga	cggctatcca	agaaccgttg	ctcaggcgga	attcctcgac	300
		ggctttttga	aaactcaaaa	caaagagctc	acggctgctg	tactctttga	agttcctgag	360
		gaagtggctg	ttcagaggct	cacggccaga	aggatctgcc	cgaaatgtgg	aagaatttac	420
		aatttgattt	cgctccctcc	aaaagaagac	gaactgtgcg	atgattgtaa	agtgaagctc	480
50		gttcagagag	aagacgacaa	agaagaaaca	gtgagacaca	gatacaaggt	ttatctcgaa	540
		aagacacagc	cagtgattga	ttactacgat	aaaaagggca	ttctcaaaccg	agtggatggt	600
		accatagga	tagacaacgt	gatcgtgtaa	gtgttaaaga	taataggggtg	gagtgataaa	660
		tga						663
55	<210>	29						
	<211>	660						
	<212>	ADN						
	<213>	Secuencia artificial						
60	<220>							
	<223>	sintética						
	<400>	29						
65		atgatggcct	atctggtttt	tcttgggtcca	ccggggggcag	gcaaagggtac	atatgcgaaa	60
		cgtttacagg	aaatcaccgg	catcccgcac	attagcacgg	gcgacatttt	tcgtgatatt	120
		gtcaaaaagg	aaaatgacga	attaggtaag	aaaattaaag	aaattatgga	gcgcgggcag	180
		ttggtgccgg	acgaactggt	gaatgaagtt	gtcaaacgctc	ggctgtctga	aaaggattgc	240

ES 2 588 181 T3

	gaacgtggct	ttatTTTTgga	cggttaccCG	cgtacagtag	ctcaggcaga	gtttctcgac	300
	ggcttCctga	agactcagaa	taaggagTta	acggctgcgg	tcctgttcga	ggtgcctgaa	360
	gaggtggTcg	ttcagcgtct	gaccgcgcgg	cgtatctgCC	cgaagtgtgg	tcgtatttac	420
5	aacctgattt	cacttCctcc	aaaagaagat	gaactgtgtg	atgactgcaa	agtaaaactg	480
	gtgcaacgcg	aagatgataa	agaggaaact	gtgcgccatc	gctacaaaagt	atatctggaa	540
	aaaacccaac	cggttatcga	ttattatgat	aaaaaaggca	ttttgaaacg	cgttgatggg	600
	accatcggca	tcgataacgt	gattgccgaa	gttctcaaaa	tcattggggtg	gagtgataaa	660
	<210>	30					
10	<211>	651					
	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia artificial					
	<220>						
15	<223>	Sintética					
	<400>	30					
	atgaacctga	ttttcctggg	tccgcctggg	gcaggcaaaG	gcacccaggc	gaaacgtgtg	60
	tctgaaaagt	acggtatccc	gcagattagt	accggcgata	tgctgcgtga	agcggttgct	120
20	aagggTaccg	aactggggaa	aaaggcgaaa	gaatatatgg	acaaagggga	acttgttccg	180
	gatgaagtag	ttattggaat	cgtgaaagaa	cgCctccagc	aaccggattg	tgagaagggc	240
	tttattctgg	acggttttcc	gcgtacgtta	gcacaagccg	aagctctgga	cgaaatgta	300
	aaagaattga	ataagaaaat	tgacgccgta	atcaacgtgg	tcgtaccgga	agaggaagtt	360
	gtcaagcgta	ttacctatcg	tcgcacttgc	cgcaattgCG	gcgccgtgta	ccatctcatt	420
25	tatgcacctc	caaaagagga	taataaatgt	gataaatgCG	gcggtgagct	ttatcagcgt	480
	gatgacgata	aagaagagac	agtccgcgag	cgttaccgtg	tgtataaaca	gaacacagag	540
	ccattgatcg	attattaccg	taaaaaggga	atcctgtatg	atgtggatgg	tactaaagac	600
	atcgaaggag	tttggaagaa	aattgaggcg	attctggaaa	aaattaaaag	c	651
30	<210>	31					
	<211>	194					
	<212>	PRT					
	<213>	Sulfolobus acidocaldarius					
35	<400>	31					
	Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr						
	1 5 10 15						
40	Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gln Gly Ile Asn Asn						
	20 25 30						
45	Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu						
	35 40 45						
50	Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys						
	50 55 60						
55	Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala						
	65 70 75 80						
	Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile						
	85 90 95						
60	Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr						
	100 105 110						
65	Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile						
	115 120 125						

ES 2 588 181 T3

Ile Leu Ser Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr
130 135 140

5 Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala
145 150 155 160

10 Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val
165 170 175

15 Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser
180 185 190

Met Lys

20 <210> 32
<211> 220
<212> PRT
<213> Thermotoga maritima

25 <400> 32

Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly
1 5 10 15

30 Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His Ile Ser
20 25 30

35 Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp Glu Leu
35 40 45

40 Gly Lys Lys Ile Lys Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp
50 55 60

45 Glu Leu Val Asn Glu Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys Asp Cys
65 70 75 80

50 Glu Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala Gln Ala
85 90 95

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

60 Ala Val Leu Phe Glu Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg Leu Thr
115 120 125

65 Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu Ile Ser
130 135 140

Leu Pro Pro Lys Glu Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu
145 150 155 160

70 Val Gln Arg Glu Asp Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg Tyr Lys
165 170 175

ES 2 588 181 T3

Val Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys
180 185 190

5 Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Ile
195 200 205

10 Ala Glu Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys
210 215 220

15 <210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> sustrato de transglutaminasa
<400> 33

25 Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Gly Gly
1 5 10

30 <210> 34
<211> 204
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia de proteína de adenilato quinasa termoestable de Sulfolobus
acidcaldarius fusionaa en el extremo N con una secuencia de sustrato de
transglutaminasa (Factor XIII)

<400> 34

40 Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Gly Gly Lys Ile Gly Ile Val
1 5 10 15

45 Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Val Leu Ala Lys Val Lys
20 25 30

50 Glu Ile Leu Asp Asn Gln Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly
35 40 45

55 Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Arg
50 55 60

60 Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys Leu Gln Ile
65 70 75 80

65 Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly
85 90 95

70 Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr
100 105 110

Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val

ES 2 588 181 T3

Ile Leu Ser Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr
130 135 140

5 Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala
145 150 155 160

10 Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val
165 170 175

15 Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser
180 185 190

Met Lys Gly Gly Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu
195 200

20 <210> 36
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia de proteína de adenilato quinasa termoestable de Sulfolobus
acidocaldarius fusionada en el extremo N y extremo C con una secuencia de
sustrato de transglutaminasa (Factor XIII)

30 <400> 36

35 Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Gly Gly Lys Ile Gly Ile Val
1 5 10 15

Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Val Leu Ala Lys Val Lys
20 25 30

40 Glu Ile Leu Asp Asn Gln Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly
35 40 45

45 Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Arg
50 55 60

50 Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys Leu Gln Ile
65 70 75 80

55 Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly
85 90 95

60 Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr
100 105 110

Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val
115 120 125

65 Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile Ile Leu Ser Arg Gln Lys
130 135 140

ES 2 588 181 T3

Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Val Ile
 145 150 155 160

5 Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val
 165 170 175

10 Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val Asn Val Glu Gly Asp Pro
 180 185 190

15 Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser Met Lys Gly Gly Asn Gln
 195 200 205

Glu Gln Val Ser Pro Leu
 210

20 <210> 37
 <211> 704
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de ADN de la secuencia de sustrato de transglutaminasa
 (Factor XIII) fusionada al extremo 5' de adenilato quinasa de Thermotoga
 maritima.

30 <400> 37
 atgaatcaag aacaagtcag cccgctgggc ggcacatcgc cctatctggt ttttcttggt 60
 ccaccggggg caggcaaagg tacctatgcg aaacgtttac aggaaatcac cggcatcccg 120
 cacattagca cgggcgacat ttttcgtgat attgtcaaaa aggaaaatga cgaattaggt 180
 35 aagaaaatta aagaaattat ggagcgcggc gagttggtgc cggacgaact ggtgaatgaa 240
 gttgtcaaac gtcggctgtc tgaaaaggat tgcaaacgtg gctttatfff ggacggttac 300
 ccgcgtacag tagctcaggc agagtttctc gacggcttcc tgaagactca gaataaggag 360
 ttaacggctg cggtcctggt cgaggtgcct gaagaggtgg tcgttcagcg tctgaccgcg 420
 cggcgtatct gcccaagtg tggtcgtatt tacaacctga tttcacttcc tccaaaagaa 480
 40 gatgaactgt gtgatgactg caaagtaaaa ctgggtgcaac gcgaagatga taaagaggaa 540
 actgtgccc atcgtctaaa agtataatctg gaaaaaaccc aaccggttat cgattattat 600
 gataaaaaag gcattttgaa acgcgttgat gggacccatcg gcatcgataa cgtgattgcc 660
 gaagttctca aaatcattgg gtggagtgat aaataggctcg acgc 704

45 <210> 38
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de proteína de adenilato quinasa de Thermotoga maritima
 fusionada al extremo N-terminal con una secuencia de sustrato de
 transglutaminasa (Factor XIII).

55 <400> 38
 Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Gly Gly Ile Ile Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

60 Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Tyr Ala Lys Arg
 20 25 30

65 Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His Ile Ser Thr Gly Asp Ile Phe
 35 40 45

ES 2 588 181 T3

Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys
 50 55 60

5 Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp Glu Leu Val Asn Glu
 65 70 75 80

10 Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys Asp Cys Glu Arg Gly Phe Ile
 85 90 95

15 Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala Gln Ala Glu Phe Leu Asp Gly
 100 105 110

20 Phe Leu Lys Thr Gln Asn Lys Glu Leu Thr Ala Ala Val Leu Phe Glu
 115 120 125

25 Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg Leu Thr Ala Arg Arg Ile Cys
 130 135 140

30 Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu Ile Ser Leu Pro Pro Lys Glu
 145 150 155 160

35 Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu Val Gln Arg Glu Asp
 165 170 175

40 Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg Tyr Lys Val Tyr Leu Glu Lys
 180 185 190

45 Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys Gly Ile Leu Lys Arg
 195 200 205

50 Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Ile Ala Glu Val Leu Lys
 210 215 220

55 Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys
 225 230

<210> 39
 <211> 696
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de la secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII) fusionada al extremo 3' de adenilato quinasa de Thermotoga maritima.

<400> 39
 60 atgatggcct atctggtttt tcttggtcca ccgggggcag gcaaaggtag ctatgcgaaa 60
 cgtttacagg aaatcaccgg catccgcac attagcacgg gcgacatttt tcgtgatatt 120
 gtcaaaaagg aaaatgacga attaggtaag aaaattaaag aaattatgga gcgcggcgag 180
 ttggtgccgg acgaactggt gaatgaagtt gtcaaacgct ggctgtctga aaaggattgc 240
 gaacgtggct ttatthttgga cggttaccgg cgtacagtag ctcaggcaga gtttctcgac 300
 65 ggcttcctga agactcagaa taaggagta acggctgcgg tcctgttcga ggtgcctgaa 360
 gaggtggtcg ttcagcgtct gaccgcgagg cgtatctgcc cgaagtgtgg tcgtatttac 420
 aacctgattt cacttcctcc aaaagaagat gaactgtgtg atgactgcaa agtaaaactg 480
 gtgcaacgcg aagatgataa agaggaaact gtgcgccatc gctacaaagt atatctggaa 540

ES 2 588 181 T3

```

aaaacccaac cggttatcga ttattatgat aaaaaaggca ttttgaaacg cgttgatggg      600
accatcggca tcgataacgt gattgccgaa gttctcaaaa tcattgggtg gagtgataaa      660

ctgggdcggca atcaagaaca agtcagcccg ctgtaa                                696

5
<210> 40
<211> 231
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de proteína de adenilato quinasa de Thermotoga maritima
15 fusionada al extremo C-terminal con una secuencia de sustrato de
transglutaminasa (Factor XIII).

<400> 40

20 Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly
1 5 10 15

25 Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His Ile Ser
20 25 30

30 Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp Glu Leu
35 40 45

35 Gly Lys Lys Ile Lys Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp
50 55 60

40 Glu Leu Val Asn Glu Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys Asp Cys
65 70 75 80

45 Glu Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala Gln Ala
85 90 95

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

55 Ala Val Leu Phe Glu Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg Leu Thr
115 120 125

60 Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu Ile Ser
130 135 140

65 Leu Pro Pro Lys Glu Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu
145 150 155 160

70 Val Gln Arg Glu Asp Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg Tyr Lys
165 170 175

75 Val Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys
180 185 190

80 Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Ile
195 200 205

```

ES 2 588 181 T3

Ala Glu Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys Leu Gly Gly Asn
 210 215 220

5

Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu
 225 230

10

<210> 41
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de ADN de la secuencia de sustrato de transglutaminasa
 (Factor XIII) fusionada a los extremo 3' y 5' de adenilato quinasa de
 Thermotoga maritima.

20

<400> 41

atgaatcaag	aacaagtcag	cccgcctgggc	ggcatcatcg	cctatctggt	ttttcttggt	60
ccaccggggg	caggcaaagg	tacctatgcg	aaacgtttac	aggaaatcac	cggcatcccg	120
cacattagca	cgggcgacat	ttttcgtgat	attgtcaaaa	aggaaaatga	cgaattaggt	180
aagaaaatta	aagaaattat	ggagcgcggc	gagttggtgc	cggacgaact	ggtgaatgaa	240
gttgtcaaac	gtcggctgtc	tgaaaaggat	tgcgaacgtg	gctttatfff	ggacggttac	300
ccgcgtacag	tagctcaggc	agagtttctc	gacggcttcc	tgaagactca	gaataaggag	360
ttaacggctg	cggtcctggt	cgaggtgcct	gaagaggtgg	tcgttcagcg	tctgaccgcg	420
cggcgtatct	gcccgaagtg	tggtcgtatt	tacaacctga	tttcaacttc	tccaaaagaa	480
gatgaactgt	gtgatgactg	caaagtaaaa	ctggtgcaac	gcgaagatga	taaagaggaa	540
actgtgcgcc	atcgttacia	agtatatctg	gaaaaaaccc	aaccggttat	cgattattat	600
gataaaaaag	gcattttgaa	acgcgttgat	gggaccatcg	gcatcgataa	cgtgattgcc	660
gaagttctca	aatcattggg	gtggagtgat	aaactgggcg	gcaatcaaga	acaagtcagc	720
ccgctgtaa						729

35

<210> 42
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Secuencia de proteína de adenilato quinasa de Thermotoga maritima
 fusionada al extremo N-terminal y C-terminal con una secuencia de sustrato de
 transglutaminasa (Factor XIII).

45

<400> 42

Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Gly Gly Ile Ile Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

50

Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Tyr Ala Lys Arg
 20 25 30

55

Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His Ile Ser Thr Gly Asp Ile Phe
 35 40 45

60

Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys
 50 55 60

65

Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp Glu Leu Val Asn Glu
 65 70 75 80

ES 2 588 181 T3

	ttgactggct	ctgtggataa	gagaactatt	gagaaatattg	aaagagaagc	caaggatgca	900									
	ggcagacaag	gttggctactt	gtcatgggtc	atggatacca	acaaagaaga	aagaaatgat	960									
5	ggtaagacta	tcgaagttgg	taaggcctac	tttgaaactg	aaaaaaggcg	ttataccata	1020									
	ttggatgctc	ctggtcataa	aatgtacgtt	tccgagatga	tcggtgggtc	ttctcaagct	1080									
	gatgttggtg	ttttgggtcat	ttccgccaga	aagggtgagt	acgaaaccgg	ttttgagaga	1140									
	ggtgggtcaaa	ctcgtgaaca	cgccctattg	gccaagaccc	aaggtgttaa	taagatgggt	1200									
	gtcgtcgtaa	ataagatgga	tgaccaaac	gttaactggt	ctaaggaacg	ttacgaccaa	1260									
10	tgtgtgagta	atgtcagcaa	tttcttga				1288									
	<210>	44														
	<211>	429														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
15	<220>															
	<223>	Secuencia de proteína de Sup35 completa de Saccharomyces cerevisiae														
	<400>	44														
20	Asp	Ser	Asn	Gln	Gly	Asn	Asn	Gln	Gln	Asn	Tyr	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gln
	1				5					10					15	
25	Asn	Gly	Asn	Gln	Gln	Gln	Gly	Asn	Asn	Arg	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Gln	Ala
				20					25					30		
30	Tyr	Asn	Ala	Gln	Ala	Gln	Pro	Gly	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Gln
			35					40					45			
35	Gly	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gly	Tyr	Gln	Gln	Tyr	Asn	Pro	Asp
		50					55					60				
40	Ala	Gly	Tyr	Gln	Gln	Gln	Tyr	Asn	Pro	Gln	Gly	Gly	Tyr	Gln	Gln	Tyr
	65					70					75					80
45	Asn	Pro	Gln	Gly	Gly	Tyr	Gln	His	Gln	Phe	Asn	Pro	Gln	Gly	Gly	Arg
				85						90					95	
50	Gly	Asn	Tyr	Lys	Asn	Phe	Asn	Tyr	Asn	Asn	Asn	Leu	Gln	Gly	Tyr	Gln
				100					105					110		
55	Ala	Gly	Phe	Gln	Pro	Gln	Ser	Gln	Gly	Met	Ser	Leu	Asn	Asp	Phe	Gln
			115					120					125			
60	Lys	Gln	Gln	Lys	Gln	Ala	Ala	Pro	Lys	Pro	Lys	Lys	Thr	Leu	Lys	Leu
		130					135					140				
65	Val	Ser	Ser	Ser	Cys	Ile	Lys	Leu	Ala	Asn	Ala	Thr	Lys	Lys	Val	Asp
	145					150					155					160
70	Thr	Lys	Pro	Ala	Glu	Ser	Asp	Lys	Lys	Glu	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Glu
					165					170					175	
75	Thr	Lys	Glu	Pro	Thr	Lys	Glu	Pro	Thr	Lys	Val	Glu	Glu	Pro	Val	Lys
			180						185					190		

ES 2 588 181 T3

Lys Glu Glu Lys Pro Val Gln Thr Glu Glu Lys Thr Glu Glu Lys Ser
 195 200 205
 5 Glu Leu Pro Lys Val Glu Asp Leu Lys Ile Ser Glu Ser Thr His Asn
 210 215 220
 10 Thr Asn Asn Ala Asn Val Thr Ser Ala Asp Ala Leu Ile Lys Glu Gln
 225 230 235
 15 Glu Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Val Asn Asp Met Phe Gly Gly Lys
 245 250
 20 Asp His Val Ser Leu Ile Phe Met Gly His Val Asp Ala Gly Lys Ser
 260 265 270
 25 Thr Met Gly Gly Asn Leu Leu Tyr Leu Thr Gly Ser Val Asp Lys Arg
 275 280 285
 30 Trp Tyr Leu Ser Trp Val Met Asp Thr Asn Lys Glu Glu Arg Asn Asp
 305 310 315 320
 35 Gly Lys Thr Ile Glu Val Gly Lys Ala Tyr Phe Glu Thr Glu Lys Arg
 325 330 335
 40 Arg Tyr Thr Ile Leu Asp Ala Pro Gly His Lys Met Tyr Val Ser Glu
 340 345 350
 45 Met Ile Gly Gly Ala Ser Gln Ala Asp Val Gly Val Leu Val Ile Ser
 355 360 365
 50 Ala Arg Lys Gly Glu Tyr Glu Thr Gly Phe Glu Arg Gly Gly Gln Thr
 370 375 380
 55 Arg Glu His Ala Leu Leu Ala Lys Thr Gln Gly Val Asn Lys Met Val
 385 390 400
 60 Val Val Val Asn Lys Met Asp Asp Pro Thr Val Asn Trp Ser Lys Glu
 405 410 415
 65 Arg Tyr Asp Gln Cys Val Ser Asn Val Ser Asn Phe Leu
 420 425
 <210> 45
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de ADN de sup35N (dominio N-terminal) de codones
 predispuestos para la expresión óptima en E. coli

ES 2 588 181 T3

<400> 45
atggactcta accagggttaa caaccagcag aactaccagc agtactctca gaacggtaac 60
5 cagcagcagg gtaacaaccg ttaccagggt taccaggctt acaacgctca ggctcagccg 120
ggtggtggtt actaccagaa ctaccagggt tactccggat atcaacaggg tggttaccaa 180
caatataatc cagacgctgg ttaccagcag cagtacaacc cgcagggtgg ttaccagcag 240
tacaaccgc aaggcggata tcaacaccag ttcaatccgc agggtggtcg tggtactac 300
aaaaacttca actacaacaa caacctgcag ggttaccagg ctggttaa 348

10
<210> 46
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Secuencia de proteína de sup35N (dominio N-terminal)

20
<400> 46
Met Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr Gln Gln Tyr Ser
1 5 10 15

25
Gln Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn Asn Arg Tyr Gln Gly Tyr Gln
20 25 30

30
Ala Tyr Asn Ala Gln Ala Gln Pro Gly Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn Tyr
35 40 45

35
Gln Gly Tyr Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro
50 55 60

40
Asp Ala Gly Tyr Gln Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln Gln
65 70 75 80

45
Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln His Gln Phe Asn Pro Gln Gly Gly
85 90 95

50
Arg Gly Asn Tyr Lys Asn Phe Asn Tyr Asn Asn Asn Leu Gln Gly Tyr
100 105 110

55
Gln Ala Gly
115

60
<210> 47
<211> 941
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65
<220>
<223> Secuencia de ADN de adenilato quinasa de Sulfolobus acidcaldarius con
codones predispuestos en E. coli fusionada en el extremo N con el dominio N-
terminal de Sup35 de Saccharomyces cerevisiae

70
<400> 47
atggactcta accagggttaa caaccagcag aactaccagc agtactctca gaacggtaac 60
75 cagcagcagg gtaacaaccg ttaccagggt taccaggctt acaacgctca ggctcagccg 120
ggtggtggtt actaccagaa ctaccagggt tactccgggtt atcagcaagg tggctaccaa 180
caatataatc cagacgctgg ctatcaacag caatataatc ctcagggtgg ttaccagcag 240
tacaaccgc aaggcggtta tcaacaccag ttcaatccgc agggtggtcg tggtactac 300

ES 2 588 181 T3

```

aaaaacttca actacaacaa caacctgcag ggttaccagg ctggaattat gaagatcggc 360
attgtgaccg gcattccggg cgttggcaaa agcaccgttc tggcaaaggt gaaggagatc 420
ctggacaacc agggcattaa taacaaaatt attaattatg gtgattttat gctggcgacc 480
gcgctgaagc tgggctacgc aaaagatcgt gacgaaatgc gcaaactgag cgtggaaaaa 540
5 cagaagaagc tgcagattga tgcggcgaag ggcattgcgg aagaggcacg cgcgggcggc 600
gaaggctacc tgtttatcga taccatgcg gtgatccgca ccccgagcgg ttatctgccg 660
ggcctgccgt cttacgtgat tacggaaatc aacccgagcg ttatttttct gctggaggca 720
gatccgaaga ttattctgag ccgccagaag cgcgatacca cccgcaaccg caacgattat 780
agcgacgaaa gcgttatcct ggagaccatc aactttgcgc gctatgcggc aaccgcgagc 840
10 gcggttctgg caggctctac cgtaaagtg atcgtgaacg tggagggtga tccaagcatc 900
gcggcgaacg aaatcattcg cagcatgaaa taagtcgacg c 941

```

```

15 <210> 48
    <211> 310
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

```

```

20 <220>
    <223> Secuencia de proteína de adenilato quinasa de Sulfolobus acidcaldarius
    fusionada en el extremo N con el dominio N-terminal de sup35 de Saccharomyces
    cerevisiae

```

```

25 <400> 48
    Met Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr Gln Gln Tyr Ser
    1 5 10 15
30 Gln Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn Asn Arg Tyr Gln Gly Tyr Gln
    20 25 30
35 Ala Tyr Asn Ala Gln Ala Gln Pro Gly Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn Tyr
    35 40 45
40 Gln Gly Tyr Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro
    50 55 60
45 Asp Ala Gly Tyr Gln Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln Gln
    65 70 75 80
50 Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln His Gln Phe Asn Pro Gln Gly Gly
    85 90 95
55 Arg Gly Asn Tyr Lys Asn Phe Asn Tyr Asn Asn Asn Leu Gln Gly Tyr
    100 105 110
60 Gln Ala Gly Ile Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val
    115 120 125
65 Gly Lys Ser Thr Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gln
    130 135 140
70 Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr
    145 150 155 160
75 Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu
    165 170 175

```

ES 2 588 181 T3

Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile
 180 185 190

5 Ala Glu Glu Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr
 195 200 205

10 His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser
 210 215 220

15 Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala
 225 230 235 240

20 Asp Pro Lys Ile Ile Leu Ser Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn
 245 250 255

25 Arg Asn Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe
 260 265 270

30 Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val
 275 280 285

35 Lys Val Ile Val Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu
 290 295 300

Ile Ile Arg Ser Met Lys
 305 310

<210> 49
 <211> 947
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de adenilato quinasa de codones predispuestos en E. coli de Sulfolobus acidocaldarius fusionada en el extremo C con el dominio N-terminal de Sup35 de Saccharomyces cerevisiae

<400> 49
 atgaagatcg gcattgtgac cggcattccg ggcgttggca aaagcaccgt tctggcaaag 60
 50 gtgaaggaga tcctggacaa ccagggcatt aataacaaaa ttattaatta tggtgatttt 120
 atgctggcga ccgcgctgaa gctgggctac gcaaaagatc gtgacgaaat gcgcaaactg 180
 agcgtggaaa aacagaagaa gctgcagatt gatgcggcga agggcattgc ggaagaggca 240
 cgcgcgggcg gcgaaggcta cctgtttatc gatacccatg cggatgatccg caccgagc 300
 ggttatctgc cgggcctgcc gtcttacgtg attacggaaa tcaacccgag cgttattttt 360
 55 ctgctggagg cagatccgaa gattattctg agccgccaga agcgcgatac caccgcaac 420
 cgcaacgatt atagcgacga aagcgttatc ctggagacca tcaactttgc gcgctatgcg 480
 gcaaccgca gcgcggttct ggcaggctct accgttaaag tgatcgtgaa cgtggagggt 540
 gatccaagca tcgcggcgaa cgaatcatt cgcagcatga aacagtcgag tatggactct 600
 aaccaggta acaaccagca gaactaccg gaactactc agaacggtaa ccagcagcag 660
 60 ggtaacaacc gttaccaggg ttaccaggct tacaacgctc aggtcagcc gggtggtggt 720
 tactaccaga actaccaggg ttactccggt taccagcaag gtggctacca acaatataat 780
 ccagacgctg gctatcaaca gcaatataat cctcagggtg gttaccagca gtacaaccg 840
 caaggcgggt atcaacacca gttcaatccg cagggtggtc gtggtacta caaaaacttc 900
 aactacaaca acaacctgca gggttaccag gctggttaag tcgacgc 947

<210> 50
 <211> 312
 <212> PRT

ES 2 588 181 T3

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia de proteína de adenilato quinasa de Sulfolobus acidcaldarius fusionada en el extremo N con el dominio C-terminal de Sup35 de Saccharomyces cerevisiae

<400> 50

10 Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr
 1 5 10 15

15 Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gln Gly Ile Asn Asn
 20 25 30

20 Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu
 35 40 45

Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys
 50 55 60

25 Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala
 65 70 75 80

30 Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile
 85 90 95

35 Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr
 100 105 110

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

Ile Leu Ser Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr
 130 135 140

45 Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala
 145 150 155 160

50 Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val
 165 170 175

55 Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser
 180 185 190

60 Met Lys Gln Ser Ser Met Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn
 195 200 205

Tyr Gln Gln Tyr Ser Gln Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn Asn Arg
 210 215 220

65 Tyr Gln Gly Tyr Gln Ala Tyr Asn Ala Gln Ala Gln Pro Gly Gly Gly
 225 230 235 240

ES 2 588 181 T3

Tyr Tyr Gln Asn Tyr Gln Gly Tyr Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr
 245 250 255

5 Gln Gln Tyr Asn Pro Asp Ala Gly Tyr Gln Gln Gln Tyr Asn Pro Gln
 260 265 270

10 Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln His Gln Phe
 275 280 285

15 Asn Pro Gln Gly Gly Arg Gly Asn Tyr Lys Asn Phe Asn Tyr Asn Asn
 290 295 300

20 Asn Leu Gln Gly Tyr Gln Ala Gly
 305 310

<210> 51
 <211> 1011
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de ADN de Sup35N fusionada en el extremo 5' de adenilato
 quinasa de Thermotoga maritima.

30 <400> 51
 atggactcta accagggtaa caaccagcag aactaccagc agtactctca gaacggtaac 60
 cagcagcagg gtaacaaccg ttaccagggg taccaggctt acaacgctca ggctcagccg 120
 ggtggtggtt actaccagaa ctaccagggg tactccgggt atcagcaagg tggctaccaa 180
 35 caatataatc cagacgctgg ctatcaacag caatataatc ctcaggggtg ttaccagcag 240
 tacaaccgcg aaggcgggta tcaacaccag ttcaatccgc agggtggtcg tggtactac 300
 aaaaacttca actacaacaa caacctgcag ggttaccagg ctggaattat gatggcctat 360
 ctggtttttc ttggtccacc gggggcaggc aaaggtagct atgcaaacg tttacaggaa 420
 atcaccggca tcccgcacat tagcacgggc gacatttttc gtgatattgt caaaaaggaa 480
 40 aatgacgaat taggtaagaa aattaaagaa attatggagc gcggcgagtt ggtgccggac 540
 gaactgggtg atgaagttgt caaacgctcg ctgtctgaaa aggattgcga acgtggcttt 600
 attttggacg gttaccgcg tacagtagct caggcagagt ttctcgacgg cttcctgaag 660
 actcagaata aggagttaac ggctgcggtc ctgttcgagg tgcctgaaga ggtggtcgtt 720
 cagcgtctga ccgcgcggcg tatctgcccg aagtgtggtc gtatttacia cctgatttca 780
 45 cttcctcaa aagaagatga actgtgtgat gactgcaaag taaaactggt gcaacgcgaa 840
 gatgataaag aggaaactgt gcgccatcgc tacaagatg atctggaaaa aaccaaccg 900
 gttatcgatt attatgataa aaaaggcatt ttgaaacgcg ttgatgggac catcggcatc 960
 gataacgtga ttgccgaagt tctcaaaatc attgggtgga gtgataaata g 1011

50 <210> 52
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> secuencia de proteína de adenilato quinasa de Thermotoga marítima
 fusionada en el extremo N con Sup35N.

60 <400> 52
 Met Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr Gln Gln Tyr Ser
 1 5 10 15

65 Gln Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn Asn Arg Tyr Gln Gly Tyr Gln
 20 25 30

ES 2 588 181 T3

Ala Tyr Asn Ala Gln Ala Gln Pro Gly Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn Tyr
 35 40 45

5 Gln Gly Tyr Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro
 50 55 60

10 Asp Ala Gly Tyr Gln Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln Gln
 65 70 75 80

15 Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln His Gln Phe Asn Pro Gln Gly Gly
 85 90 95

20 Arg Gly Asn Tyr Lys Asn Phe Asn Tyr Asn Asn Asn Leu Gln Gly Tyr
 100 105 110

Gln Ala Gly Ile Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly
 115 120 125

25 Ala Gly Lys Gly Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile
 130 135 140

30 Pro His Ile Ser Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu
 145 150 155 160

35 Asn Asp Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu
 165 170 175

40 Leu Val Pro Asp Glu Leu Val Asn Glu Val Val Lys Arg Arg Leu Ser
 180 185 190

Glu Lys Asp Cys Glu Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr
 195 200 205

45 Val Ala Gln Ala Glu Phe Leu Asp Gly Phe Leu Lys Thr Gln Asn Lys
 210 215 220

50 Glu Leu Thr Ala Ala Val Leu Phe Glu Val Pro Glu Glu Val Val Val
 225 230 235 240

55 Gln Arg Leu Thr Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr
 245 250 255

60 Asn Leu Ile Ser Leu Pro Pro Lys Glu Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys
 260 265 270

Lys Val Lys Leu Val Gln Arg Glu Asp Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg
 275 280 285

65 His Arg Tyr Lys Val Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr
 290 295 300

ES 2 588 181 T3

Tyr Asp Lys Lys Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile
 305 310 315 320
 5 Asp Asn Val Ile Ala Glu Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys
 325 330 335
 10 <210> 53
 <211> 1025
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de ADN de Sup35N fusionada en el extremo 3' de adenilato
 quinasa de Thermotoga maritima.
 <400> 53
 20 Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Thr Ala Thr Cys Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 25 Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Thr Gly Gly Thr Cys Cys Ala Cys Cys
 20 25 30
 30 Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Gly Gly Cys Ala Ala Ala Gly Gly Thr
 35 40 45
 35 Ala Cys Cys Thr Ala Thr Gly Cys Gly Ala Ala Ala Cys Gly Thr Thr
 50 55 60
 40 Thr Ala Cys Ala Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys Cys Gly Gly
 65 70 75 80
 45 Cys Ala Thr Cys Cys Cys Gly Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ala Gly Cys
 85 90 95
 50 Ala Cys Gly Gly Gly Cys Gly Ala Cys Ala Thr Thr Thr Thr Thr Cys
 100 105 110
 55 Gly Thr Gly Ala Thr Ala Thr Thr Gly Thr Cys Ala Ala Ala Ala Ala
 115 120 125
 60 Gly Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Cys Gly Ala Ala Thr Thr Ala
 130 135 140
 65 Gly Gly Thr Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ala Ala Gly
 145 150 155 160
 70 Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr Gly Gly Ala Gly Cys Gly Cys Gly Gly
 165 170 175
 75 Cys Gly Ala Gly Thr Thr Gly Gly Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Cys
 180 185 190

ES 2 588 181 T3

Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Gly
 195 200 205
 5 Thr Thr Gly Thr Cys Ala Ala Ala Cys Gly Thr Cys Gly Gly Cys Thr
 210 215 220
 10 Gly Thr Cys Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Thr Thr Gly Cys
 225 230 235 240
 15 Gly Ala Ala Cys Gly Thr Gly Gly Cys Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr
 245 250 255
 20 Thr Gly Gly Ala Cys Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Cys Gly Cys Gly
 260 265 270
 25 Thr Ala Cys Ala Gly Thr Ala Gly Cys Thr Cys Ala Gly Gly Cys Ala
 275 280 285
 30 Thr Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala Cys Thr Cys Ala Gly Ala Ala
 305 310 315 320
 35 Thr Ala Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Ala Ala Cys Gly Gly Cys Thr
 325 330 335
 40 Gly Cys Gly Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Gly Ala Gly Gly
 340 345 350
 45 Thr Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr
 355 360 365
 50 Cys Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Thr Cys Thr Gly Ala Cys Cys
 370 375 380
 55 Gly Cys Gly Cys Gly Gly Cys Gly Thr Ala Thr Cys Thr Gly Cys Cys
 385 390 395 400
 60 Cys Gly Ala Ala Gly Thr Gly Thr Gly Gly Thr Cys Gly Thr Ala Thr
 405 410 415
 65 Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr Cys Ala
 420 425 430
 70 Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys Cys Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly
 435 440 445
 75 Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala
 450 455 460

ES 2 588 181 T3

Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys Thr Gly
 465 470 475 480
 5 Gly Thr Gly Cys Ala Ala Cys Gly Cys Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly
 485 490 495
 10 Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr
 500 505
 15 Gly Cys Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Thr Ala Cys Ala Ala Ala
 515 520 525
 20 Gly Thr Ala Thr Ala Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala
 530 535 540
 25 Cys Cys Cys Ala Ala Cys Cys Gly Gly Thr Thr Ala Thr Cys Gly Ala
 545 550 555 560
 30 Thr Thr Ala Thr Thr Ala Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 565 570 575
 35 Gly Gly Cys Ala Thr Thr Thr Thr Gly Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly
 580 585 590
 40 Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly
 595 600 605
 45 Cys Ala Thr Cys Gly Ala Thr Ala Ala Cys Gly Thr Gly Ala Thr Thr
 610 615 620
 50 Gly Cys Cys Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Thr Cys Ala Ala Ala Ala
 625 630 635 640
 55 Thr Cys Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Ala
 645 650 655
 60 Thr Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Cys Gly Ala Gly Thr Ala Thr Gly
 660 665 670
 65 Gly Ala Cys Thr Cys Thr Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Ala
 675 680 685
 Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Cys Thr Ala
 690 695 700
 70 Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Gly
 705 710 715 720
 75 Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys

ES 2 588 181 T3

Ala Gly Gly Gly Thr Ala Ala Cys Ala Ala Cys Cys Gly Thr Thr Ala
740 745 750

5 Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr
755 760 765

10 Thr Ala Cys Ala Ala Cys Gly Cys Thr Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys
770 775 780

15 Ala Gly Cys Cys Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Thr Ala
785 790 795 800

Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly
805 810 815

20 Gly Gly Thr Thr Ala Cys Thr Cys Cys Gly Gly Thr Thr Ala Thr Cys
820 825 830

25 Ala Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Ala Cys Cys Ala
835 840 845

30 Ala Cys Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys
850 855 860

35 Gly Cys Thr Gly Gly Cys Thr Ala Thr Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys
865 870 875 880

Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Gly
885 890 895

40 Thr Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys
900 905 910

45 Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Thr Thr
915 920 925

50 Ala Thr Cys Ala Ala Cys Ala Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala
930 935 940

55 Thr Cys Cys Gly Cys Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr Cys Gly Thr
945 950 955 960

Gly Gly Thr Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys Thr
965 970 975

60 Thr Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala
980 985 990

65 Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly
995 1000 1005

ES 2 588 181 T3

Gly Cys Thr Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Thr Cys Gly Ala Cys
 1010 1015 1020

5 Gly Cys
 1025

10 <210> 54
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia de proteína de adenilato quinasa de Thermotoga marítima
 fusionada en el extremo C con Sup35N.

<400> 54

20 Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly
 1 5 10 15

25 Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His Ile Ser
 20 25 30

30 Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp Glu Leu
 35 40 45

35 Gly Lys Lys Ile Lys Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp
 50 55 60

40 Glu Leu Val Asn Glu Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys Asp Cys
 65 70 75 80

45 Glu Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala Gln Ala
 85 90 95

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

55 Ala Val Leu Phe Glu Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg Leu Thr
 115 120 125

60 Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu Ile Ser
 130 135 140

65 Leu Pro Pro Lys Glu Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu
 145 150 155 160

70 Val Gln Arg Glu Asp Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg Tyr Lys
 165 170 175

75 Val Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys
 180 185 190

Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Ile

ES 2 588 181 T3

<211> 1593
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ADN que codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa)

<400> 57

10	atgatgatgg	cgtctaagga	cgctacatca	agcgtggatg	gcgctagtgg	cgctggtcag	60
	ttggtaccgg	aggttaatgc	tcttgaccct	cttgaatgg	atcctgtagc	aggttcttcg	120
	acagcagtcg	cgactgctgg	acaagttaat	cctattgatc	cctggataat	taataatfff	180
	gtgcaagccc	cccaaggtga	atftactatt	tccccaaata	atacccccg	tgatgffffg	240
	tttgatttga	gtttgggtcc	ccatcttaat	cffffcttgc	tccatctatc	acaaatgtat	300
15	aatggttggg	ttggtaacat	gagagtcagg	attatgctag	ctggtaatgc	ctttactgcg	360
	gggaagataa	tagtttcctg	cataccccct	ggttttgggt	cacataatct	tactatagca	420
	caagcaactc	tcffffccaca	tgtgattgct	gatgttagga	ctctagacc	cattgagggtg	480
	cfffftgaag	atggttaggaa	tgttctctff	cataataatg	atagaaatca	acaaaccatg	540
	cgccttgtgt	gcatgctgta	cacccccctc	cgcactgggtg	gtggtactgg	tgattctfff	600
20	gtagttgcag	ggcgagttat	gacttgcccc	agtcctgatt	ftaatttctt	gfffftagtc	660
	cctcctacgg	tggagcagaa	aaccaggccc	ttcacactcc	caaatctgcc	attgagttct	720
	ctgtctaact	cacgtgcccc	tctcccaatc	agtagtatgg	gcatttcccc	agacaatgtc	780
	cagagtgtgc	agttccaaaa	tggctgggtg	actctggatg	gccgcctggg	tggcaccacc	840
	ccagtttcat	tgtcacatgt	tgccaaagata	agagggacct	ccaatggcac	tgtaatcaac	900
25	cttactgaat	tggatggcac	accctttcac	cfffftgagg	gccctgcccc	cattgggfff	960
	ccagacctcg	gtggtttgta	ttggcatatc	aatatgacac	agtttggcca	ttctagccag	1020
	acccagtatg	atgtagacac	cacccctgac	actffffgtcc	cccatctgg	ttcaattcag	1080
	gcaaatggca	ttggcagttg	taattatggt	gggtttctta	gctggatttc	ccccccatca	1140
	cacccgtctg	gctcccaagt	tgacctttgg	aagatcccca	attatgggtc	aagtattacg	1200
30	gaggcaaac	atctagcccc	ttctgtatac	ccccctgggt	tccgagagggt	attggctfff	1260
	ttcatgtcaa	aaatgccagg	tcctgggtgct	tataatftgc	cctgtctatt	accacaagag	1320
	tacatttcac	atcttgctag	tgaacaagcc	cctactgtag	gtgaggctgc	cctgctccac	1380
	tatgttgacc	ctgataaccg	tccggaatctt	ggggaattca	aagcataacc	tgatggffff	1440
	ctcactttgt	tccccaatgg	ggctagctcg	ggtcacacac	agctgccgat	caatgggggtc	1500
35	tttgtctfff	tttcatgggt	gtccagattt	tatcaattaa	agcctgtggg	aactgcccag	1560
	tcggcaagag	gtaggcttgg	tctgcgccga	taa			1593

<210> 58
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> secuencia de proteína de una proteína de la cápside de Norovirus capsid protein (58kDa)

<400> 58

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

ES 2 588 181 T3

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

ES 2 588 181 T3

Val Pro His Leu Gly Ser Ile Gln Ala Asn Gly Ile Gly Ser Gly Asn
 355 360 365

5 Tyr Val Gly Val Leu Ser Trp Ile Ser Pro Pro Ser His Pro Ser Gly
 370 375 380

10 Ser Gln Val Asp Leu Trp Lys Ile Pro Asn Tyr Gly Ser Ser Ile Thr
 385 390 395 400

15 Glu Ala Thr His Leu Ala Pro Ser Val Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu
 405 410 415

20 Val Leu Val Phe Phe Met Ser Lys Met Pro Gly Pro Gly Ala Tyr Asn
 420 425 430

25 Leu Pro Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr Ile Ser His Leu Ala Ser Glu
 435 440 445

30 Gln Ala Pro Thr Val Gly Glu Ala Ala Leu Leu His Tyr Val Asp Pro
 450 455 460

35 Asp Thr Gly Arg Asn Leu Gly Glu Phe Lys Ala Tyr Pro Asp Gly Phe
 465 470 475 480

40 Leu Thr Cys Val Pro Asn Gly Ala Ser Ser Gly Pro Gln Gln Leu Pro
 485 490 495

45 Ile Asn Gly Val Phe Val Phe Val Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln
 500 505 510

50 Leu Lys Pro Val Gly Thr Ala Ser Ser Ala Arg Gly Arg Leu Gly Leu
 515 520 525

55 Arg Arg
 530

<210> 59
 <211> 1593
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN para un gen sintético qe codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa) optimizada para la expresión en E.coli

<400> 59

60	atgatgatgg	cttctaaaga	cgctacctct	tctggtgacg	gtgcttctgg	tgctggtcag	60
	ctggttccgg	aagttaacgc	ttctgacctg	ctggctatgg	acccggttgc	tggttcttct	120
	accgctgttg	ctaccgctgg	tcagggttaac	ccgatcgacc	cgtggatcat	caacaacttc	180
	gttcaggctc	cgcagggtga	attcaccatc	tctccgaaca	acaccccggg	tgacgttctg	240
	ttcgacctgt	ctctgggtcc	gcacctgaac	ccgttcctgc	tgacctgtc	tcagatgtac	300
	aacggttggg	ttggtaacat	gcgtgttcgt	atcatgctgg	ctggtaacgc	tttaccgct	360
65	ggtaaaatca	tcgtttcttg	catcccgccg	ggtttcggtt	ctcacaacct	gaccatcgct	420
	caggctaccc	tgttcccgcg	cgttatcgct	gacgttcgta	ccctggacct	gatcgaagtt	480
	ccgctggaag	acgttcgtaa	cgttctgttc	cacaacaacg	accgtaacca	gcagaccatg	540
	cgtctggttt	gcatgctgta	caccccgctg	cgtaccggtg	gtggtaccgg	tgactctttc	600

ES 2 588 181 T3

	gttggtgctg	gtcgtgttat	gacctgcccg	tctccggact	tcaacttctt	gttcctgggt	660	
	ccgccgaccg	ttgaacagaa	aaccgcgtcc	ttcaccctgc	cgaacctgcc	gctgtcttct	720	
	ctgtctaact	ctcgtgctcc	gctgcccgatc	tcttctatgg	gtatctctcc	ggacaacggt	780	
	cagtctgttc	agttccagaa	cggtcgttgc	accctggacg	gtcgtctggt	tggtaccacc	840	
5	ccggtttctc	tgtctcacgt	tgctaaaatc	cgtggtacct	ctaaccggtac	cgttatcaac	900	
	ctgaccgaac	tggaacggtac	cccgttccac	ccgttcgaag	gtccggctcc	gatcggtttc	960	
	ccggacctgg	gtggttgcca	ctggcacatc	aacatgacct	agttcgggtca	ctcttctcag	1020	
	accagctacg	acgttgacac	caccccggac	accttcggtc	cgcacctggg	ttctatccag	1080	
	gctaaccgta	tcggttctgg	taactacggt	ggtgttctgt	cttggatctc	tccgccgtct	1140	
10	cacccgtctg	gttctcaggt	tgacctgtgg	aaaatcccga	actacgggtc	ttctatcacc	1200	
	gaagctaccc	acctggctcc	gtctgtttac	ccgccgggtt	tcggtgaagt	tctggttttc	1260	
	ttcatgtcta	aaatgccggg	tccgggtgct	tacaacctgc	cgtgcctgct	gccgcaggaa	1320	
	tacatctctc	acctggcttc	tgaacaggct	ccgacctgtg	gtgaagctgc	tctgctgcac	1380	
	tacgttgacc	cggacaccgg	tcgtaacctg	ggtgaattca	aagcttacc	ggacggtttc	1440	
15	ctgacctgcg	ttccgaacgg	tgcttcttct	ggtccgcagc	agctgccgat	caacgggtgt	1500	
	ttcgttttctg	tttcttgggt	ttctcgtttc	taccagctga	aaccggttgg	taccgcttct	1560	
	tctgctcgtg	gtcgtctggt	tctgctcgtg	tag			1593	
	<210>	60						
20	<211>	2250						
	<212>	ADN						
	<213>	Secuencia artificial						
	<220>							
25	<223>	Secuencia de ADN para un gen sintético que codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa) optimizada para la expresión en E.coli fusionada en el extremo 5' de un gen que codifica la tAK de Thermotoga maritima.						
	<400>	60						
30	atgatgatgg	cttctaaga	cgctacctct	tctgttgacg	gtgcttctgg	tgctgggtcag	60	
	ctggttccgg	aagttaacgc	ttctgacctg	ctggctatgg	acccggttgc	tggttcttct	120	
	accgctgttg	ctaccgctgg	tcaggttaac	ccgatcgacc	cgtggatcat	caacaacttc	180	
	gttcaggctc	cgcagggtga	attcaccatc	tctccgaaca	acaccccggg	tgactgttctg	240	
	ttcgacctgt	ctctgggtcc	gcacctgaac	ccgttcctgc	tgacctgtc	tcagatgtac	300	
35	aacggttggg	ttggtaacat	gcgtgttctg	atcatctgtg	ctggtaacgc	tttaccgct	360	
	ggtaaaatca	tcgtttcttg	catcccgcgg	ggtttcgggt	ctcacaacct	gacctatcgt	420	
	caggctaccc	tgttcccgca	cgttatcgct	gacgttcgta	ccctggacct	gatcgaagtt	480	
	ccgctggaag	acgttcgtaa	cgttctgttc	cacaacaacg	accgtaacca	gcagaccatg	540	
	cgtctgggtt	gcatgctgta	caccccgcgtg	cgtaaccggg	gtggtaccgg	tgactctttc	600	
40	gttggtgctg	gtcgtgttat	gacctgcccg	tctccggact	tcaacttctt	gttcctgggt	660	
	ccgccgaccg	ttgaacagaa	aaccgcgtcc	ttcaccctgc	cgaacctgcc	gctgtcttct	720	
	ctgtctaact	ctcgtgctcc	gctgcccgatc	tcttctatgg	gtatctctcc	ggacaacggt	780	
	cagtctgttc	agttccagaa	cggtcgttgc	accctggacg	gtcgtctggt	tggtaccacc	840	
	ccggtttctc	tgtctcacgt	tgctaaaatc	cgtggtacct	ctaaccggtac	cgttatcaac	900	
45	ctgaccgaac	tggaacggtac	cccgttccac	ccgttcgaag	gtccggctcc	gatcggtttc	960	
	ccggacctgg	gtggttgcca	ctggcacatc	aacatgacct	agttcgggtca	ctcttctcag	1020	
	accagctacg	acgttgacac	caccccggac	accttcggtc	cgcacctggg	ttctatccag	1080	
	gctaaccgta	tcggttctgg	taactacggt	ggtgttctgt	cttggatctc	tccgccgtct	1140	
	cacccgtctg	gttctcaggt	tgacctgtgg	aaaatcccga	actacgggtc	ttctatcacc	1200	
50	gaagctaccc	acctggctcc	gtctgtttac	ccgccgggtt	tcggtgaagt	tctggttttc	1260	
	ttcatgtcta	aaatgccggg	tccgggtgct	tacaacctgc	cgtgcctgct	gccgcaggaa	1320	
	tacatctctc	acctggcttc	tgaacaggct	ccgacctgtg	gtgaagctgc	tctgctgcac	1380	
	tacgttgacc	cggacaccgg	tcgtaacctg	ggtgaattca	aagcttacc	ggacggtttc	1440	
	ctgacctgcg	ttccgaacgg	tgcttcttct	ggtccgcagc	agctgccgat	caacgggtgt	1500	
55	ttcgttttctg	tttcttgggt	ttctcgtttc	taccagctga	aaccggttgg	taccgcttct	1560	
	tctgctcgtg	gtcgtctggt	tctgctcgtg	atgatggcct	atctggtttt	tcttgggtcca	1620	
	ccgggggag	gcaaagggtac	ctatgcaaaa	cgtttacagg	aaatcaccgg	catcccgcac	1680	
	attagcaccg	gacacatctt	tcgtgatatt	gtcaaaaagg	aaaatgacga	attaggttaag	1740	
	aaaattaaag	aaattatgga	gcggggcag	ttggtgcggg	acgaactggg	gaatgaagtt	1800	
60	gtcaaacgtc	ggctgtctga	aaaggattgc	gaactgtgct	ttattttgga	cggttaccgg	1860	
	cgtacagtag	ctcaggcaga	gtttctcgac	ggcttctctga	agactcagaa	taaggagtta	1920	
	acggctgcgg	tcctgttcga	ggtgcctgaa	gaggtggtcg	ttcagcgtct	gaccgcggcg	1980	
	cgtatctgcc	cgaagtgtgg	tcgtatctac	aacctgattt	cacttctctc	aaaagaagat	2040	
	gaactgtgtg	atgactgcaa	agtaaaaactg	gtgcaacgcg	aagatgataa	agaggaaact	2100	
65	gtgcccctac	gctacaagtc	atatctggaa	aaaacccaac	cggttatcga	ttattatgat	2160	
	aaaaaaggca	ttttgaaacg	cgttgatggg	accatcggca	tcgataacct	gattgccgaa	2220	
	gttctcaaaa	tcattgggtg	gagtgataaa				2250	

ES 2 588 181 T3

<210> 61
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de proteína de una proteína de la cápside de Norovirus
 (58kDa) fusionada en el extremo N de la adenilato quinasa de Thermotoga
 maritima

10

<400> 61

Met Met Met Ala Ser Lys Asp Ala Thr Ser Ser Val Asp Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Gln Leu Val Pro Glu Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu Ala
 20 25 30

Met Asp Pro Val Ala Gly Ser Ser Thr Ala Val Ala Thr Ala Gly Gln
 35 40 45

Val Asn Pro Ile Asp Pro Trp Ile Ile Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro
 50 55 60

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

Phe Asp Leu Ser Leu Gly Pro His Leu Asn Pro Phe Leu Leu His Leu
 85 90 95

Ser Gln Met Tyr Asn Gly Trp Val Gly Asn Met Arg Val Arg Ile Met
 100 105 110

Leu Ala Gly Asn Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Val Ser Cys Ile
 115 120 125

Pro Pro Gly Phe Gly Ser His Asn Leu Thr Ile Ala Gln Ala Thr Leu
 130 135 140

Phe Pro His Val Ile Ala Asp Val Arg Thr Leu Asp Pro Ile Glu Val
 145 150 155 160

Pro Leu Glu Asp Val Arg Asn Val Leu Phe His Asn Asn Asp Arg Asn
 165 170 175

Gln Gln Thr Met Arg Leu Val Cys Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Thr
 180 185 190

Gly Gly Gly Thr Gly Asp Ser Phe Val Val Ala Gly Arg Val Met Thr
 195 200 205

Cys Pro Ser Pro Asp Phe Asn Phe Leu Phe Leu Val Pro Pro Thr Val
 210 215 220

ES 2 588 181 T3

Glu Gln Lys Thr Arg Pro Phe Thr Leu Pro Asn Leu Pro Leu Ser Ser
 225 230 235 240
 5 Leu Ser Asn Ser Arg Ala Pro Leu Pro Ile Ser Ser Met Gly Ile Ser
 245 250 255
 10 Pro Asp Asn Val Gln Ser Val Gln Phe Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu
 260 265 270
 15 Asp Gly Arg Leu Val Gly Thr Thr Pro Val Ser Leu Ser His Val Ala
 275 280 285
 20 Lys Ile Arg Gly Thr Ser Asn Gly Thr Val Ile Asn Leu Thr Glu Leu
 290 295 300
 25 Asp Gly Thr Pro Phe His Pro Phe Glu Gly Pro Ala Pro Ile Gly Phe
 305 310 315 320
 30 Pro Asp Leu Gly Gly Cys Asp Trp His Ile Asn Met Thr Gln Phe Gly
 325 330 335
 35 Val Pro His Leu Gly Ser Ile Gln Ala Asn Gly Ile Gly Ser Gly Asn
 355 360 365
 40 Tyr Val Gly Val Leu Ser Trp Ile Ser Pro Pro Ser His Pro Ser Gly
 370 375 380
 45 Ser Gln Val Asp Leu Trp Lys Ile Pro Asn Tyr Gly Ser Ser Ile Thr
 385 390 395 400
 50 Glu Ala Thr His Leu Ala Pro Ser Val Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu
 405 410 415
 55 Val Leu Val Phe Phe Met Ser Lys Met Pro Gly Pro Gly Ala Tyr Asn
 420 425 430
 60 Leu Pro Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr Ile Ser His Leu Ala Ser Glu
 435 440 445
 65 Gln Ala Pro Thr Val Gly Glu Ala Ala Leu Leu His Tyr Val Asp Pro
 450 455 460
 Asp Thr Gly Arg Asn Leu Gly Glu Phe Lys Ala Tyr Pro Asp Gly Phe
 465 470 475 480
 70 Leu Thr Cys Val Pro Asn Gly Ala Ser Ser Gly Pro Gln Gln Leu Pro
 485 490 495

ES 2 588 181 T3

Ile Asn Gly Val Phe Val Phe Val Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln
500 505 510

5 Leu Lys Pro Val Gly Thr Ala Ser Ser Ala Arg Gly Arg Leu Gly Leu
515 520 525

10 Arg Arg Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly
530 535 540

15 Lys Gly Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His
545 550 555 560

Ile Ser Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp
565 570 575

20 Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val
580 585 590

25 Pro Asp Glu Leu Val Asn Glu Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys
595 600 605

30 Asp Cys Glu Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala
610 615 620

35 Gln Ala Glu Phe Leu Asp Gly Phe Leu Lys Thr Gln Asn Lys Glu Leu
625 630 635 640

40 Thr Ala Ala Val Leu Phe Glu Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg
645 650 655

45 Leu Thr Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu
660 665 670

50 Ile Ser Leu Pro Pro Lys Glu Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val
675 680 685

55 Lys Leu Val Gln Arg Glu Asp Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg
690 695 700

Tyr Lys Val Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp
705 710 715 720

60 Lys Lys Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn
725 730 735

65 Val Ile Ala Glu Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys
740 745 750

65 <210> 62
<211> 130
<212> PRT
<213> Bacteriófago MS2

ES 2 588 181 T3

<400> 62

5 Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
1 5 10 15

Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
10 20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
15 35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu
15 50 55 60

20 Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
65 70 75 80

25 Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe
85 90 95

30 Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu
100 105 110

Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
115 120 125

35 Ile Tyr
130

40 <210> 63
<211> 127
<212> PRT
<213> Bacteriófago PP7

45 <400> 63

Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu Thr
1 5 10 15

50 Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val Gly
20 25 30

55 Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn Gly
35 40 45

60 Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp Val
50 55 60

Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg Tyr
65 70 75 80

Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr Glu
85 90 95

ES 2 588 181 T3

5 Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Val Gln
100 105 110

Ala Thr Ser Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg
115 120 125

10 <210> 64
<211> 245
<212> PRT
<213> Bacteriófago PP7

15 <400> 64

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

Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val
20 25 30

25 Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn
35 40 45

30 Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp
50 55 60

35 Val Val Asp Ser Gly Leu Pro Lys Val Arg Tyr Thr Gln Val Trp Ser
65 70 75 80

40 His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr Glu Ala Ser Arg Lys Ser
85 90 95

45 Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala Thr Ser Gln Val Glu Asp
100 105 110

50 Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg Tyr Gly Ser Lys Thr Ile
115 120 125

55 Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu Thr Glu Ile Gln Ser
130 135 140

60 Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val Gly Pro Leu Val Gly
145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn Gly Ala Lys Thr Ala
165 170 175

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

Leu Pro Lys Val Arg Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile
195 200 205

ES 2 588 181 T3

Val Ala Asn Ser Thr Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr
 210 215 220
 5
 Lys Ser Leu Val Ala Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu
 225 230 235 240
 10 Val Pro Leu Gly Arg
 245
 15 <210> 65
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 65
 20 Met Lys Leu Leu Lys Val Ala Ala Ile Ala Ala Ile Val Phe Ser Gly
 1 5 10 15
 25 Ser Ala Leu Ala Gly Val Val Pro Gln Tyr Gly Gly Gly Gly Asn His
 20 25 30
 30 Gly Gly Gly Gly Asn Asn Ser Gly Pro Asn Ser Glu Leu Asn Ile Tyr
 35 40 45
 35 Gln Tyr Gly Gly Gly Asn Ser Ala Leu Ala Leu Gln Thr Asp Ala Arg
 50 55 60
 40 Asn Ser Asp Leu Thr Ile Thr Gln His Gly Gly Gly Asn Gly Ala Asp
 65 70 75 80
 45 Val Gly Gln Gly Ser Asp Asp Ser Ser Ile Asp Leu Thr Gln Arg Gly
 85 90 95
 50 Phe Gly Asn Ser Ala Thr Leu Asp Gln Trp Asn Gly Lys Asn Ser Glu
 100 105 110
 55 Met Thr Val Lys Gln Phe Gly Gly Gly Asn Gly Ala Ala Val Asp Gln
 115 120 125
 60 Thr Ala Ser Asn Ser Ser Val Asn Val Thr Gln Val Gly Phe Gly Asn
 130 135 140
 65 Asn Ala Thr Ala His Gln Tyr
 145 150
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 <210> 66
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de proteína de la proteína AgfA de Salmonella

ES 2 588 181 T3

<400> 66

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

<210> 67

<211> 353

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> secuencia de proteína de adenilato quinasa de Thermotoga maritima
 fusionada al extremo N de CsgA de E.coli

<400> 67

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

ES 2 588 181 T3

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

ES 2 588 181 T3

Val Asn Val Thr Gln Val Gly Phe Gly Asn Asn Ala Thr Ala His Gln
 340 345 350

5 Tyr

10 <210> 68
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia de proteína de la proteína hidrofobina 3 de la especie
 Fusarium

20 <400> 68

Met Gln Phe Ser Thr Leu Thr Thr Val Phe Ala Leu Val Ala Ala Ala
 1 5 10 15

25 Val Ala Ala Pro His Gly Ser Ser Gly Gly Asn Asn Pro Val Cys Ser
 20 25 30

30 Ala Gln Asn Asn Gln Val Cys Cys Asn Gly Leu Leu Ser Cys Ala Val
 35

Gln Val Leu Gly Ser Asn Cys Asn Gly Asn Ala Tyr Cys Cys Asn Thr
 50 55 60

35 Glu Ala Pro Thr Gly Thr Leu Ile Asn Val Ala Leu Leu Asn Cys Val
 65 70 75 80

40 Lys Leu Leu

45 <210> 69
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> secuencia de proteína de la proteína hidrofobina 5 de la especie
 Fusarium

55 <400> 69

Met Lys Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Leu Leu Gly Ala Val Val Ser
 1 5 10 15

60 Ala Leu Pro Ala Asn Glu Lys Arg Gln Ala Tyr Ile Pro Cys Ser Gly
 20 25 30

65 Leu Tyr Gly Thr Ser Gln Cys Cys Ala Thr Asp Val Leu Gly Val Ala
 35 40 45

Asp Leu Asp Cys Gly Asn Pro Pro Ser Ser Pro Thr Asp Ala Asp Asn

ES 2 588 181 T3

50 55 60

5 Phe Ser Ala Val Cys Ala Glu Ile Gly Gln Arg Ala Arg Cys Cys Val
65 70 75 80

10 Leu Pro Ile Leu Asp Gln Gly Ile Leu Cys Asn Thr Pro Thr Gly Val
85 90 95

Gln Asp

15 <210> 70
<211> 173
<212> PRT
<213> Balanus albicostatus

20 <400> 70

25 Val Pro Pro Pro Cys Asp Leu Ser Ile Lys Ser Lys Leu Lys Gln Val
1 5 10 15

30 Gly Ala Thr Ala Gly Asn Ala Ala Val Thr Thr Thr Gly Thr Thr Ser
20 25 30

35 Gly Ser Gly Val Val Lys Cys Val Val Arg Thr Pro Thr Ser Val Glu
35 40 45

40 Lys Lys Ala Ala Val Gly Asn Thr Gly Leu Ser Ala Val Ser Ala Ser
50 55 60

45 Ala Ala Asn Gly Phe Phe Lys Asn Leu Gly Lys Ala Thr Thr Glu Val
65 70 75 80

Lys Thr Thr Lys Asp Gly Thr Lys Val Lys Thr Lys Thr Ala Gly Lys
85 90 95

50 Gly Lys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Thr Ile Gln Ile Ala Asp Ala Asn
100 105 110

55 Gly Gly Val Ser Glu Lys Ser Leu Lys Leu Asp Leu Leu Thr Asp Gly
115 120 125

60 Leu Lys Phe Val Lys Val Thr Glu Lys Lys Gln Gly Thr Ala Thr Ser
130 135 140

65 Ser Ser Gly His Lys Ala Ser Gly Val Gly His Ser Val Phe Lys Val
145 150 155 160

Leu Asn Glu Ala Glu Thr Glu Leu Glu Leu Lys Gly Leu
165 170

<210> 71
<211> 202

ES 2 588 181 T3

<212> PRT
<213> Megabalanus rosa

<400> 71

5 Met Lys Trp Phe Leu Phe Leu Leu Thr Thr Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

10 Val Ser Ala His Glu Glu Asp Gly Val Cys Asn Ser Asn Ala Pro Cys
20 25 30

15 Tyr His Cys Asp Ala Asn Gly Glu Asn Cys Ser Cys Asn Cys Glu Leu
35 40 45

20 Phe Asp Cys Glu Ala Lys Lys Pro Asp Gly Ser Tyr Ala His Pro Cys
50 55 60

25 Arg Arg Cys Asp Ala Asn Asn Ile Cys Lys Cys Ser Cys Thr Ala Ile
65 70 75 80

30 Pro Cys Asn Glu Asp His Pro Cys His His Cys His Glu Glu Asp Asp
85 90 95

35 Gly Asp Thr His Cys His Cys Ser Cys Glu His Ser His Asp His His
100 105 110

40 Asp Asp Asp Thr His Gly Glu Cys Thr Lys Lys Ala Pro Cys Trp Arg
115 120 125

45 Cys Glu Tyr Asn Ala Asp Leu Lys His Asp Val Cys Gly Cys Glu Cys
130 135 140

50 Ser Lys Leu Pro Cys Asn Asp Glu His Pro Cys Tyr Arg Lys Glu Gly
145 150 155 160

55 Gly Val Val Ser Cys Asp Cys Lys Thr Ile Thr Cys Asn Glu Asp His
165 170 175

60 Pro Cys Tyr His Ser Tyr Glu Glu Asp Gly Val Thr Lys Ser Asp Cys
180 185 190

65 Asp Cys Glu His Ser Pro Gly Pro Ser Glu
195 200

<210> 72
<211> 576
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de proteína de fusión de a proteína de percebe de Balanus
65 albicostatus con la adenilato quinasa de Thermofoa maritima; fusión N-
terminal

<400> 72

ES 2 588 181 T3

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

ES 2 588 181 T3

Val Tyr Gly Leu Ser Lys Gly Phe Ser Ser Asp Met Arg Asp Ile Glu
 275 280 285
 5
 Glu Ala Ala Leu Lys Gly Asp Glu Trp Cys Lys Leu Val Leu Glu Ile
 290 295 300
 10
 Tyr Asp Tyr Arg Ile Ala Lys Tyr Ile Gly Ala Tyr Ala Ala Ala Met
 305 310 315 320
 15
 Asn Gly Val Asp Ala Ile Val Phe Thr Ala Gly Val Gly Glu Asn Ser
 325 330 335
 20
 Pro Ile Thr Arg Glu Asp Val Cys Ser Tyr Leu Glu Phe Leu Gly Val
 340 345 350
 25
 Lys Leu Asp Lys Gln Lys Asn Glu Glu Thr Ile Arg Gly Lys Glu Gly
 355 360 365
 30
 Ile Ile Ser Thr Pro Asp Ser Arg Val Lys Val Leu Val Val Pro Thr
 370 375 380
 35
 Asn Glu Glu Leu Met Ile Ala Arg Asp Thr Lys Glu Ile Val Glu Lys
 385 390 395 400
 40
 Ile Gly Arg Val Pro Pro Cys Asp Leu Ser Ile Lys Ser Lys Leu
 405 410 415
 45
 Lys Gln Val Gly Ala Thr Ala Gly Asn Ala Ala Val Thr Thr Thr Gly
 420 425 430
 50
 Thr Thr Ser Gly Ser Gly Val Val Lys Cys Val Val Arg Thr Pro Thr
 435 440 445
 55
 Ser Val Glu Lys Lys Ala Ala Val Gly Asn Thr Gly Leu Ser Ala Val
 450 455 460
 60
 Ser Ala Ser Ala Ala Asn Gly Phe Phe Lys Asn Leu Gly Lys Ala Thr
 465 470 475 480
 65
 Thr Glu Val Lys Thr Thr Lys Asp Gly Thr Lys Val Lys Thr Lys Thr
 485 490 495
 Ala Gly Lys Gly Lys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Thr Ile Gln Ile Ala
 500 505 510
 Asp Ala Asn Gly Gly Val Ser Glu Lys Ser Leu Lys Leu Asp Leu Leu
 515 520 525
 Thr Asp Gly Leu Lys Phe Val Lys Val Thr Glu Lys Lys Gln Gly Thr
 530 535 540

ES 2 588 181 T3

Ala Thr Ser Ser Ser Gly His Lys Ala Ser Gly Val Gly His Ser Val
 545 550 555 560

5 Phe Lys Val Leu Asn Glu Ala Glu Thr Glu Leu Glu Leu Lys Gly Leu
 565 570 575

10 <210> 73
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de proteína de fusión de a proteína de percebe de Balanus
 albicostatus con la adenilato quinasa de Thermoatgoa maritima; fusión C-
 terminal

20 <400> 73

Val Pro Pro Pro Cys Asp Leu Ser Ile Lys Ser Lys Leu Lys Gln Val
 1 5 10 15

25 Gly Ala Thr Ala Gly Asn Ala Ala Val Thr Thr Thr Gly Thr Thr Ser
 20 25 30

30 Gly Ser Gly Val Val Lys Cys Val Val Arg Thr Pro Thr Ser Val Glu
 35 40 45

35 Lys Lys Ala Ala Val Gly Asn Thr Gly Leu Ser Ala Val Ser Ala Ser
 50 55 60

40 Ala Ala Asn Gly Phe Phe Lys Asn Leu Gly Lys Ala Thr Thr Glu Val
 65 70 75 80

Lys Thr Thr Lys Asp Gly Thr Lys Val Lys Thr Lys Thr Ala Gly Lys
 85 90 95

45 Gly Lys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Thr Ile Gln Ile Ala Asp Ala Asn
 100 105 110

50 Gly Gly Val Ser Glu Lys Ser Leu Lys Leu Asp Leu Leu Thr Asp Gly
 115 120 125

55 Leu Lys Phe Val Lys Val Thr Glu Lys Lys Gln Gly Thr Ala Thr Ser
 130 135 140

60 Ser Ser Gly His Lys Ala Ser Gly Val Gly His Ser Val Phe Lys Val
 145 150 155 160

Leu Glu Ala Glu Thr Glu Leu Glu Leu Lys Gly Leu Met Arg Val Leu
 165 170 175

65 Val Ile Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ile Lys Tyr Gln Leu Ile Glu Met
 180 185 190

ES 2 588 181 T3

Glu Gly Glu Lys Val Leu Cys Lys Gly Ile Ala Glu Arg Ile Gly Ile
 195 200 205
 5
 Glu Gly Ser Arg Leu Val His Arg Val Gly Asp Glu Lys His Val Ile
 210 215 220
 10
 Glu Arg Glu Leu Pro Asp His Glu Glu Ala Leu Lys Leu Ile Leu Asn
 225 230 235
 15
 Thr Leu Val Asp Glu Lys Leu Gly Val Ile Lys Asp Leu Lys Glu Ile
 245 250 255
 20
 Asp Ala Val Gly His Arg Val Val His Gly Gly Glu Arg Phe Lys Glu
 260 265
 Ser Val Leu Val Asp Glu Glu Val Leu Lys Ala Ile Glu Glu Val Ser
 275 280 285
 25
 Pro Leu Ala Pro Leu His Asn Pro Ala Asn Leu Met Gly Ile Lys Ala
 290 295 300
 30
 Ala Met Lys Leu Leu Pro Gly Val Pro Asn Val Ala Val Phe Asp Thr
 305 310 315
 35
 Ala Phe His Gln Thr Ile Pro Gln Lys Ala Tyr Leu Tyr Ala Ile Pro
 325 330 335
 40
 Tyr Glu Tyr Tyr Glu Lys Tyr Lys Ile Arg Arg Tyr Gly Phe His Gly
 340 345 350
 45
 Thr Ser His Arg Tyr Val Ser Lys Arg Ala Ala Glu Ile Leu Gly Lys
 355 360 365
 50
 Lys Leu Glu Glu Leu Lys Ile Ile Thr Cys His Ile Gly Asn Gly Ala
 370 375 380
 55
 Ser Val Ala Ala Val Lys Tyr Gly Lys Cys Val Asp Thr Ser Met Gly
 385 390 395 400
 60
 Phe Thr Pro Leu Glu Gly Leu Val Met Gly Thr Arg Ser Gly Asp Leu
 405 410 415
 65
 Asp Pro Ala Ile Pro Phe Phe Ile Met Glu Lys Glu Gly Ile Ser Pro
 420 425 430
 Gln Glu Met Tyr Asp Ile Leu Asn Lys Lys Ser Gly Val Tyr Gly Leu
 435 440 445
 70
 Ser Lys Gly Phe Ser Ser Asp Met Arg Asp Ile Glu Glu Ala Ala Leu
 450 455 460

ES 2 588 181 T3

Lys Gly Asp Glu Trp Cys Lys Leu Val Leu Glu Ile Tyr Asp Tyr Arg
 465 470 475 480
 5 Ile Ala Lys Tyr Ile Gly Ala Tyr Ala Ala Ala Met Asn Gly Val Asp
 485 490
 10 Ala Ile Val Phe Thr Ala Gly Val Gly Glu Asn Ser Pro Ile Thr Arg
 500 505 510
 15 Glu Asp Val Cys Ser Tyr Leu Glu Phe Leu Gly Val Lys Leu Asp Lys
 515 520 525
 20 Gln Lys Asn Glu Glu Thr Ile Arg Gly Lys Glu Gly Ile Ile Ser Thr
 530 535 540
 25 Pro Asp Ser Arg Val Lys Val Leu Val Val Pro Thr Asn Glu Glu Leu
 545 550 555 560
 30 Met Ile Ala Arg Asp Thr Lys Glu Ile Val Glu Lys Ile Gly Arg
 565 570 575
 35 <210> 74
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Balanus albicostatus
 40 <400> 74
 Met Lys Tyr Thr Leu Ala Leu Leu Phe Leu Thr Ala Ile Ile Ala Thr
 1 5 10 15
 45 Phe Val Ala Ala His Lys His His Asp His Gly Lys Ser Cys Ser Lys
 20 25 30
 50 Ser His Pro Cys Tyr His Cys His Thr Asp Cys Glu Cys Asn His His
 35 40 45
 55 His Asp Asp Cys Asn Arg Ser His Arg Cys Trp His Lys Val His Gly
 50 55 60
 60 Val Val Ser Gly Asn Cys Asn Cys Asn Leu Leu Thr Pro Cys Asn Gln
 65 70 75 80
 65 Lys His Pro Cys Trp His Lys His Cys Asp Cys Phe Cys
 115 120 125

<210> 75
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de proteína de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe
 10 <400> 75
 Ser Lys Leu Pro Cys Asn Asp Glu His Pro Cys Tyr Arg Lys Glu Gly
 1 5 10 15
 15 Gly Val Val Ser Cys Asp Cys Lys
 20
 20 <210> 76
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia de proteína de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe
 30 <400> 76
 Ser Lys Leu Pro Ser Asn Asp Glu His Pro Ser Tyr Arg Lys Glu Gly
 1 5 10 15
 35 Gly Val Val Ser Ser Asp Ser Lys
 20
 40 <210> 77
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia de proteína de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe
 <400> 77
 50 Lys Thr Ile Thr Cys Asn Glu Asp His Pro Cys Tyr His Ser Tyr Glu
 1 5 10 15
 55 Glu Asp Gly Val Thr Lys Ser Asp Cys Asp Cys Glu
 20 25
 60 <210> 78
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 78
 65 Met Arg Ile Ile Leu Leu Gly Ala Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Gln
 1 5 10 15

ES 2 588 181 T3

Ala Gln Phe Ile Met Glu Lys Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Ser Thr Gly
 20 25 30

5 Asp Met Leu Arg Ala Ala Val Lys Ser Gly Ser Glu Leu Gly Lys Gln
 35 40 45

10 Ala Lys Asp Ile Met Asp Ala Gly Lys Leu Val Thr Asp Glu Leu Val
 50 55 60

15 Ile Ala Leu Val Lys Glu Arg Ile Ala Gln Glu Asp Cys Arg Asn Gly
 65 70 75 80

20 Phe Leu Leu Asp Gly Phe Pro Arg Thr Ile Pro Gln Ala Asp Ala Met
 85 90 95

25 Lys Glu Ala Gly Ile Asn Val Asp Tyr Val Leu Glu Phe Asp Val Pro
 100 105 110

30 Asp Glu Leu Ile Val Asp Arg Ile Val Gly Arg Arg Val His Ala Pro
 115 120 125

35 Ser Gly Arg Val Tyr His Val Lys Phe Asn Pro Pro Lys Val Glu Gly
 130 135 140

40 Lys Asp Asp Val Thr Gly Glu Glu Leu Thr Thr Arg Lys Asp Asp Gln
 145 150 155 160

45 Glu Glu Thr Val Arg Lys Arg Leu Val Glu Tyr His Gln Met Thr Ala
 165 170 175

50 Pro Leu Ile Gly Tyr Tyr Ser Lys Glu Ala Glu Ala Gly Asn Thr Lys
 180 185 190

55 Tyr Ala Lys Val Asp Gly Thr Lys Pro Val Ala Glu Val Arg Ala Asp
 195 200 205

60 Leu Glu Lys Ile Leu Gly
 210

55 <210> 79
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

60 <400> 79

60 Met Lys Lys Thr Lys Ile Val Cys Thr Ile Gly Pro Lys Thr Glu Ser
 1 5 10 15

65 Glu Glu Met Leu Ala Lys Met Leu Asp Ala Gly Met Asn Val Met Arg
 20 25 30

Leu Asn Phe Ser His Gly Asp Tyr Ala Glu His Gly Gln Arg Ile Gln

ES 2 588 181 T3

5 Leu Ser Ala Gln Leu₈₅ Thr Ala Ile Gly His₉₀ Arg Ile Val His Gly₉₅ Gly
 Glu Lys Tyr Thr₁₀₀ Ser Ser Val Val Ile₁₀₅ Asp Glu Ser Val Ile₁₁₀ Gln Gly
 10 Ile Lys Asp₁₁₅ Ala Ala Ser Phe Ala₁₂₀ Pro Leu His Asn₁₂₅ Pro Ala His Leu
 15 Ile Gly₁₃₀ Ile Glu Glu Ala Leu₁₃₅ Lys Ser Phe Pro Gln₁₄₀ Leu Lys Asp Lys
 20 Asn Val Ala Val Phe Asp₁₅₀ Thr Ala Phe His Gln₁₅₅ Thr Met Pro Glu Glu₁₆₀
 25 Ser Tyr Leu Tyr Ala₁₆₅ Leu Pro Tyr Asn₁₇₀ Leu Tyr Lys Glu His Gly₁₇₅ Ile
 Arg Arg Tyr Gly₁₈₀ Ala His Gly Thr Ser₁₈₅ His Phe Tyr Val Thr₁₉₀ Gln Glu
 30 Ala Ala Lys₁₉₅ Met Leu Asn Lys Pro₂₀₀ Val Glu Glu Leu Asn₂₀₅ Ile Ile Thr
 35 Cys His₂₁₀ Leu Gly Asn Gly Gly₂₁₅ Ser Val Ser Ala Ile₂₂₀ Arg Asn Gly Lys
 40 Cys Val Asp Thr Ser Met₂₃₀ Gly Leu Thr Pro Leu₂₃₅ Glu Gly Leu Val Met₂₄₀
 45 Gly Thr Arg Ser Gly₂₄₅ Asp Ile Asp Pro Ala₂₅₀ Ile Ile Phe His Leu₂₅₅ His
 Asp Thr Leu Gly₂₆₀ Met Ser Val Asp Ala₂₆₅ Ile Asn Lys Leu Leu₂₇₀ Thr Lys
 50 Glu Ser Gly₂₇₅ Leu Leu Gly Leu Thr₂₈₀ Glu Val Thr Ser Asp₂₈₅ Cys Arg Tyr
 55 Val Glu Asp Asn Tyr Ala Thr₂₉₅ Lys Glu Asp Ala Lys₃₀₀ Arg Ala Met Asp
 60 Val Tyr Cys His Arg Leu₃₁₀ Ala Lys Tyr Ile Gly₃₁₅ Ala Tyr Thr Ala Leu₃₂₀
 65 Met Asp Gly Arg Leu₃₂₅ Asp Ala Val Val Phe₃₃₀ Thr Gly Gly Ile Gly₃₃₅ Glu
 Asn Ala Ala Met₃₄₀ Val Arg Glu Leu Ser₃₄₅ Leu Gly Lys Leu Gly₃₅₀ Val Leu

ES 2 588 181 T3

5 Gly Phe Glu Val Asp His Glu Arg Asn Leu Ala Ala Arg Phe Gly Lys
 355 360 365
 Ser Gly Phe Ile Asn Lys Glu Gly Thr Arg Pro Ala Val Val Ile Pro
 370 375 380
 10 Thr Asn Glu Glu Leu Val Ile Ala Gln Asp Ala Ser Arg Leu Thr Ala
 385 390 395 400
 15 <210> 81
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Methanococcus voltae
 20 <400> 81
 Met Lys Asn Lys Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Ser
 1 5 10 15
 25 Thr Thr Ser Ser Gln Leu Ala Met Asp Asn Leu Arg Lys Glu Gly Val
 20 25 30
 30 Asn Tyr Lys Met Val Ser Phe Gly Ser Val Met Phe Glu Val Ala Lys
 35 40 45
 35 Glu Glu Asn Leu Val Ser Asp Arg Asp Gln Met Arg Lys Met Asp Pro
 50 55 60
 40 Glu Thr Gln Lys Arg Ile Gln Lys Met Ala Gly Arg Lys Ile Ala Glu
 65 70 75 80
 45 Met Ala Lys Glu Ser Pro Val Ala Val Asp Thr His Ser Thr Val Ser
 85 90 95
 50 Thr Pro Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Trp Val Leu Asn Glu
 100 105 110
 55 Leu Asn Pro Asp Leu Ile Ile Val Val Glu Thr Thr Gly Asp Glu Ile
 115 120 125
 60 Leu Met Arg Arg Met Ser Asp Glu Thr Arg Val Arg Asp Leu Asp Thr
 130 135 140
 65 Ala Ser Thr Ile Glu Gln His Gln Phe Met Asn Arg Cys Ala Ala Met
 145 150 155 160
 Ser Tyr Gly Val Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Val Gln Asn Arg
 165 170 175
 70 Asn Gly Leu Leu Asp Gln Ala Val Glu Glu Leu Thr Asn Val Leu Arg
 180 185 190

ES 2 588 181 T3

<210> 82
 <211> 192
 <212> PRT
 5 <213> Methanococcus thermolithotrophicus
 <400> 82
 10 Met Lys Asn Lys Leu Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Thr Ile Thr Gln Lys Ala Met Glu Lys Leu Ser Glu Glu Gly Ile
 15 20 25 30
 Asn Tyr Lys Met Val Asn Phe Gly Thr Val Met Phe Glu Val Ala Gln
 20 35 40 45
 Glu Glu Asn Leu Val Glu Asp Arg Asp Gln Met Arg Lys Leu Asp Pro
 50 55 60
 25 Asp Thr Gln Lys Arg Ile Gln Lys Leu Ala Gly Arg Lys Ile Ala Glu
 65 70 75 80
 30 Met Val Lys Glu Ser Pro Val Val Val Asp Thr His Ser Thr Ile Lys
 85 90 95
 Thr Pro Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Val Trp Val Leu Asn Glu
 35 100 105 110
 Leu Asn Pro Asp Ile Ile Ile Val Val Glu Thr Ser Gly Asp Glu Ile
 40 115 120 125
 40 Leu Ile Arg Arg Leu Asn Asp Glu Thr Arg Asn Arg Asp Leu Glu Thr
 130 135 140
 45 Thr Ala Gly Ile Glu Glu His Gln Ile Met Asn Arg Ala Ala Ala Met
 145 150 155 160
 50 Thr Tyr Gly Val Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Ile Gln Asn Lys
 165 170 175
 55 Asn Asn Leu Leu Asp Tyr Ala Val Glu Glu Leu Ile Ser Val Leu Arg
 180 185 190
 <210> 83
 <211> 217
 <212> PRT
 60 <213> Bacillus globisporus
 <400> 83
 65 Met Asn Ile Val Leu Met Gly Leu Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Gln
 1 5 10 15
 Ala Asp Arg Ile Val Glu Lys Tyr Gly Thr Pro His Ile Ser Thr Gly

ES 2 588 181 T3

			20					25				30				
5	Asp	Met	Phe 35	Arg	Ala	Ala	Ile	Gln 40	Glu	Gly	Thr	Glu	Leu 45	Gly	Val	Lys
10	Ala	Lys 50	Ser	Phe	Met	Asp	Gln 55	Gly	Ala	Leu	Val	Pro 60	Asp	Glu	Val	Thr
15	Ile	Gly	Ile	Val	Arg	Glu 70	Arg	Leu	Ser	Lys	Ser 75	Asp	Cys	Asp	Asn	Gly 80
20	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly 85	Phe	Pro	Arg	Thr	Val 90	Pro	Gln	Ala	Glu	Ala 95	Leu
25	Asp	Gln	Leu	Leu 100	Ala	Asp	Met	Gly	Arg 105	Lys	Ile	Glu	His	Val 110	Leu	Asn
30	Ile	Gln	Val 115	Glu	Lys	Glu	Glu	Leu 120	Ile	Ala	Arg	Leu	Thr 125	Gly	Arg	Arg
35	Ile	Cys 130	Lys	Val	Cys	Gly	Thr 135	Ser	Tyr	His	Leu	Leu 140	Phe	Asn	Pro	Pro
40	Gln	Val	Glu	Gly	Lys	Cys 150	Asp	Lys	Asp	Gly	Gly 155	Glu	Leu	Tyr	Gln	Arg 160
45	Ala	Asp	Asp	Asn	Pro 165	Asp	Thr	Val	Thr	Asn 170	Arg	Leu	Glu	Val	Asn 175	Met
50	Asn	Gln	Thr	Ala 180	Pro	Leu	Leu	Ala	Phe 185	Tyr	Asp	Ser	Lys	Glu 190	Val	Leu
55	Val	Asn	Ile 195	Asn	Gly	Gln	Lys	Asp 200	Ile	Lys	Asp	Val	Phe 205	Lys	Asp	Leu
60	Asp	Val 210	Ile	Leu	Gln	Gly	Asn 215	Gly	Gln							
65	<210>	84														
	<211>	217														
	<212>	PRT														
	<213>	Bacillus subtilis														
	<400>	84														
60	Met	Asn	Leu	Val	Leu 5	Met	Gly	Leu	Pro	Gly 10	Ala	Gly	Lys	Gly	Thr 15	Gln
65	Gly	Glu	Arg	Ile 20	Val	Glu	Asp	Tyr	Gly 25	Ile	Pro	His	Ile	Ser 30	Thr	Gly
	Asp	Met	Phe 35	Arg	Ala	Ala	Met	Lys 40	Glu	Glu	Thr	Pro	Leu 45	Gly	Leu	Glu

ES 2 588 181 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de ensayo para detectar la actividad de una quinasa reportera exógena, que comprende:
- 5 (i) añadir dicha quinasa reportera exógena a una mezcla de ensayo, en el que dicha quinasa reportera exógena se pone en contacto simultáneamente con ADP y un reactivo bioluminiscente, en el que antes de ponerse en contacto la quinasa reportera exógena con ADP, la mezcla de ensayo está sustancialmente libre de quinasa que no es quinasa reportera exógena y ATP; y
- (ii) detectar la emisión de luz de la mezcla de ensayo.
- 10 2. Procedimiento de ensayo, según la reivindicación 1, en el que antes de ponerse en contacto la quinasa reportera exógena con el ADP, la quinasa que no es quinasa reportera exógena se elimina o inactiva sustancialmente; y/o en el que antes de ponerse en contacto la quinasa reportera exógena con el ADP, el ATP se elimina sustancialmente.
- 15 3. Procedimiento de ensayo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la quinasa reportera exógena es una adenilato quinasa, preferiblemente una adenilato quinasa trimérica o monomérica.
4. Procedimiento de ensayo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la quinasa reportera exógena es una quinasa termoestable.
- 20 5. Procedimiento de ensayo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento de ensayo se completa en menos de 15 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos, menos de 2 minutos, menos de 1 minuto o menos de 30 segundos.
- 25 6. Procedimiento para determinar la presencia de un analito en una muestra, que comprende:
- (i) exponer la muestra a una quinasa reportera exógena acoplada a un agente de unión que se une específicamente al analito, de manera que se forma un complejo entre la quinasa reportera exógena y dicho analito cuando está presente en la muestra;
- (ii) separar la quinasa reportera exógena complejada de la quinasa no complejada; y
- 30 (iii) medir la actividad de la quinasa reportera exógena complejada utilizando un procedimiento de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Procedimiento para determinar la presencia de un analito en una muestra, que comprende:
- (i) proporcionar un soporte sólido que comprende una quinasa reportera exógena, en el que la quinasa reportera exógena se une al soporte sólido a través de un enlazador que comprende un agente de unión que se une específicamente al analito;
- 35 (ii) aplicar la muestra al soporte sólido, mediante lo cual dicho analito cuando está presente en la muestra desplaza la quinasa reportera exógena del soporte sólido; y
- (iii) medir la actividad de la quinasa reportera exógena desplazada utilizando un procedimiento de ensayo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 40 8. Procedimiento para determinar la presencia de un analito en una muestra, que comprende:
- (i) proporcionar un soporte sólido sobre el que se une un primer agente de unión que se une específicamente al analito;
- 45 (ii) exponer el soporte sólido a la muestra, de manera que dicho analito cuando está presente en la muestra se une al soporte sólido a través de dicho primer agente de unión;
- (iii) exponer el soporte sólido a una quinasa reportera exógena acoplada a un segundo agente de unión que se une específicamente al analito, de manera que la quinasa reportera exógena se une al soporte sólido a través de la interacción entre el segundo agente de unión y el analito ya unido;
- 50 (iv) aplicar la mezcla obtenida en la etapa (iii) a una membrana de filtro, en el que el soporte sólido es retenido en la membrana de filtro; y
- (v) medir la actividad de la quinasa reportera exógena retenida utilizando un procedimiento de ensayo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
- 55 preferiblemente en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en una esfera de látex y una esfera magnética.
9. Procedimiento para determinar la presencia de un analito en una muestra, que comprende:
- (i) proporcionar un soporte sólido magnético sobre el que se une un primer agente de unión que se une específicamente al analito;
- 60 (ii) exponer el soporte sólido a la muestra, de manera que dicho analito cuando está presente en la muestra se une al soporte sólido a través de dicho primer agente de unión;
- (iii) exponer el soporte sólido a una quinasa reportera exógena acoplada a un segundo agente de unión que se une específicamente al analito, de manera que la quinasa reportera exógena se une al soporte sólido a través de la interacción entre el segundo agente de unión y el analito ya unido;
- 65 (iv) exponer la mezcla obtenida en la etapa (iii) a un imán, en el que el soporte sólido es retenido en el imán; y

(v) medir la actividad de la quinasa reportera exógena retenida utilizando un procedimiento de ensayo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; preferiblemente, en el que el soporte sólido es una esfera magnética.

5 10. Procedimiento de validación de un procedimiento de tratamiento para reducir la cantidad o actividad de un agente biológico contaminante, que comprende las etapas de:
 (i) proporcionar una muestra que contiene, o se sospecha que contiene, un agente biológico contaminante;
 (ii) someter la muestra a un proceso de tratamiento en presencia de una cantidad definida de una quinasa reportera exógena, en el que la quinasa reportera exógena y el agente biológico contaminante se exponen ambos al proceso
 10 de tratamiento;
 (iii) medir la actividad residual de la quinasa reportera exógena utilizando un procedimiento de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
 (iv) comparar dicha actividad residual con una actividad de quinasa predeterminada, en el que la actividad de quinasa predeterminada corresponde a una reducción confirmada en la cantidad o actividad del agente biológico
 15 contaminante en las mismas condiciones;
 en el que el agente biológico contaminante se selecciona del grupo que consiste en bacterias, virus, esporas, toxinas, priones, proteínas y/o péptidos.

20 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el procedimiento se completa en menos de 15 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos o menos de 2 minutos.

25 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que antes de medir la actividad de la quinasa reportera exógena, la muestra se trata para eliminar sustancialmente el ATP y/o eliminar o inhibir sustancialmente quinasa que no es la quinasa reportera exógena.

30 13. Dispositivo de flujo lateral para utilizar en un ensayo para detectar la presencia de un analito en una muestra, que comprende:

una tira de soporte sobre la que encuentra una matriz de flujo alargada, en el que dicha matriz de flujo comprende:

(i) una zona de recepción de muestras que contiene una quinasa reportera exógena unida a la matriz de flujo a
 35 través de un enlazador que comprende un agente de unión que se une específicamente al analito;
 (ii) una zona de detección, que se encuentra aguas abajo de la zona de recepción de muestras, y que contiene una mezcla de ADP y un reactivo bioluminiscente; y
 (iii) una zona de reducción del ruido de fondo que comprende una o más de una sustancia, situada entre la zona de recepción de muestras y la zona de detección, que elimina o inhibe quinasa que no es quinasa reportera exógena presente en la muestra;

40 en el que, en uso, se aplica una muestra a la zona de recepción de muestras y el analito presente en la muestra desplaza la quinasa reportera exógena desde la matriz de flujo, dicha quinasa reportera exógena desplazada migra a través de la zona de reducción de ruido de fondo, en la que la quinasa que no es quinasa reportera exógena se elimina o inhibe sustancialmente, y a continuación, a la zona de detección en la que se detecta la generación de ATP.

45 14. Dispositivo, según la reivindicación 13, en el que la zona de reducción de ruido de fondo comprende una o más de una sustancia que inhibe o elimina sustancialmente quinasa que no es quinasa reportera exógena y/o ATP, tal como una ATPasa inmovilizada, una matriz de intercambio aniónico o catiónico, y/o una matriz de exclusión de tamaño.

50 15. Procedimiento de ensayo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, que comprende además la etapa de registrar los datos de emisión de luz obtenidos en la etapa (ii) en un soporte de datos adecuado.

Figura 1A

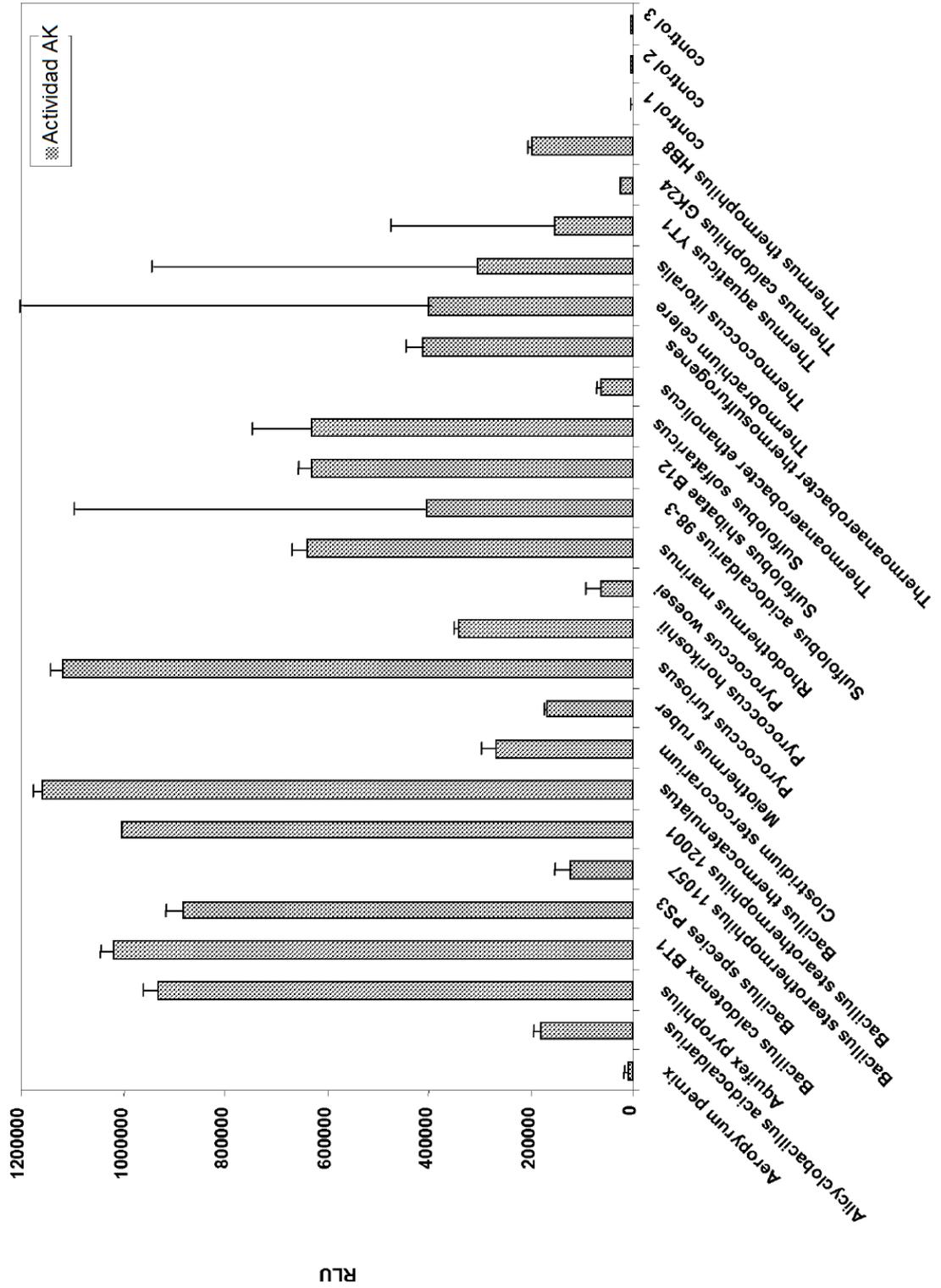


Figura 2

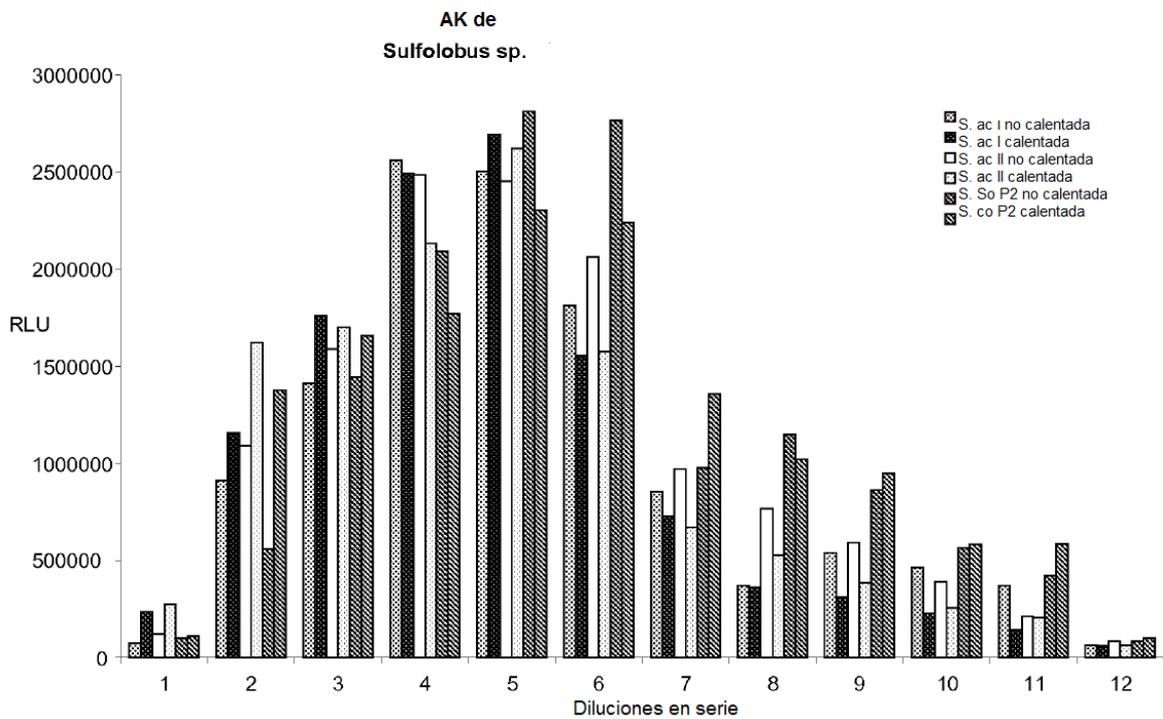
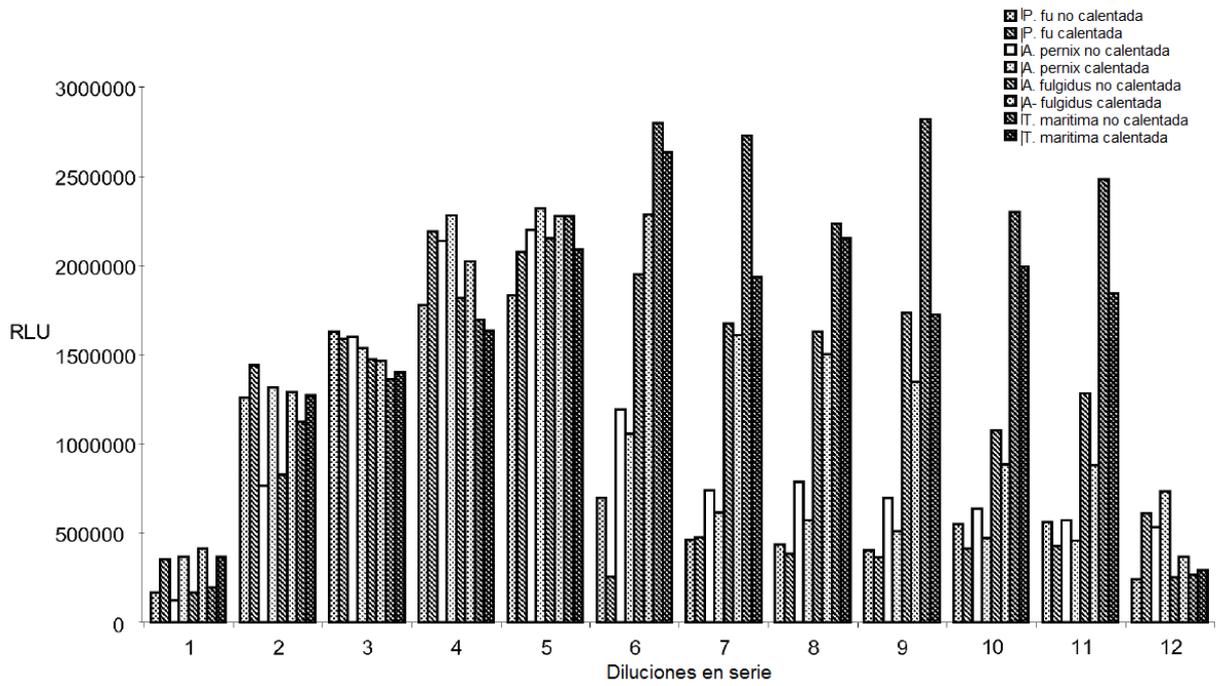


Figura 3A

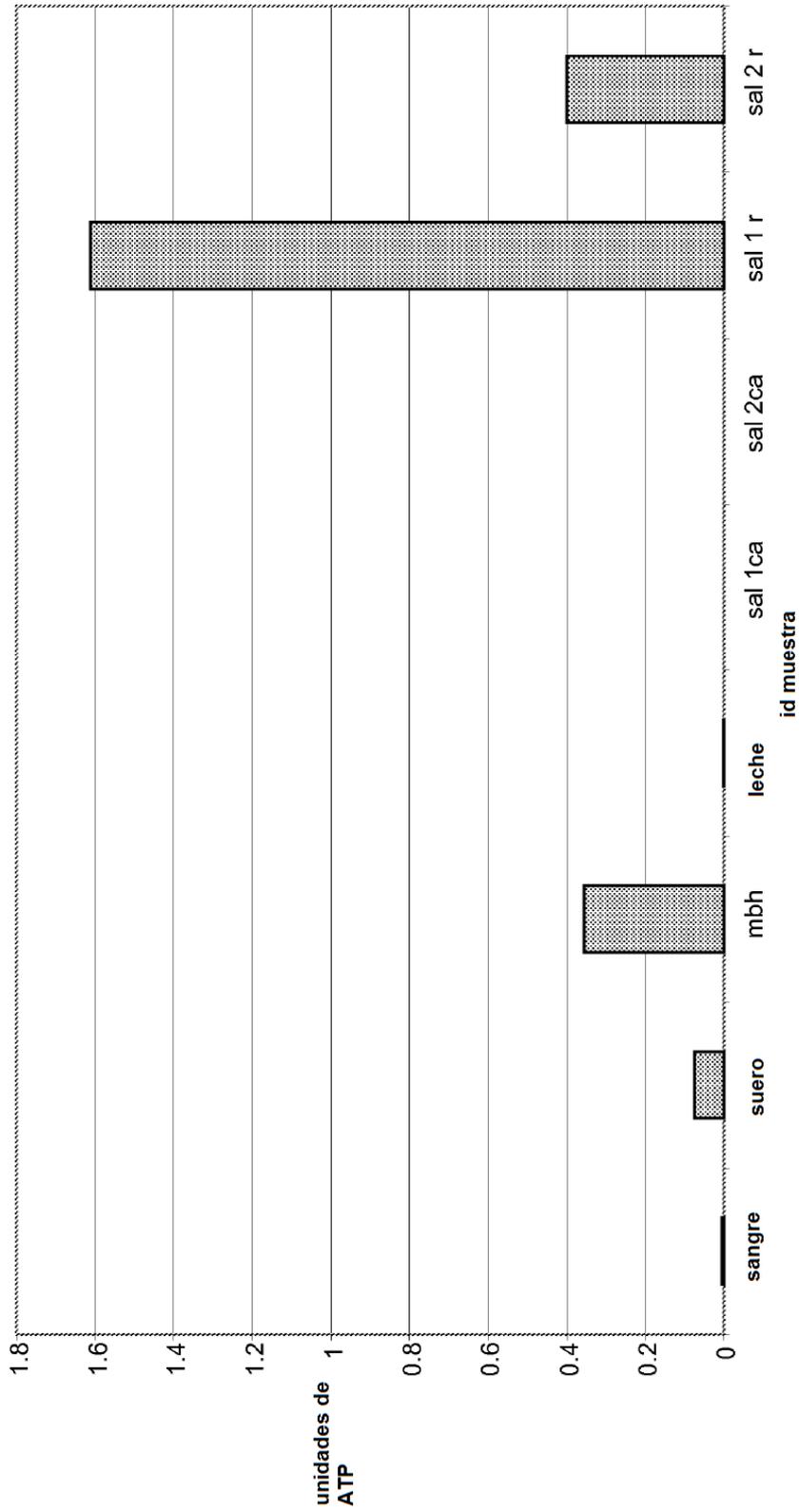


Figura 3B

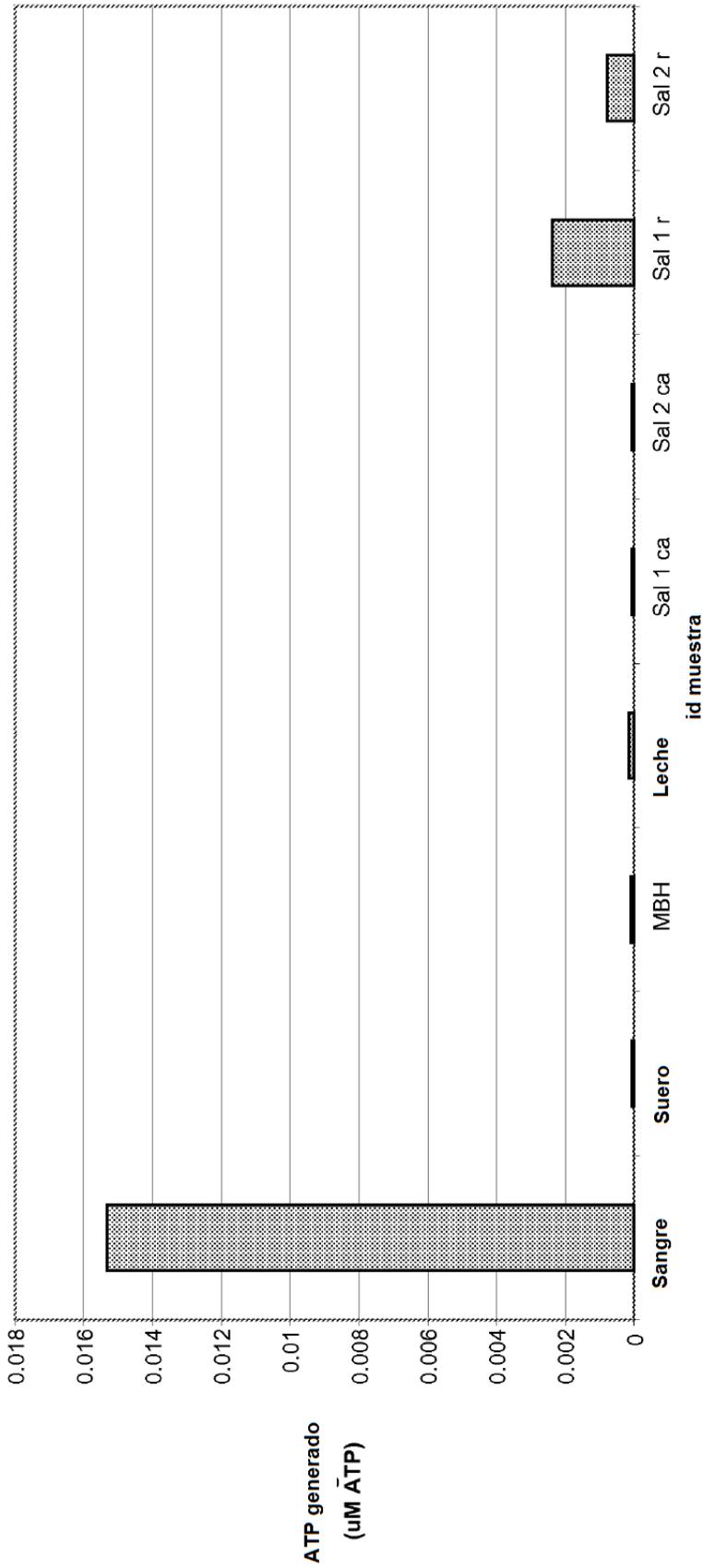


Figura 4A

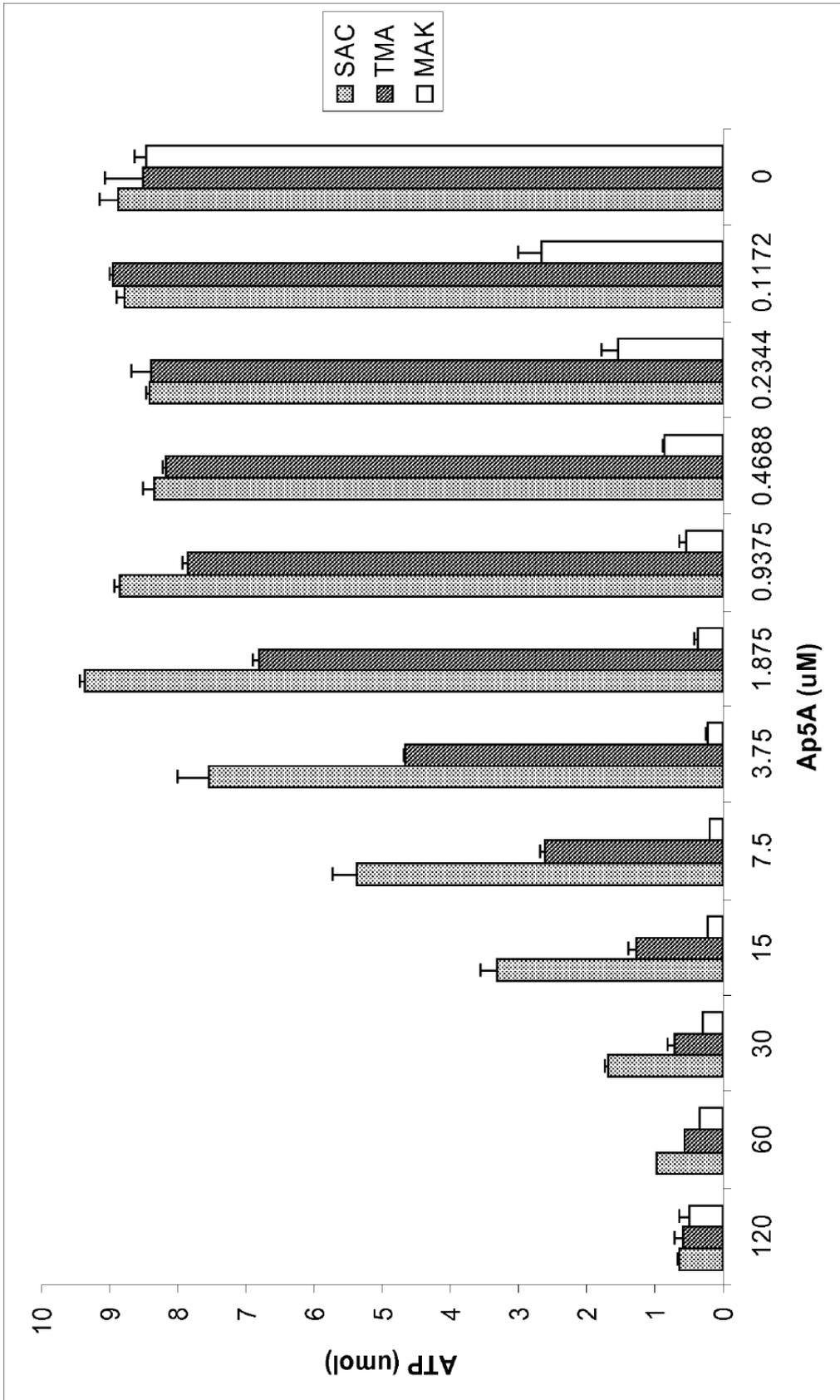


Figura 4B

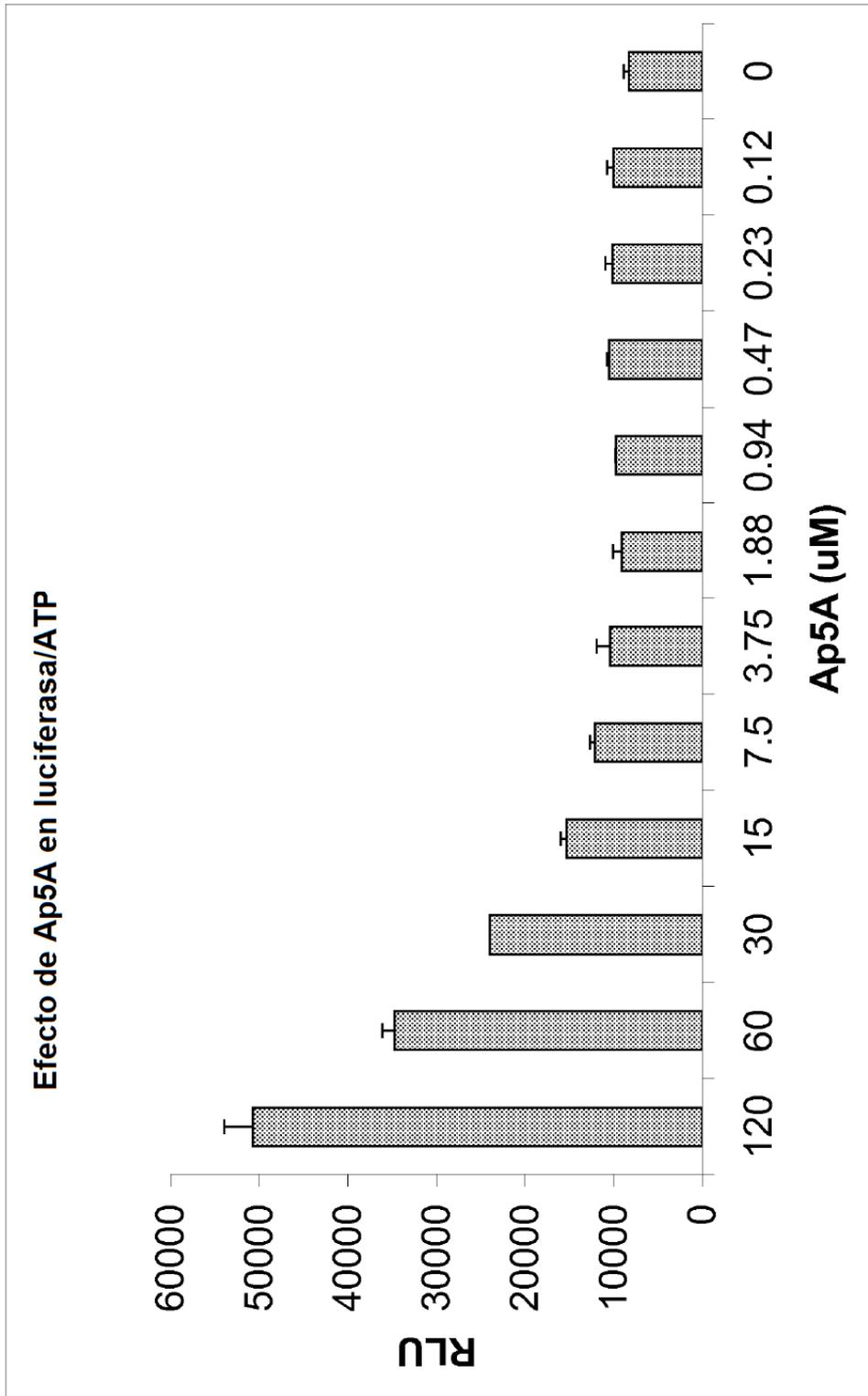


Figura 5

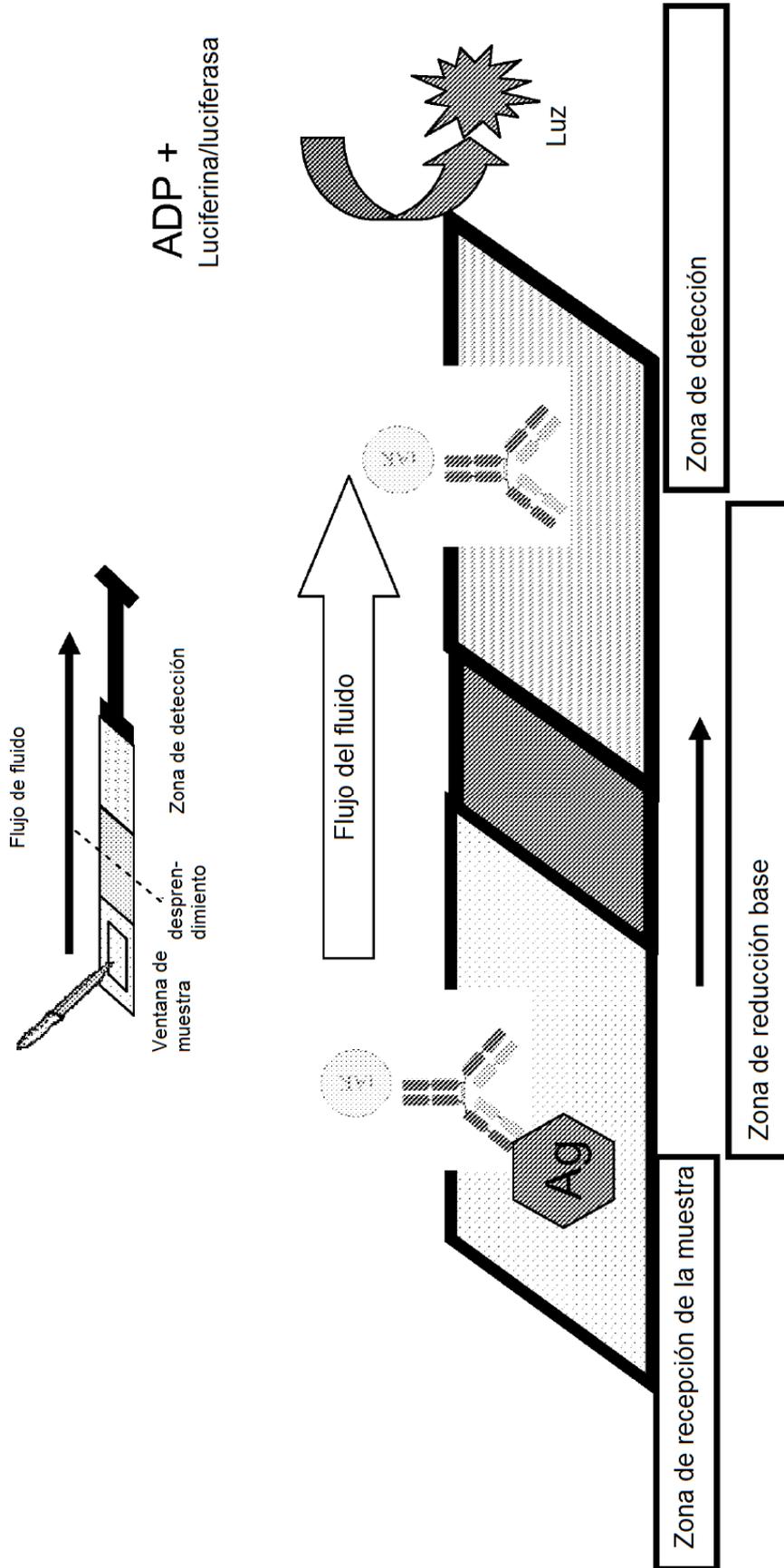


Figura 6

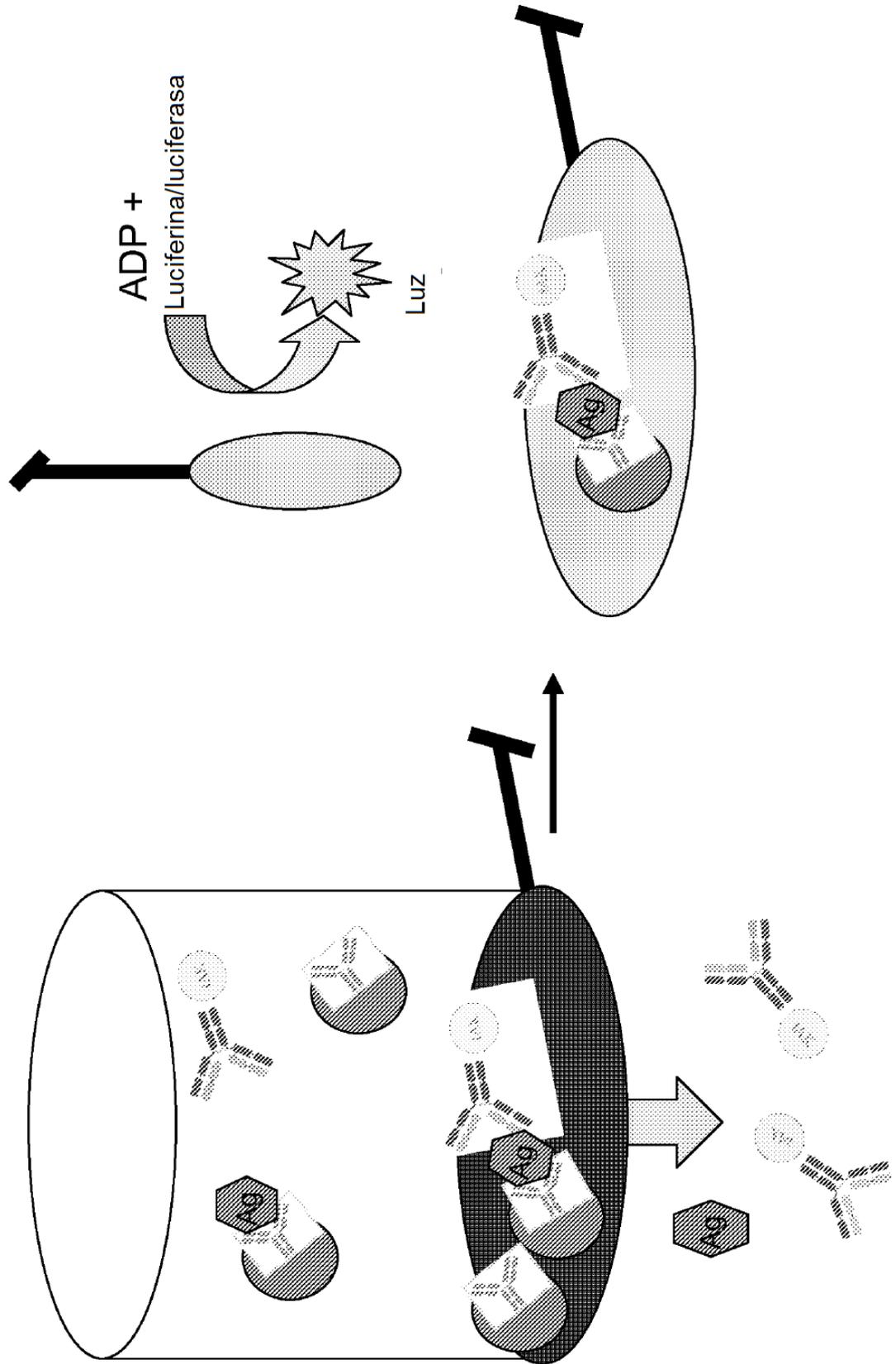
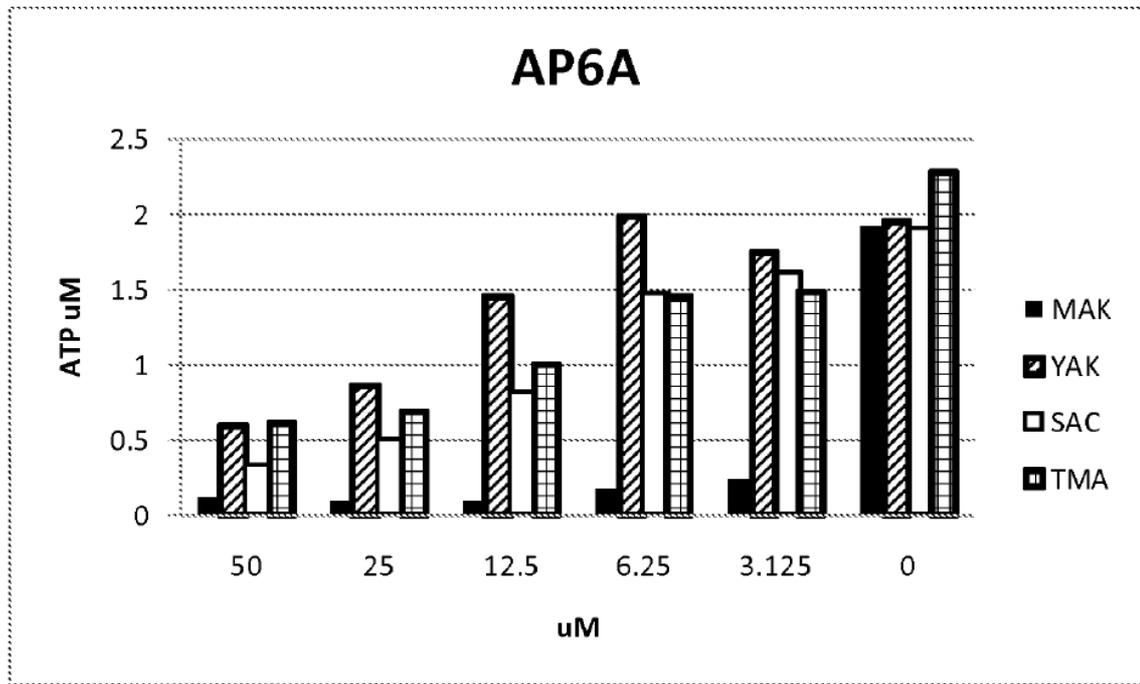


Figura 7A - Comparación de inhibición de adenilato quinazas por Ap6A



MAK = AK de músculo de conejo (mioquinasa) YAK = AK de levadura ; SAC = AK de *S. acidocladius*
 TMA = AK de *T. maritima*

Figura 7B Comparación de Ap5a y Ap6A para la inhibición de adenilato quinasa de base contaminante de células de mamífero (MAK) o de levadura (YAK)

