

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 387**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/86** (2006.01)  
**C12N 1/15** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/52** (2006.01)  
**C12P 13/22** (2006.01)  
**C12P 41/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2012 PCT/EP2012/072891**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072486**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2012 E 12787447 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2780451**

54 Título: **Mutantes de hidantoinasa**

30 Prioridad:

**16.11.2011 EP 11189395**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.02.2018**

73 Titular/es:

**EVONIK TECHNOCHEMIE GMBH (100.0%)  
Gutenbergstrasse 2  
69221 Dossenheim, DE**

72 Inventor/es:

**OSSWALD, STEFFEN;  
SCHUSTER, HEIKO;  
ROOS, JÜRGEN;  
KARAU, ANDREAS;  
SCHWANEBERG, ULRICH;  
MARTINEZ, RONNY;  
MUNDHADA, HEMANSHU y  
HOLTER, URSULA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 652 387 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

Mutantes de hidantoinasa.

5 La presente invención se refiere en general a hidantoinasas. Más en particular, la presente invención se refiere a una serie de hidantoinasas modificadas que presentan actividades enzimáticas aumentadas con respecto a hidantoinasas aisladas previamente, y a su uso en procedimientos para preparar aminoácidos, en particular a su uso en catalizadores de células enteras

Descripción de la técnica relacionada

10 Se conocen procedimientos para producir aminoácidos usando enzimas. Además, hay procedimientos que implican la descomposición asimétrica de compuestos de hidantoína 5-sustituida sintetizadas químicamente de modo económico como material de partida en aminoácidos ópticamente activos. Estos procedimientos de producción de aminoácidos ópticamente activos a partir de compuestos de hidantoína 5-sustituida son importantes, para la producción de preparaciones farmacéuticas, productos en la industria química, aditivos de alimentos, etc.

15 En este procedimiento de producción de aminoácidos a partir de compuestos de hidantoína 5-sustituida, son necesarias dos enzimas: (1) una enzima denominada hidantoinasa (enzima que hidroliza la hidantoína) que cataliza la reacción de formación de N-carbamoilaminoácido por transformación del compuesto de hidantoína 5-sustituida en el respectivo N-carbamoilaminoácido por hidrólisis; (2) una enzima denominada N-carbamoilaminoácido hidrolasa que cataliza la reacción de formación de un aminoácido ópticamente activo por transformación del N-carbamoilaminoácido mencionado antes en el respectivo aminoácido por hidrólisis.

20 Las enzimas que hidrolizan la hidantoína, que se denominarán aquí "hidantoinasas" comprenden una clase diversa de enzimas que tienen una amplia variedad de especificidades y funciones biológicas. Una propiedad importante de las hidantoinasas es su enantioselectividad que las hace valiosas para la producción de D o L-aminoácidos ópticamente puros. Para producir aminoácidos ópticamente puros a partir de compuestos de hidantoína 5-sustituida, la hidantoinasa y/o N-carbamoilaminoácido hidrolasa debe ser una enzima enantioselectiva. Se han descrito  
25 procedimientos de producción de L-aminoácidos por un microorganismo que produce L-aminoácidos o mediante materiales que contienen enzimas producidos por el microorganismo, en donde se han usado microorganismos de diversos géneros tales como *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Arthrobacter* (*J. Biotechnol.* 46, 63, 1996).

30 Se han aislado un gen de hidantoinasa y un gen de N-carbamoilaminoácido hidrolasa de un microorganismo del género *Arthrobacter*, y se han usado proteínas recombinantes codificadas por estos genes para producir L-aminoácidos.

35 En vista de la importancia de las hidantoinasas para la producción de aminoácidos ópticamente puros, ha habido un esfuerzo concentrado en desarrollar enzimas modificadas que tengan propiedades mejoradas con respecto a la producción de aminoácidos. Como resultado de este esfuerzo, se han aislado e identificado una serie de microorganismos que producen hidantoinasas con propiedades enzimáticas deseables. La patente de EE.UU. nº 5.516.660 describe cepas de *Arthrobacter sp.* que producen hidantoinasas que son capaces de producir L-alfa-aminoácidos a partir de D-, L- y/o D,L-5-monosustituidas-hidantoinas.

40 Un desarrollo más reciente es la producción de D y L-aminoácidos en una escala industrial a partir de la respectiva hidantoína usando la tecnología de catalizador de célula entera (documentos WO 2002/077212, WO 2004/042047, WO 2000/058449, WO 2003/042412). El catalizador contiene D-hidantoinasa, hidantoína racemasa y D-carbamoilasa coexpresados en un microorganismo tal como *E. coli*.

La solicitud de patente internacional WO 00/58449 describe mutantes de la hidantoinasa obtenidos a partir de *Arthrobacter* que dan como resultado un aumento de la actividad de aproximadamente 40%.

45 El ensayo de estos catalizadores convencionales derivados de *Arthrobacter sp.* disponibles, mostró que la producción de D-triptófano a partir de la respectiva triptófano-hidantoína es posible, pero con tasas de transformación muy bajas. La baja tasa de transformación se debe a la insuficiente propiedad de la hidantoinasa de *Arthrobacter sp.* de tipo natural para aceptar la hidantoína como sustrato.

50 El objetivo de la presente invención era proporcionar una hidantoinasa que tenga mayores tasas de transformación con respecto a la hidantoína 5-sustituida, preferiblemente la triptófano-hidantoína y un procedimiento para producir aminoácidos, preferiblemente D-triptófano, en particular partiendo de la L-triptófano-hidantoína usando hidantoína racemasa, hidantoinasa y carbamoilasa, preferiblemente coexpresadas en un hospedante *E. coli*.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención era proporcionar una hidantoinasa mejorada con tasas de transformación potenciadas con respecto a la triptófano-hidantoína. Además, podría ser beneficioso aumentar la enantioselectividad de la hidantoinasa.

Resumen de la presente invención

El objeto de la presente invención se resuelve mediante una hidantoinasa que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de (i) o (ii), con

5 (i) secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, o SEQ ID NO: 119,

15 (ii) secuencia de aminoácidos en donde en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, o SEQ ID NO: 119, de 1 a  $\varphi$  restos de aminoácidos se han sustituido, eliminado, insertado y/o añadido, en donde, sin embargo, se mantiene/mantienen la o las sustituciones de aminoácidos de las secuencias anteriores con respecto a las secuencias de referencia de SEQ ID NO: 1.

y en donde  $\varphi$  se define como  $\varphi = 75$ ,

25 y en donde además la actividad catalítica de la hidantoinasa es mayor en un factor de al menos  $\zeta$  que la actividad catalítica de la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1,

y en donde  $\zeta$  se define como  $\zeta = 1,2$ ,

30 y en donde la actividad catalítica de una hidantoinasa debe entenderse como la actividad catalítica de esta enzima con respecto a la transformación de un compuesto de D-hidantoína 5-sustituida al correspondiente D-carbamoilaminoácido.

35 En el contexto de la presente invención, la enantioselectividad de una hidantoinasa se define como la relación de  $D_{act}/L_{act}$ , con  $D_{act}$  = la actividad catalítica de esta enzima para la transformación de compuestos de D-hidantoína 5-sustituida en los correspondientes D-carbamoilaminoácidos, y  $L_{act}$  = la actividad catalítica de esta enzima para la transformación de los enantiómeros de los compuestos de D-hidantoína 5-sustituida en los enantiómeros de los correspondientes D-carbamoilaminoácidos, en otras palabras,  $L_{act}$  = la actividad catalítica de esta enzima para la transformación de los correspondientes compuestos de L-hidantoína 5-sustituida en los correspondientes L-carbamoilaminoácidos.

En el contexto de la presente invención, el término adición de aminoácidos significa la adición de restos de aminoácidos en el extremo N o extremo C de un polipéptido.

40 En realizaciones preferidas de la presente invención  $\varphi$  se selecciona de 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1.

En realizaciones preferidas adicionales de la presente invención  $\zeta$  se selecciona de 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 o 30.

En realizaciones preferidas adicionales de la presente invención  $\varphi$  y  $\zeta$  se seleccionan como sigue:

45  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 60$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 30$ ,

50  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 40$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 30$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 30$

$y \zeta = 20, \varphi = 30 \text{ y } \zeta = 25, \varphi = 30 \text{ y } \zeta = 30,$

$\varphi = 20 \text{ y } \zeta = 1,5, \varphi = 20 \text{ y } \zeta = 2, \varphi = 20 \text{ y } \zeta = 3, \varphi = 20 \text{ y } \zeta = 4, \varphi = 20 \text{ y } \zeta = 5, \varphi = 20 \text{ y } \zeta = 10, \varphi = 20 \text{ y } \zeta = 15, \varphi = 20 \text{ y } \zeta = 20, \varphi = 20 \text{ y } \zeta = 25, \varphi = 20 \text{ y } \zeta = 30,$

5  $\varphi = 10 \text{ y } \zeta = 1,5, \varphi = 10 \text{ y } \zeta = 2, \varphi = 10 \text{ y } \zeta = 3, \varphi = 10 \text{ y } \zeta = 4, \varphi = 10 \text{ y } \zeta = 5, \varphi = 10 \text{ y } \zeta = 10, \varphi = 10 \text{ y } \zeta = 15, \varphi = 10 \text{ y } \zeta = 20, \varphi = 10 \text{ y } \zeta = 25, \varphi = 10 \text{ y } \zeta = 30,$

$\varphi = 9 \text{ y } \zeta = 1,5, \varphi = 9 \text{ y } \zeta = 2, \varphi = 9 \text{ y } \zeta = 3, \varphi = 9 \text{ y } \zeta = 4, \varphi = 9 \text{ y } \zeta = 5, \varphi = 9 \text{ y } \zeta = 10, \varphi = 9 \text{ y } \zeta = 15, \varphi = 9 \text{ y } \zeta = 20, \varphi = 9 \text{ y } \zeta = 25, \varphi = 9 \text{ y } \zeta = 30,$

$\varphi = 8 \text{ y } \zeta = 1,5, \varphi = 8 \text{ y } \zeta = 2, \varphi = 8 \text{ y } \zeta = 3, \varphi = 8 \text{ y } \zeta = 4, \varphi = 8 \text{ y } \zeta = 5, \varphi = 8 \text{ y } \zeta = 10, \varphi = 8 \text{ y } \zeta = 15, \varphi = 8 \text{ y } \zeta = 20, \varphi = 8 \text{ y } \zeta = 25, \varphi = 8 \text{ y } \zeta = 30,$

10  $\varphi = 7 \text{ y } \zeta = 1,5, \varphi = 7 \text{ y } \zeta = 2, \varphi = 7 \text{ y } \zeta = 3, \varphi = 7 \text{ y } \zeta = 4, \varphi = 7 \text{ y } \zeta = 5, \varphi = 7 \text{ y } \zeta = 10, \varphi = 7 \text{ y } \zeta = 15, \varphi = 7 \text{ y } \zeta = 20, \varphi = 7 \text{ y } \zeta = 25, \varphi = 7 \text{ y } \zeta = 30,$

$\varphi = 6 \text{ y } \zeta = 1,5, \varphi = 6 \text{ y } \zeta = 2, \varphi = 6 \text{ y } \zeta = 3, \varphi = 6 \text{ y } \zeta = 4, \varphi = 6 \text{ y } \zeta = 5, \varphi = 6 \text{ y } \zeta = 10, \varphi = 6 \text{ y } \zeta = 15, \varphi = 6 \text{ y } \zeta = 20, \varphi = 6 \text{ y } \zeta = 25, \varphi = 6 \text{ y } \zeta = 30,$

15  $\varphi = 5 \text{ y } \zeta = 1,5, \varphi = 5 \text{ y } \zeta = 2, \varphi = 5 \text{ y } \zeta = 3, \varphi = 5 \text{ y } \zeta = 4, \varphi = 5 \text{ y } \zeta = 5, \varphi = 5 \text{ y } \zeta = 10, \varphi = 5 \text{ y } \zeta = 15, \varphi = 5 \text{ y } \zeta = 20, \varphi = 5 \text{ y } \zeta = 25, \varphi = 5 \text{ y } \zeta = 30,$

$\varphi = 4 \text{ y } \zeta = 1,5, \varphi = 4 \text{ y } \zeta = 2, \varphi = 4 \text{ y } \zeta = 3, \varphi = 4 \text{ y } \zeta = 4, \varphi = 4 \text{ y } \zeta = 5, \varphi = 4 \text{ y } \zeta = 10, \varphi = 4 \text{ y } \zeta = 15, \varphi = 4 \text{ y } \zeta = 20, \varphi = 4 \text{ y } \zeta = 25, \varphi = 4 \text{ y } \zeta = 30,$

$\varphi = 3 \text{ y } \zeta = 1,5, \varphi = 3 \text{ y } \zeta = 2, \varphi = 3 \text{ y } \zeta = 3, \varphi = 3 \text{ y } \zeta = 4, \varphi = 3 \text{ y } \zeta = 5, \varphi = 3 \text{ y } \zeta = 10, \varphi = 3 \text{ y } \zeta = 15, \varphi = 3 \text{ y } \zeta = 20, \varphi = 3 \text{ y } \zeta = 25, \varphi = 3 \text{ y } \zeta = 30,$

20  $\varphi = 2 \text{ y } \zeta = 1,5, \varphi = 2 \text{ y } \zeta = 2, \varphi = 2 \text{ y } \zeta = 3, \varphi = 2 \text{ y } \zeta = 4, \varphi = 2 \text{ y } \zeta = 5, \varphi = 2 \text{ y } \zeta = 10, \varphi = 2 \text{ y } \zeta = 15, \varphi = 2 \text{ y } \zeta = 20, \varphi = 2 \text{ y } \zeta = 25, \varphi = 2 \text{ y } \zeta = 30,$

$\varphi = 1 \text{ y } \zeta = 1,5, \varphi = 1 \text{ y } \zeta = 2, \varphi = 1 \text{ y } \zeta = 3, \varphi = 1 \text{ y } \zeta = 4, \varphi = 1 \text{ y } \zeta = 5, \varphi = 1 \text{ y } \zeta = 10, \varphi = 1 \text{ y } \zeta = 15, \varphi = 1 \text{ y } \zeta = 20, \varphi = 1 \text{ y } \zeta = 25, \zeta = 1 \text{ y } \zeta = 30.$

25 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan hidantoinasas (enzimas que hidrolizan hidantoína) modificadas que tienen mayor actividad catalítica comparada con la hidantoinasa de tipo natural producida por el microorganismo *Arthrobacter sp.* Las hidantoinasas de la presente invención, pueden tener además mayor enantioselectividad comparadas con la hidantoinasa de tipo natural producida por el microorganismo *Arthrobacter sp.* Las hidantoinasas de acuerdo con la presente invención presentan tasas de transformación potenciadas con respecto a los compuestos de hidantoína 5-sustituida, en particular de D-triptófano-hidantoína, y por lo tanto son adecuadas en procedimientos para la producción de D-aminoácidos. Dichos procedimientos preferiblemente son adecuados para la producción de D-triptófano partiendo de la respectiva triptófano-hidantoína, en particular usando D-hidantoinasa, D-carbamoilasa y opcionalmente hidantoína racemasa. Estas enzimas preferiblemente son coexpresadas en un microorganismo tal como *E. coli*. En este procedimiento de producción de aminoácidos a partir de compuestos de hidantoína 5-sustituida, la hidantoinasa cataliza la reacción de formación de N-carbamoilaminoácido por hidrólisis de compuestos de hidantoína 5-sustituida, preferiblemente (D-triptófano-hidantoína), para dar los respectivos N-carbamoilaminoácidos (preferiblemente N-carbamoil-D-triptófano). Este N-carbamoilaminoácido es hidrolizado por la N-carbamoilaminoácido hidrolasa para formar el respectivo aminoácido (preferiblemente D-triptófano).

40 Para la preparación de triptófano, también se puede usar como material de partida D,L-triptófano-hidantoína o L-triptófano-hidantoína, en donde en particular la presencia de la hidantoína racemasa es favorable con el fin de proporcionar el sustrato D-triptófano-hidantoína para la hidantoinasa de la presente invención. Dicho procedimiento preferiblemente es adecuado para la producción de D-triptófano partiendo de la respectiva D,L- o L-triptófano-hidantoína en particular usando hidantoína racemasa, D-hidantoinasa y D-carbamoilasa. Estas tres enzimas preferiblemente son coexpresadas en un microorganismo tal como *E. coli*.

45 El experto en la técnica entiende que la información dada con respecto a una posición de aminoácido específica (p. ej. 152) de una secuencia de referencia específica, se puede transferir a hidantoinasas variantes y secuencias de aminoácidos homólogas: el experto en la técnica es capaz de alinear la secuencia de aminoácidos de referencia con una secuencia variante y determinar la correspondiente posición (p. ej. posición de aminoácido 152) en la secuencia variante. En relación con este ejemplo, el experto en la técnica entiende que en la secuencia variante la posición del aminoácido que corresponde a la posición de aminoácidos 152 de la secuencia de referencia, puede no ser necesariamente el resto de aminoácidos 152 de la secuencia de aminoácidos variante, sin embargo, tiene todavía la misma posición en la estructura tridimensional de la enzima variante. Los métodos de alineación de secuencias de aminoácidos se describen con más detalle más adelante. Se pueden usar otros métodos con el fin de determinar las correspondientes posiciones en una secuencia variante comparada con la secuencia de referencia.

## Descripción de las figuras

La figura 1 muestra el plásmido pAS6-HyuH que contiene el gen de tipo natural *hyuH* que expresa una hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y un gen que expresa D-carbamoilasa que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4. Las abreviaturas indicadas en el mapa de plásmido indican los siguientes elementos:  
 5 D-Carb. = gen de D-carbamoilasa NRRL, *Agrobacterium sp.*; *rhaP* = promotor de ramnosa; *hyuH* = hidantoinasa DSM9771; *rrnB* = terminador de la transcripción; *bla* = beta-lactamasa; *ori* = origen de replicación ColEI.

## Descripción de las secuencias

En el contexto de la presente invención, las variantes de secuencias de polipéptidos a veces se describen indicando cada sustitución de aminoácido presente en la secuencia variante en comparación con la secuencia original en el formato AA1XAA2, en donde AA1 indica el resto de aminoácido presente en la posición X en la secuencia original y AA2 indica el resto de aminoácido presente en la posición X en la secuencia de la variante.  
 10

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de aminoácidos de hidantoinasa de tipo natural de *Arthrobacter sp.*

La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la hidantoinasa de tipo natural de *Arthrobacter sp.*

15 La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la hidantoinasa racemasa de tipo natural de *Arthrobacter sp.*

La SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de D-carbamoilasa de tipo natural de *Arthrobacter sp.*

La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos como referencia, en donde los restos de aminoácidos X en las posiciones 152, 64, 71, 72, 95, 154, 181, 284, 285, 398 y 452 se definen de acuerdo con las reivindicaciones y el resto de aminoácido en la posición 152 representa cualquier resto de aminoácido distinto de alanina.  
 20

La SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la alanina en la posición 152 se ha sustituido por glicina.

La SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la alanina en la posición 152 se ha sustituido por cisteína.

25 La SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la alanina en la posición 152 se ha sustituido por serina.

La SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la alanina en la posición 152 se ha sustituido por treonina.

30 La SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la alanina en la posición 152 se ha sustituido por valina.

La SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la alanina en la posición 152 se ha sustituido por serina y la valina en la posición 154 se ha sustituido por isoleucina.

La SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la alanina en la posición 152 se ha sustituido por valina y la valina en la posición 154 se ha sustituido por cisteína.

35 La SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la alanina en la posición 152 se ha sustituido por cisteína y la valina en la posición 154 se ha sustituido por serina.

La SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la arginina en la posición 71 se ha sustituido por asparagina y la tirosina en la posición 72 se ha sustituido por histidina y la alanina en la posición 152 se ha sustituido por serina.

40 La SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la arginina en la posición 71 se ha sustituido por asparagina y la tirosina en la posición 72 se ha sustituido por arginina y la alanina en la posición 152 se ha sustituido por serina.

La SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la arginina en la posición 71 se ha sustituido por valina y la tirosina en la posición 72 se ha sustituido por arginina y la alanina en la posición 152 se ha sustituido por serina.  
 45

La SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la arginina en la posición 71 se ha sustituido por serina y la tirosina en la posición 72 se ha sustituido por arginina y la alanina en la posición 152 se ha sustituido por cisteína y la valina en la posición 154 se ha sustituido por serina y la valina en la posición 181 se ha sustituido por alanina.

- La SEQ ID NO: 18 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la arginina en la posición 71 se ha sustituido por tirosina y la tirosina en la posición 72 se ha sustituido por arginina y la alanina en la posición 152 se ha sustituido por serina.
- 5 La SEQ ID NO: 19 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la arginina en la posición 71 se ha sustituido por leucina y la alanina en la posición 152 se ha sustituido por cisteína y la valina en la posición 154 se ha sustituido por serina.
- La SEQ ID NO: 20 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa en donde la arginina en la posición 71 se ha sustituido por tirosina y la tirosina en la posición 72 se ha sustituido por histidina y la alanina en la posición 152 se ha sustituido por serina.
- 10 Las SEQ ID NO: 21 a 72 muestran las secuencias de cebadores para la mutagénesis de una diversidad de posiciones de aminoácidos de la hidantoinasa como se indica en la tabla 1.
- La SEQ ID NO: 73 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva la siguiente sustitución comparada con la SEQ ID NO: 1: I95H.
- 15 La SEQ ID NO: 74 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva la siguiente sustitución comparada con la SEQ ID NO: 1: V154G.
- La SEQ ID NO: 75 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva la siguiente sustitución comparada con la SEQ ID NO: 1: V154N.
- La SEQ ID NO: 76 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva la siguiente sustitución comparada con la SEQ ID NO: 1: R71D.
- 20 La SEQ ID NO: 77 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva la siguiente sustitución comparada con la SEQ ID NO: 1: R71E.
- La SEQ ID NO: 78 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva la siguiente sustitución comparada con la SEQ ID NO: 1: V284F.
- 25 La SEQ ID NO: 79 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva la siguiente sustitución comparada con la SEQ ID NO: 1: V154A.
- La SEQ ID NO: 80 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva la siguiente sustitución comparada con la SEQ ID NO: 1: I64T.
- La SEQ ID NO: 81 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva la siguiente sustitución comparada con la SEQ ID NO: 1: I64V.
- 30 La SEQ ID NO: 82 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva la siguiente sustitución comparada con la SEQ ID NO: 1: V154S.
- La SEQ ID NO: 83 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: V154A, T398A, H452L.
- 35 La SEQ ID NO: 90 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: I64V, R71I, Y72N, A152S.
- La SEQ ID NO: 91 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: I64C, R71Y, Y72N, A152S.
- La SEQ ID NO: 92 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: I64C, R71D, Y72H, A152S.
- 40 La SEQ ID NO: 93 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: I64C, R71D, Y72H, A152S, F448L.
- La SEQ ID NO: 94 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: I64C, R71D, Y72H, A152S, M417V.
- 45 La SEQ ID NO: 95 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14G, I64C, R71D, Y72H, A152S.
- La SEQ ID NO: 96 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S37R, I64C, R71D, Y72H, A152S.
- La SEQ ID NO: 97 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes

sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14G, I64C, R71D, Y72H, A152S, E358K.

La SEQ ID NO: 98 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S37R, I64C, R71D, Y72H, A152S, V318A.

5 La SEQ ID NO: 99 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S37R, I64C, R71D, Y72H, A152S, N303S, Q404R.

La SEQ ID NO: 100 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14G, I64C, R71D, Y72H, A152S, N70D.

La SEQ ID NO: 101 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14G, I64C, R71D, Y72H, A152S, V154A.

10 La SEQ ID NO: 102 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S.

La SEQ ID NO: 103 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14A, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S.

15 La SEQ ID NO: 104 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14V, I64C, R71D, Y72H, A152S.

La SEQ ID NO: 105 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14G, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S.

La SEQ ID NO: 106 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14A, S37W, I64C, R71D, Y72H, A152S.

20 La SEQ ID NO: 107 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14A, S37V, I64C, R71D, Y72H, A152S.

La SEQ ID NO: 108 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: D15N, I64C, R71D, Y72H, A152S.

25 La SEQ ID NO: 109 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14V, S37R, I64C, R71D, Y72H, A152S.

La SEQ ID NO: 110 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: D15N, I64C, R71D, Y72H, A152S, V154C.

La SEQ ID NO: 111 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: D15N, I64C, R71D, Y72H, A152S, V154I.

30 La SEQ ID NO: 112 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14P, D15G, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S.

La SEQ ID NO: 113 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14G, D15R, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S.

35 La SEQ ID NO: 114 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14G, D15Q, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S.

La SEQ ID NO: 115 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14F, D15A, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S.

La SEQ ID NO: 116 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: D15S, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S.

40 La SEQ ID NO: 117 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14P, D15G, S37G, R71D, Y72H, A152S.

La SEQ ID NO: 118 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: S14P, D15G, S37G, I64C, R71D, Y72H.

45 La SEQ ID NO: 119 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante de hidantoinasa que lleva las siguientes sustituciones comparadas con la SEQ ID NO: 1: D15S, S37G, I64C, R71D, Y72H.

Descripción detallada de la presente invención

Como se ha descrito antes, la presente invención proporciona nuevas hidantoinasas derivadas de la hidantoinasa de tipo natural que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 de *Arthrobacter sp.* con mayor actividad catalítica y opcionalmente mayor enantioselectividad para sustratos de D-hidantoína 5-sustituida, en particular para D-triptófano-hidantoína.

5 Las hidantoinasas de acuerdo con la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de (i) o (ii), con

(i) secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, o SEQ ID NO: 119,

(ii) secuencia de aminoácidos en donde en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, o SEQ ID NO: 119, de 1 a  $\varphi$  restos de aminoácidos se han sustituido, eliminado, insertado y/o añadido, en donde, sin embargo, se mantiene/mantienen la o las sustituciones de aminoácidos de las secuencias anteriores con respecto a las secuencias de referencia de SEQ ID NO: 1.

y en donde  $\varphi$  se define como  $\varphi = 75$ ,

y en donde además la actividad catalítica de la hidantoinasa es mayor en un factor de al menos  $\zeta$  que la actividad catalítica de la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1,

y en donde  $\zeta$  se define como  $\zeta = 1,2$ , y en donde

la actividad catalítica de una hidantoinasa se define como la actividad catalítica de esta enzima con respecto a la transformación de compuestos de D-hidantoína 5-sustituida en el correspondiente D-carbamoilaminoácido.

En el contexto de la presente invención, la enantioselectividad de una hidantoinasa se define como la relación de  $D_{act}/L_{act}$ , con  $D_{act}$  = la actividad catalítica de esta enzima para la transformación de compuestos de D-hidantoína 5-sustituida en los correspondientes D-carbamoilaminoácidos, y  $L_{act}$  = la actividad catalítica de esta enzima para la transformación de los enantiómeros de los compuestos de D-hidantoína 5-sustituida en los enantiómeros de los correspondientes D-carbamoilaminoácidos, en otras palabras,  $L_{act}$  = la actividad catalítica de esta enzima para la transformación de los correspondientes compuestos de L-hidantoína 5-sustituida en los correspondientes L-carbamoilaminoácidos.

En realizaciones preferidas de la presente invención  $\varphi$  se selecciona de 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1.

En realizaciones preferidas adicionales de la presente invención  $\zeta$  se selecciona de 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 o 30.

En realizaciones preferidas adicionales de la presente invención  $\varphi$  y  $\zeta$  se seleccionan como sigue:

$\varphi = 70$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 70$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 60$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 60$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 50$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 50$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 40$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 40$  y  $\zeta = 30$ ,



$\varphi = 30$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 30$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 20$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 20$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 20$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 20$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 20$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 20$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 20$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 20$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 20$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 20$  y  $\zeta = 30$ ,

5  $\varphi = 10$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 10$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 10$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 10$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 10$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 10$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 10$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 10$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 10$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 10$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 9$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 9$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 9$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 9$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 9$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 9$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 9$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 9$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 9$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 9$  y  $\zeta = 30$ ,

10  $\varphi = 8$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 8$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 8$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 8$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 8$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 8$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 8$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 8$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 8$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 8$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 7$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 7$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 7$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 7$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 7$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 7$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 7$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 7$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 7$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 7$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 6$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 6$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 6$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 6$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 6$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 6$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 6$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 6$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 6$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 6$  y  $\zeta = 30$ ,

15  $\varphi = 5$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 5$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 5$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 5$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 5$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 5$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 5$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 5$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 5$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 5$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 4$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 4$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 4$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 4$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 4$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 4$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 4$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 4$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 4$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 4$  y  $\zeta = 30$ ,

20  $\varphi = 3$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 3$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 3$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 3$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 3$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 3$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 3$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 3$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 3$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 3$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 2$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 2$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 2$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 2$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 2$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 2$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 2$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 2$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 2$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 2$  y  $\zeta = 30$ ,

$\varphi = 1$  y  $\zeta = 1,5$ ,  $\varphi = 1$  y  $\zeta = 2$ ,  $\varphi = 1$  y  $\zeta = 3$ ,  $\varphi = 1$  y  $\zeta = 4$ ,  $\varphi = 1$  y  $\zeta = 5$ ,  $\varphi = 1$  y  $\zeta = 10$ ,  $\varphi = 1$  y  $\zeta = 15$ ,  $\varphi = 1$  y  $\zeta = 20$ ,  $\varphi = 1$  y  $\zeta = 25$ ,  $\varphi = 1$  y  $\zeta = 30$ .

25 En otra realización de la presente invención, la hidantoinasa de la presente invención tiene una identidad de al menos 80%, o tiene una secuencia de aminoácidos que comprende eliminación, sustitución, inserción y/o adición de un máximo de 90 restos de aminoácidos, en comparación con una hidantoinasa que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;

30 en donde los restos de aminoácidos en las posiciones 152, 64, 71, 72, 95, 154, 181, 284, 285, 398 y 452 se definen como X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398 y X452 y en donde estos restos de aminoácidos se seleccionan como sigue:

X152 = cualquier resto de aminoácido distinto de alanina;

X64 = cualquier resto de aminoácido;

X71 = cualquier resto de aminoácido;

35 X72 = cualquier resto de aminoácido;

X95 = cualquier resto de aminoácido;

X154 = cualquier resto de aminoácido;

X181 = cualquier resto de aminoácido;

X284 = cualquier resto de aminoácido;

40 X285 = cualquier resto de aminoácido;

X398 = cualquier resto de aminoácido;

X452 = cualquier resto de aminoácido;

y en donde además la actividad catalítica de la hidantoinasa es mayor en un factor de al menos 1,2 que la actividad catalítica de la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

45 En una realización preferida, la actividad catalítica es mayor en un factor de al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 o

30 que la actividad catalítica de la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

5 En otra realización preferida, la enantioselectividad de la D-hidantoína es mayor en un factor de al menos 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 100 o 150 que la enantioselectividad de la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. En una realización incluso más preferida, la enantioselectividad de la hidantoinasa para la D-5-indolilmetilhidantoína (D-triptófano-hidantoína) se ha aumentado al menos en un factor de 1,2, preferiblemente al menos un factor de 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 100 o 150, comparado con la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

10 El experto en la técnica entiende que las variantes de la hidantoinasa como se describen en la presente memoria también están incluidas en el alcance de la presente invención. Estas variantes de hidantoinasas tienen una identidad de al menos 80%, o tienen una secuencia de aminoácidos que comprende eliminación, sustitución, inserción y/o adición de un máximo de 90 restos de aminoácidos, en comparación con una hidantoinasa que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5, respectivamente. En estas variantes, se mantiene/mantienen la o las sustituciones de aminoácidos específicas con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5, respectivamente) de acuerdo con la invención.

15 Además, se proporcionan derivados de las proteínas mencionadas antes que tienen actividad de hidantoinasa, cuyos derivados tienen al menos 80% de identidad, preferiblemente al menos 85% de identidad, más preferido al menos 90% de identidad, todavía más preferido al menos 95% de identidad, más preferido al menos 96% de identidad, más preferido al menos 97% de identidad, todavía más preferido al menos 98% de identidad y lo más preferido al menos 99% de identidad con la SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, respectivamente. Como se ha señalado antes, en estas variantes, se mantienen la o las sustituciones de aminoácidos de acuerdo con la presente invención con respecto a la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5, respectivamente).

25 Además, se proporcionan derivados de las proteínas mencionadas antes que tienen actividad de hidantoinasa, cuyos derivados están representados por una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la eliminación, sustitución, inserción y/o adición de un máximo de 90 restos de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. Como se ha señalado antes, en estas variantes, se mantienen la o las sustituciones de aminoácidos de acuerdo con la presente invención con respecto a la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5, respectivamente).

30 La presente invención se refiere también a hidantoinasas variantes que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende la eliminación, sustitución, inserción y/o adición de un máximo de 90 restos de aminoácidos. El alcance de "un máximo de 90 restos de aminoácidos" en la frase "que comprende la eliminación, sustitución, inserción y/o adición de un máximo de 90 restos de aminoácidos" usada en la presente memoria, puede estar limitado a un máximo de 70, preferido un máximo de 45, más preferido un máximo de 40, más preferido un máximo de 35, más preferido un máximo de 30, todavía más preferido un máximo de 25, incluso más preferido un máximo de 20, más preferido un máximo de 15, todavía más preferido un máximo de 10 y lo más preferido un máximo de 5 restos de aminoácidos. La expresión de "un máximo de 90 restos de aminoácidos" en la frase "que comprende la eliminación, sustitución, inserción y/o adición de un máximo de 90 restos de aminoácidos" usada en la presente memoria, significa preferiblemente de 1 a 70, preferido de 1 a 45, más preferido de 1 a 40, más preferido de 1 a 35, más preferido de 1 a 30, todavía más preferido de 1 a 25, incluso además preferido de 1 a 20, más preferido de 1 a 15, todavía más preferido de 1 a 10 y lo más preferido de 1 a 5 restos de aminoácidos. El término "adición" significa la adición N-terminal o C-terminal de restos de aminoácidos con respecto a las secuencias mencionadas antes.

35 Además, se proporcionan fragmentos de las proteínas mencionadas antes que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, respectivamente, que tienen actividad de hidantoinasa, en donde preferiblemente el fragmento contiene al menos 300, más preferido al menos 350 y particularmente preferido al menos 400 y lo más preferido al menos 450 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, respectivamente, o sus derivados como se han definido antes.

45 En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

50 X152 = Cys, Gly, Ser, Thr o Val;

X64 = Ile, Thr o Val;

X71 = Arg, Gin, Asp, Glu, Val, Ser, Tyr o Leu;

X72 = Tyr, His o Asn;

X95 = Ile o His;

55 X154 = Val, Ala, Cys, Gly, Ile, Asn o Ser;

X181 = Val o Ala;

X284 = Val o Phe;

X285 = Ala o Asp;

X398 = Thr o Ala;

5 X452 = His o Leu.

En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

X152 = Cys, Ser o Val;

X64 = Ile, Thr o Val

10 X71 = Arg, Gin, Asp, Glu, Val, Ser, Tyr o Leu

X72 = Tyr, His o Asn

X95 = Ile o His;

X154 = Cys, Ile o Ser;

X181 = Val o Ala;

15 X284 = Val o Phe;

X285 = Ala o Asp;

X398 = Thr o Ala;

X452 = His o Leu.

En otra realización de la presente invención X152, X154 están además limitados como sigue:

20 X152 = Cys, Gly, Ser, Thr o Val;

X154 = Ala, Cys, Gly, Ile, Asn o Ser.

En otra realización de la presente invención X152, X154 están además limitados como sigue:

X152 = Cys, Ser o Val;

X154 = Cys, Ile o Ser.

25 En otra realización de la presente invención X152 está además limitado como sigue:

X152 = Ser; X152 = Cys; X152 = Val; X152 = Gly o X152 = Thr.

En otra realización de la presente invención X152 y X154 están además limitados como sigue:

X152 = Ser; X154 = Ile.

En otra realización de la presente invención X152 y X154 están además limitados como sigue:

30 X152 = Val; X154 = Cys.

En otra realización de la presente invención X152 y X154 están además limitados como sigue:

X152 = Cys; X154 = Ser.

En otra realización de la presente invención X152, X71, X72, X154, X181 están además limitados como sigue:

X152 = Ser; X71 = Asp; X72 = His; X154 = Val; X181 = Val.

35 En otra realización de la presente invención X152, X71, X72, X154, X181 están además limitados como sigue:

X152 = Ser; X71 = Asp; X72 = Asn; X154 = Val; X181 = Val.

En otra realización de la presente invención X152, X71, X72, X154, X181 están además limitados como sigue:

X152 = Ser; X71 = Val; X72 = Asn; X154 = Val; X181 = Val.

En otra realización de la presente invención X152, X71, X72, X154, X181 están además limitados como sigue:

X152 = Cys; X71 = Ser; X72 = Asn; X154 = Ser; X181 = Ala.

En otra realización de la presente invención X152, X71, X72, X154, X181 están además limitados como sigue:

5 X152 = Ser; X71 = Tyr; X72 = Asn; X154 = Val; X181 = Val.

En otra realización de la presente invención X152, X71, X72, X154, X181 están además limitados como sigue:

X152 = Cys; X71 = Leu; X72 = Tyr; X154 = Ser; X181 = Val.

En otra realización de la presente invención X152, X71, X72, X154, X181 están además limitados como sigue:

X152 = Ser; X71 = Tyr; X72 = His; X154 = Val; X181 = Val.

10 En otra realización de la presente invención se proporciona una hidantoinasa en donde X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

X152 = Ser; X64 = Ile; X71 = Arg; X72 = Tyr; X95 = Ile; X154 = Val; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

15 En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

X152 = Cys; X64 = Ile; X71 = Arg; X72 = Tyr; X95 = Ile; X154 = Val; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

20 X152 = Val; X64 = Ile; X71 = Arg; X72 = Tyr; X95 = Ile; X154 = Val; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue.

25 X152 = Gly; X64 = Ile; X71 = Arg; X72 = Tyr; X95 = Ile; X154 = Val; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

X152 = Thr; X64 = Ile; X71 = Arg; X72 = Tyr; X95 = Ile; X154 = Val; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His;

30 En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

X152 = Ser; X64 = Ile; X71 = Arg; X72 = Tyr; X95 = Ile; X154 = Ile; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

35 En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

X152 = Val; X64 = Ile; X71 = Arg; X72 = Tyr; X95 = Ile; X154 = Cys; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

40 X152 = Cys; X64 = Ile; X71 = Arg; X72 = Tyr; X95 = Ile; X154 = Ser; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

45 X152 = Ser; X64 = Ile; X71 = Asp; X72 = His; X95 = Ile; X154 = Val; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

X152 = Ser; X64 = Ile; X71 = Asp; X72 = Asn; X95 = Ile; X154 = Val; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

5 En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

X152 = Ser; X64 = Ile; X71 = Val; X72 = Asn; X95 = Ile; X154 = Val; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

10 En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

X152 = Cys; X64 = Ile; X71 = Ser; X72 = Asn; X95 = Ile; X154 = Ser; X181 = Ala; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

15 X152 = Ser; X64 = Ile; X71 = Tyr; X72 = Asn; X95 = Ile; X154 = Val; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

20 X152 = Cys; X64 = Ile; X71 = Leu; X72 = Tyr; X95 = Ile; X154 = Ser; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

En otra realización de la presente invención X152, X64, X71, X72, X95, X154, X181, X284, X285, X398, X452 están además limitados como sigue:

X152 = Ser; X64 = Ile; X71 = Tyr; X72 = His; X95 = Ile; X154 = Val; X181 = Val; X284 = Val; X285 = Ala; X398 = Thr; X452 = His.

25 En otra realización de la presente invención, una hidantoinasa de acuerdo con la invención transforma al menos uno de los siguientes sustratos hidantoína, 5-metilhidantoína, 5-bencilhidantoína, 5-(4-hidroxibencil)hidantoína, 5-indolilmetilhidantoína, 5-(3,4-dihidroxibencil)hidantoína, 5-metiltoetilhidantoína, 5-isopropilhidantoína, 5-isobutilhidantoína, 5-sec-butilhidantoína, 5-(4-aminobutil)hidantoína, 5-hidroximetilhidantoína, o un compuesto de hidantoína 5-sustituída que corresponde a un aminoácido no natural, respectivamente un derivado del mismo, en el respectivo carbamoilaminoácido, en donde la actividad catalítica de la hidantoinasa con respecto a la transformación de dicho sustrato es al menos tan alta como la actividad catalítica de la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con respecto a la transformación de la D-5-indolilmetilhidantoína.

30 Como se ha mencionado antes, los sustratos para la hidantoinasa de acuerdo con la invención pueden ser cualquier compuesto de D-hidantoína 5-sustituída capaces de ser hidrolizados con la especificidad de sustrato de esta enzima. Estos incluyen también los compuestos de hidantoína 5-sustituída que corresponden a aminoácido no natural o un derivado del mismo. Un aminoácido no natural o un derivado del mismo se refiere a un aminoácido que no es codificado por el código genético estándar. Las respectivas hidantoínas de aminoácidos no naturales o derivados de los mismos incluyen 5-fenilhidantoína, 5-(4-hidroxifenil)hidantoína, 5-metoximetilhidantoína, 5-benciloximetilhidantoína, 5-(3,4-metilendioxibencil)hidantoína, dihidrouracilo. Preferiblemente, el sustrato de la hidantoinasa de acuerdo con la invención es la D,L-5-indolilmetilhidantoína, más preferiblemente la D-5-indolilmetilhidantoína.

La presente invención también proporciona polinucleótidos que codifican hidantoinasas de la invención.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado o recombinante que hibrida en condiciones restrictivas que comprenden un lavado en una solución de 1x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1% a 65°C, con el complemento de longitud completa del polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención como se ha definido antes;

en donde la actividad catalítica de la hidantoinasa es mayor en un factor de al menos  $\zeta$  que la actividad catalítica de la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en donde  $\zeta$  se define como  $\zeta = 1,2$ .

50 La presente invención proporciona también un vector que comprende el polinucleótido como se ha descrito antes que codifica la hidantoinasa de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, el vector comprende además secuencias reguladoras operativamente ligadas y adecuadas para la expresión del polinucleótido en una célula hospedante.

La presente invención proporciona además una célula hospedante aislada o transformada que comprende el polinucleótido o el vector que comprende el polinucleótido como se ha descrito antes que codifica la hidantoinasa de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, la célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en *Escherichia coli*, bacterias corineformes, *Bacillus sp.* La célula hospedante expresa la hidantoinasa de acuerdo con la presente invención. En una realización preferida, la célula hospedante expresa al menos las actividades enzimáticas seleccionadas de las siguientes: hidantoinasa; hidantoinasa e hidantoína racemasa; hidantoinasa y carbamoilasa; o hidantoinasa e hidantoína racemasa y carbamoilasa.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar aminoácidos, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar actividad de hidantoinasa de una hidantoinasa de acuerdo con la presente invención y actividad de carbamoilasa y al menos una hidantoína 5-sustituida a un medio de reacción, y opcionalmente proporcionar actividad de hidantoína racemasa a dicho medio de reacción;

(b) incubar el medio de reacción con el fin de permitir la transformación de la hidantoína 5-sustituida en los respectivos aminoácidos por las actividades enzimáticas proporcionadas en (a); y

(c) recuperar los aminoácidos obtenidos de la transformación enzimática de la respectiva hidantoína 5-sustituida del medio de reacción.

En un procedimiento preferido, dicha hidantoína 5-sustituida se selecciona de D,L-hidantoína 5-sustituida, D,L-5-indolilmetilhidantoína (= D,L-triptófano-hidantoína), D-hidantoína 5-sustituida, D-5-indolilmetilhidantoína (= D-triptófano-hidantoína).

En un procedimiento todavía más preferido dicha hidantoína 5-sustituida proporcionada al medio de reacción es L-hidantoína 5-sustituida o D,L-hidantoína 5-sustituida, y además se proporciona actividad de hidantoína racemasa al medio de reacción en la etapa (a) para transformar la L-hidantoína 5-sustituida o D,L-hidantoína 5-sustituida en D-hidantoína 5-sustituida.

En otro procedimiento preferido más, el aminoácido que se va a preparar es el D-triptófano y la hidantoína 5-sustituida se selecciona de D-5-indolilmetilhidantoína, L-5-indolilmetilhidantoína o D,L-5-indolilmetilhidantoína.

En el procedimiento, la hidantoína 5-sustituida se transforma mediante la hidantoinasa de la presente invención en el respectivo carbamoilaminoácido que se transforma en el respectivo aminoácido por dicha actividad de carbamoilasa. En una realización particularmente preferida, dicho carbamoilaminoácido se selecciona de N-(aminocarbonil)-DL-triptófano (= N-carbamoil-DL-triptófano; = Nombre en el índice de CA: N-(aminocarbonil)-triptófano; = Número de registro: 98299-50-4; Fórmula: C<sub>12</sub> H<sub>13</sub> N<sub>3</sub> O<sub>3</sub>) o N-carbamoil-L-triptófano (=Nombre en el índice de CA: N-(aminocarbonil)-L-triptófano = Número de registro: 89595-64-2; Fórmula: C<sub>12</sub> H<sub>13</sub> N<sub>3</sub> O<sub>3</sub>).

En otro procedimiento preferido más, el medio de reacción es un medio que parcial o totalmente consiste en medio de cultivo celular y la actividad de hidantoinasa la proporciona una célula hospedante de acuerdo con la presente invención, y la célula hospedante se cultiva en dicho medio de reacción.

En un procedimiento particularmente preferido, el medio de reacción es un medio que parcial o totalmente consiste en medio de cultivo celular y la actividad de carbamoilasa la proporciona una célula hospedante de acuerdo con la presente invención o una segunda célula hospedante, y dicha célula o células hospedantes se cultivan en dicho medio de reacción.

En una realización preferida, la o las células hospedantes que expresan actividad de hidantoinasa y actividad de carbamoilasa y opcionalmente la actividad de hidantoína racemasa, sea en células separadas o en la misma célula, se cultivan en un medio de cultivo celular con el fin de crear una biomasa, después el medio de cultivo celular y la biomasa se separan y la biomasa se vuelve a suspender usando tampón o agua. El sustrato se añade a dicho tampón o agua antes, durante o después de la adición de la biomasa con el fin de empezar la transformación del sustrato.

Las hidantoinasas de la presente invención se pueden usar como se describe, por ejemplo, en "Biocatalytic Production of Amino Acids and Derivatives" (Rozzell, J. D. Y Wagner, F. eds., Hanser Publisher, NY, en páginas 75-176 (1992)) para el uso en la producción de aminoácidos ópticamente puros a partir de D,L-hidantoínas 5-monosustituidas. También se describe el uso general de hidantoinasas en "Enzyme catalysis in organic synthesis" (Dranz, K. y Waldmann, H. eds., VCH-Verlag, Weinheim, en las páginas 409-431 (1995)) y Wagner, T. et al. ("Production of 1-methionine from D,L-5-(2-methylthioethyl) hydantoin by resting cells of a new mutant strain of *Arthrobacter species DSM 7330*", *Journal of Biotechnology* 46: 63-68 (1996)).

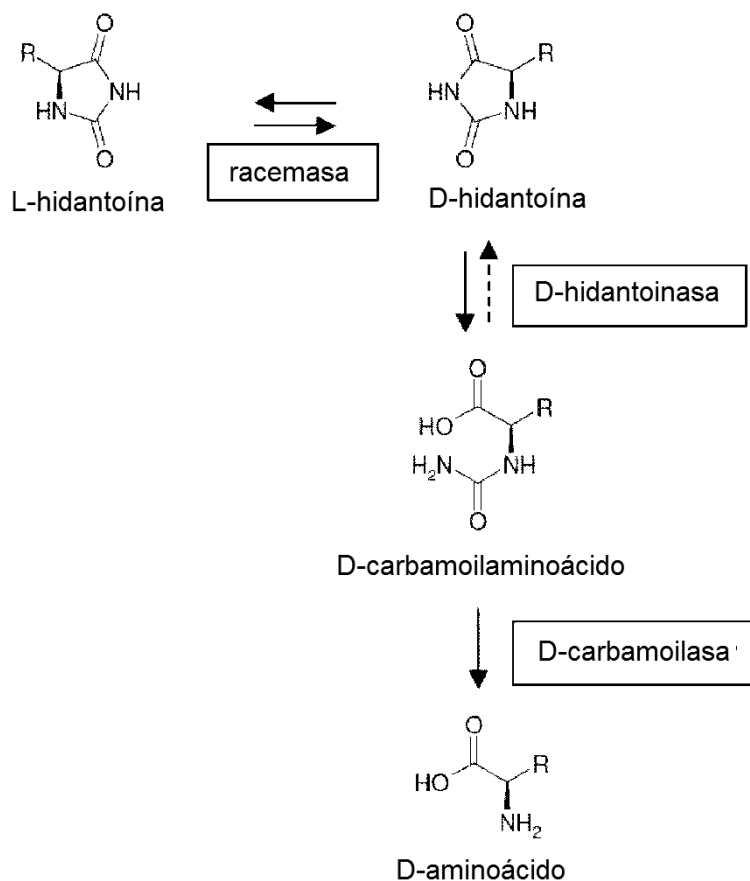
Para la transformación enzimática de D,L- o L-hidantoínas 5-sustituidas o D,L- o L- carbamoilaminoácidos en los respectivos D-aminoácidos, se prefiere aplicar la tecnología de catalizador de célula entera, que incluye la expresión de la hidantoinasa de la presente invención y la expresión de carbamoilasa, y preferiblemente también la expresión de hidantoína racemasa.

- La hidantoinasa de acuerdo con la presente invención se puede usar en este procedimiento también en su forma libre o inmovilizada. También se pueden inmovilizar la carbamoilasa y la hidantoína racemasa. Las técnicas para inmovilizar enzimas son bien conocidas para el experto en la técnica. Los métodos preferidos se mencionan en Bhavender P. Sharma, Lorraine F. Bailey y Ralph A. Messing ("Immobilisierte Biomaterialien Techniken und Anwendungen", *Angew. Chem.*, 94, pág. 836-852 (1992)); Dordick et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 116, pág. 5009-5010 (1994)), Okahata et al., *Tetrahedron Lett.*, 38, pág. 1971-1974 (1997)), Adlercreutz et al. (*Biocatalysis*, 6, 291-305 (1992)); Goto et al. (*Biotechnol. Prog.* 10, pág. 263-268 (1994)), Kamiya et al. (*Biotechnol. Prog.*, 11, pág. 270-275 (1995)), Okahata et al. (*Tibtech*, February 1997, 15, pág. 50-54); Fishman et al. (*Biotechnol. Lett.*, 20, pág. 535-538 (1998)).
- 5 La transformación de hidantoínas 5-sustituidas o carbamoilaminoácidos en los respectivos aminoácidos se puede llevar a cabo en un procedimiento discontinuo o de forma continua. Ventajosamente, se usa un reactor de membrana con enzimas como recipiente de reacción (Wandrey et al. en *Jahrbuch* 1998, Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen, VDI S. 151ff.; Wandrey et al. en *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds*, Vol. 2, VCH 1996, pág. 832 ff.; Kragl et al., *Angew. Chem.*, 6, pág. 684f. (1996)).
- 10 Con respecto a la producción de aminoácidos usando el procedimiento de catalizador de célula entera, ventajosamente, se usan células bacterianas debido a las altas tasas de reproducción y las condiciones de crecimiento fáciles que se aplican. Los expertos en la técnica conocen varias bacterias que se pueden usar en relación con esto. Preferiblemente, se puede usar *E. coli* como la célula y el sistema de expresión en relación con esto (Yanisch-Perron et al., *Gene*, 33,103-109 (1985)).
- 15 Para producir aminoácidos, se pueden usar células que expresan la hidantoinasa de la presente invención, y preferiblemente además que expresan la carbamoilasa y más preferiblemente que expresan además la hidantoína racemasa, en el medio de cultivo. Alternativamente, se pueden usar en la mezcla de reacción las respectivas células aisladas, células lavadas, productos de tratamiento de células, solución de enzimas bruta o solución de enzimas purificada obtenida del producto de tratamiento de células. Para llevar a cabo la reacción, dicho medio de cultivo o mezcla de reacción, respectivamente, que contiene el compuesto de hidantoína 5-sustituida como sustrato, se mantiene a una temperatura de 15 a 45°C, preferiblemente de 25 a 40°C, a pH de 5 a 9, preferiblemente a pH de 6 a 8, mientras que se deja reposar o agitar durante 8 horas a 5 días. Dicho medio de cultivo o mezcla de reacción, respectivamente, puede contener además iones de metales de transición, preferiblemente seleccionados de Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Co<sup>2+</sup>, en una concentración de 0,02 mM a 10 mM, preferiblemente de 0,1 mM a 5 mM. Cuando se usan células intactas, la mezcla de reacción puede contener además componentes nutrientes esenciales para el crecimiento de dicha célula transformada, tales como fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno e iones inorgánicos. Además, se puede añadir el sustrato (compuesto de hidantoína 5-sustituida o carbamoilaminoácido) al medio de cultivo o a la mezcla de reacción en porciones.
- 20 Puesto que las enzimas usadas en el método descrito también son capaces de catalizar la respectiva reacción inversa, la presente invención proporciona también además un procedimiento para preparar D-aminoácidos como se ha descrito antes, en donde en lugar de hidantoína 5-sustituida como sustrato se usa N-carbamoil-D,L-aminoácido o N-carbamoil-L-aminoácido:
- 25 dicho N-carbamoil-D,L-aminoácido o N-carbamoil-L-aminoácido es transformado por la hidantoinasa de acuerdo con la presente invención en el respectivo compuesto de D,L-hidantoína 5-sustituida o L-hidantoína 5-sustituida. Además, dicho compuesto de D,L-hidantoína 5-sustituida o L-hidantoína 5-sustituida es transformado por la hidantoína racemasa en el enantiómero D, en concreto el respectivo compuesto de D-hidantoína 5-sustituida. Después, el compuesto de D-hidantoína 5-sustituida es transformado por la hidantoinasa de acuerdo con la presente invención en el respectivo N-carbamoil-D-aminoácido. Posteriormente, la carbamoilasa transforma el N-carbamoil-D-aminoácido en el respectivo D-aminoácido. En una realización particularmente preferida de este procedimiento, el N-carbamoilaminoácido usado como sustrato es el N-(aminocarbonil)-DL-triptófano (= N-carbamoil-DL-triptófano; = Nombre en el índice de CA: N-(aminocarbonil)-triptófano; = Número de registro: 98299-50-4; Fórmula: C12 H13 N3 O3) o N-carbamoil-L-triptófano (=Nombre en el índice de CA: N-(aminocarbonil)-L-triptófano = Número de registro: 89595-64-2; Fórmula: C12 H13 N3 O3).
- 30 El aminoácido producido en el medio de cultivo o una mezcla de reacción se puede cuantificar rápidamente por un método conocido. Para esto, se puede usar cromatografía líquida de alta presión (HPLC) usando una columna C-18 y por ejemplo una mezcla de fosfato potásico 20 mM (pH 2,3) que contiene acetonitrilo al 1% y acetonitrilo que contiene H<sub>2</sub>O al 10% como eluyente.
- 35 Los aminoácidos acumulados en el medio de cultivo o mezcla de reacción, se pueden recoger del medio de cultivo o mezcla de reacción por métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden usar procedimientos tales como filtración, centrifugación, concentración a vacío, cromatografía de intercambio iónico o adsorción, cristalización y similares, si es necesario en combinación entre sí.
- 40 El siguiente esquema de reacción muestra las etapas de reacción y las enzimas implicadas en la transformación catalítica (ilustrada por la transformación de D-hidantoína). La D-hidantoína se transforma en N-carbamoil-D-aminoácido por la actividad catalítica de la D-hidantoinasa, que cataliza la reacción de hidrólisis de un compuesto de
- 45
- 50
- 55

D-hidantoína 5-sustituída para dar un N-carbamoil-D-aminoácido. En una etapa de reacción adicional, una enzima denominada N-carbamoilaminoácido hidrolasa cataliza la reacción de hidrólisis de dicho N-carbamoil-D-aminoácido para dar un D-aminoácido ópticamente activo. Además, una enzima denominada hidantoína racemasa cataliza la transformación del compuesto L-hidantoína ópticamente activo en el compuesto D-hidantoína ópticamente activo y viceversa.

5

Esquema de reacción



Definiciones

10 Hidantoinasa: El término "hidantoinasa" o "actividad de hidantoinasa" se define en la presente memoria como la enzima o la actividad de una enzima que hidroliza la hidantoína, en particular la hidantoína 5-sustituída. Las hidantoinasas catalizan la reacción de hidrólisis de la hidantoína 5-sustituída para formar el respectivo N-carbamoilaminoácido. En particular, las hidantoinasas de acuerdo con la presente invención catalizan la reacción de hidrólisis de la D-5-indolilmetilhidantoína para formar el N-carbamoil-D-triptófano, o la reacción de hidrólisis de la L-5-indolilmetilhidantoína para formar el N-carbamoil-L-triptófano. Un ejemplo de una hidantoinasa es una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Un ejemplo de una actividad de hidantoinasa es la actividad catalítica de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 hacia un compuesto tal como la L-5-metilthioetilhidantoína, L-5-(4-hidroxibencil)hidantoína o L-5-bencilhidantoína, que se transforma en el respectivo N-carbamoilaminoácido por la actividad de dicha hidantoinasa.

20 Hidantoína racemasa: la expresión "hidantoína racemasa" o "actividad de hidantoína racemasa" se define en la presente memoria como la enzima o la actividad de una enzima que transforma la L-hidantoína en D-hidantoína y viceversa. En particular, la N-hidantoína racemasa cataliza la reacción de transformación de L-5-indolilmetilhidantoína para formar D-5-indolilmetilhidantoína, o cataliza la reacción de transformación de D-5-indolilmetilhidantoína para formar L-5-indolilmetilhidantoína. Un ejemplo para una hidantoína racemasa es una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Un ejemplo para una actividad de hidantoína racemasa es la actividad catalítica de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 hacia un compuesto tal como L-5-metilthioetilhidantoína, L-5-(4-hidroxibencil)hidantoína, L-5-bencilhidantoína o L-5-indolilmetilhidantoína, que se transforma en el respectivo enantiómero D por la actividad de dicha hidantoína racemasa.

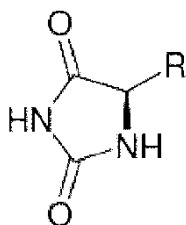
30 N-carbamoilasa: El término "N-carbamoilasa" o "actividad de N-carbamoilasa" se define en la presente memoria como la enzima o la actividad de una enzima que hidroliza N-carbamoilaminoácido, en particular N-carbamoil-D-



aminoácido. La N-carbamoilasa o N-carbamoilaminoácido hidrolasa, respectivamente, cataliza la reacción de hidrólisis de dicho N-carbamoilaminoácido, en particular N-carbamoil-D-aminoácido para dar el respectivo aminoácido, en particular un D-aminoácido ópticamente activo. En particular, las N-carbamoilasas catalizan la reacción de hidrólisis del N-carbamoil-D-triptófano para dar D-triptófano, o catalizan la reacción de hidrólisis del N-carbamoil-L-triptófano para formar L-triptófano. Un ejemplo de una N-carbamoilasa es una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Un ejemplo de una actividad de N-carbamoilasa es la actividad catalítica de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 hacia un compuesto tal como N-carbamoil-metionina, N-carbamoil-tirosina, N-carbamoil-fenilalanina o N-carbamoil-triptófano, que se transforma en el respectivo aminoácido por la actividad de dicha N-carbamoilasa.

10 Hidantoína 5-sustituida: La expresión "hidantoína 5-sustituida" se refiere a un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) siguiente, en donde R se representa por hidrógeno,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ , bencilo, 4-hidroxibencilo, indolilmetilo,  $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{-SH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$ , imidazolilmetilo,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}(\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ , o la expresión "hidantoína 5-sustituida" se refiere a prolina hidantoína. Dichos restos corresponden a aminoácidos que se encuentran de forma natural, que se obtienen tras la hidrólisis del respectivo compuesto por la hidantoinasa y posterior hidrólisis del respectivo N-carbamoilaminoácido por N-carbamoilasa. Además, el compuesto de hidantoína 5-sustituida puede corresponder a un aminoácido no natural o un derivado del mismo, tal como 5-fenilhidantoína, 5-(4-hidroxifenil)hidantoína, 5-metoximetilhidantoína, 5-benciloximetilhidantoína, 5-(3,4-metilendioxi-bencil)hidantoína, dihidouracilo. Debe indicarse que la fórmula (I) muestra el enantiómero D de una hidantoína 5-sustituida.

20 Fórmula (I):



25 Construcción de ácido nucleico: La expresión "construcción de ácido nucleico" como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula de ácido nucleico, monocatenaria o bicatenaria, que se aísla de un gen que se encuentra de forma natural o está modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos de una forma que de lo contrario no existiría en la naturaleza. La expresión construcción de ácido nucleico es sinónima de la expresión "casete de expresión" cuando la construcción de ácido nucleico contiene las secuencias de control necesarias para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

30 Secuencia de control: La expresión "secuencia de control" se define en la presente memoria para incluir todos los componentes que son necesario o ventajosos para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser natural o extraña una de otra. Dichas secuencias de control incluyen, pero no se limitan a una secuencia líder, secuencia de poliadenilación, secuencia propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada de la transcripción y la traducción. Las secuencias de control se pueden proporcionar con conectores con el fin de introducir sitios de reacción específicos que facilitan el ligado de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

35 Operativamente unido: La expresión "operativamente unido" indica en la presente memoria una configuración en la que una secuencia de control se pone en una posición adecuada con respecto a la secuencia codificante de la secuencia de polinucleótido de modo que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

40 Secuencia codificante: Cuando se usa en la presente memoria, la expresión "secuencia codificante" significa una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteína. Los límites de la secuencia codificante en general están determinados por un marco de lectura abierto, que normalmente empieza en el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y termina con un codón de parada tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN, ADNc o secuencia de nucleótidos recombinante.

45 Expresión: El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción del polipéptido que incluye, pero no se limita a la transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

50 Vector de expresión: La frase "vector de expresión" se define en la presente memoria como una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención, y que está operativamente unido a nucleótidos adicionales que proporcionan su expresión.

Célula hospedante: La expresión "célula hospedante", como se usa en la presente memoria, incluye cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, traducción y similares con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polipéptido de la presente invención.

5 Medio de cultivo celular: La expresión "medio de cultivo celular" significa en general el medio usado para el cultivo de microorganismos que incluyen bacterias, levaduras y hongos, y se puede denominar también "medio de fermentación".

Aminoácido no natural: La expresión "aminoácido no natural" se refiere a un alfa-aminoácido que tiene la fórmula  $\text{NH}_2\text{-CH(R)-COOH}$ , en donde R representa un resto modificado de un resto de aminoácido proteinogénico, cuyo resto de aminoácido proteinogénico se selecciona de hidrógeno,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ , bencilo, 4-hidroxibencilo, indolilmetilo,  $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{-SH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$ , imidazolilmetilo,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(NH)NH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ , o la expresión "aminoácido no natural" se refiere a un derivado de prolina, que puede estar modificado en el grupo  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$  de su estructura de anillo. La modificación mencionada antes puede ser sustitución de átomo o átomos de hidrógeno por grupo alifático, grupo aromático, grupo heterocíclico, grupo ácido, grupo básico, grupo hidroxilo y/o halógeno tal como F.

Modificación: El término "modificación" significa en la presente memoria cualquier modificación química del polipéptido que consiste en el polipéptido de acuerdo con la presente invención o una secuencia homóloga del mismo; así como la manipulación genética del ADN que codifica dicho polipéptido. La modificación pueden ser sustituciones, eliminaciones, inserciones y/o adiciones de uno o más aminoácidos.

20 Variante: Cuando se usa en la presente memoria, el término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad de hidantoinasa producida por un organismo que expresa una secuencia de nucleótidos modificada del polipéptido de acuerdo con la presente invención o una secuencia homóloga al mismo. La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene por la intervención humana por modificación de la secuencia de nucleótidos. Las secuencias de nucleótidos variantes también se pueden encontrar de forma natural. Por ejemplo, se ha descrito una hidantoinasa aislada de *Microbacterium liquefaciens* AJ3912 que tiene aproximadamente 83% de identidad con la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Esta hidantoinasa de *Microbacterium liquefaciens* se puede considerar como una variante (que se encuentra de forma natural) de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

30 Las proteínas de la presente invención, por ejemplo, se pueden sintetizar, preparar a partir de proteínas purificadas o producir usando procedimientos recombinantes y técnicas conocidas en la materia. Aunque se describen en la presente memoria técnicas específicas para su preparación, se entiende que todas las técnicas adecuadas para la producción de estos péptidos, se pretende que estén dentro del alcance de esta invención. En general, estas técnicas incluyen secuenciación de ADN y proteína, clonación, expresión y otras técnicas de ingeniería recombinantes, que permiten la construcción de vectores procariotas y eucariotas que codifican y expresan cada una de las proteínas de la invención.

35 Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran sinónimos (como se admite normalmente) y cada término se puede usar de forma intercambiable según requiera el contexto, indicando una cadena de al menos dos aminoácidos acoplados mediante enlaces peptídico. La palabra "polipéptido" se usa en la presente memoria para cadenas que contienen más de diez restos de aminoácidos. Todas las fórmulas o secuencias de oligopéptidos y polipéptidos en la presente memoria están escritas de izquierda a derecha y en la dirección del extremo amino al extremo carboxi. El código de aminoácidos de una letra usado en la presente memoria es conocido normalmente en la técnica y se puede encontrar en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

45 Por polipéptido o proteína "aislada" se entiende un polipéptido o proteína secado de su entorno natural. Por ejemplo, los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células hospedantes, se consideran aislados para el propósito de la invención, puesto que son polipéptidos naturales o recombinantes que se han purificado sustancialmente por cualquier técnica adecuada tal como, por ejemplo, el método de purificación en una etapa descrito en Smith y Johnson, *Gene* 67:31-40 (1988).

50 La hidantoinasa de acuerdo con la invención se puede recuperar y purificar de cultivos de células recombinantes por procedimientos bien conocidos, que incluyen la precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lecitina. Lo más preferiblemente, se usa la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") para la purificación.

55 Los polipéptidos de la presente invención incluyen productos naturalmente purificados, productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un hospedante procariota o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, fúngicas, de plantas superiores, insectos y mamíferos. Dependiendo del hospedante usado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o pueden no estar glicosilados. Además, los polipéptidos de la invención pueden incluir también un resto de metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de

procedimientos mediados por el hospedante.

Las proteínas de la presente invención se pueden unir operativamente a un polipéptido no hidantoinasa (p. ej., secuencias de aminoácidos heterólogas) para formar proteínas de fusión. Como se usa en la presente memoria, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" hidantoinasa comprende un polipéptido hidantoinasa operativamente unido a un polipéptido no hidantoinasa.

Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión de GST-hidantoinasa, en la que las secuencias de hidantoinasa están fusionadas al extremo C de las secuencias de GST. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de la hidantoinasa recombinante. En otra realización, la proteína de fusión es una proteína hidantoinasa que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N. En algunas células hospedantes (p. ej., células hospedantes de mamífero y levadura), la expresión y/o secreción de hidantoinasa se puede aumentar por el uso de una secuencia señal heteróloga.

Se puede usar una secuencia señal para facilitar la secreción y aislamiento de una proteína o polipéptido de la invención. Las secuencias señal se caracterizan típicamente por un núcleo de aminoácidos hidrófobos que normalmente son escindidos de la proteína madura durante la secreción en uno o más sucesos de escisión. Dichos péptidos señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal de las proteínas maduras cuando pasan por la ruta secretora. La secuencia señal dirige la secreción de la proteína, tal como de un hospedante eucariota en el que el vector de expresión se transforma y la secuencia señal posteriormente o simultáneamente se escinde. Después la proteína se puede purificar fácilmente del medio extracelular por procedimientos reconocidos en la técnica. Alternativamente, la secuencia señal se puede unir a una proteína de interés usando una secuencia que facilite la purificación, tal como con un dominio GST. Así, por ejemplo, la secuencia que codifica el polipéptido se puede fusionar con una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido, que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En algunas realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (Qiagen, Inc.), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona la purificación conveniente de la proteína de fusión. El marcador HA es otro péptido útil para la purificación, que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza, que han descrito Wilson et al., *Cell* 37:767 (1984), por ejemplo.

Preferiblemente, una proteína quimérica o de fusión de la invención se produce por técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, se ligan fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos juntas de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, usando extremos romos o extremos escalonados para el ligado, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos adecuados, relleno de extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseada, y ligado enzimático. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar por técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN convencionales. Alternativamente, se puede llevar a cabo la amplificación por PCR de fragmentos de genes usando cebadores de anclaje que dan lugar a extremos salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente se pueden asociar y volver a amplificar para generar una secuencia de gen quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992). Además, están disponibles en el mercado muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (p. ej., un polipéptido GST). Se puede clonar un ácido nucleico de acuerdo con la invención en dicho vector de expresión, de modo que el resto de fusión está unido en el marco al resto de fusión con el fin de expresar una proteína de fusión que comprende una proteína de acuerdo con la invención.

La expresión "sustitución conservadora" o sustitución por restos de aminoácidos "homólogos" se pretende que signifique una sustitución en la que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Estas familias se conocen en la técnica e incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina e histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej. ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparaginas, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina triptófano, histidina).

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos normalmente tienen un impacto mínimo en la actividad de la proteína resultante. Dichas sustituciones se describen más adelante. Las sustituciones conservadoras sustituyen un aminoácido por otro aminoácido que es similar en tamaño, hidrofobicidad, carga, polaridad, características estéricas, aromaticidad, etc. Dichas sustituciones en general son conservadoras cuando se desea modular finalmente las características de la proteína.

Restos de aminoácidos "homólogos" como se usa en la presente memoria se refiere a restos de aminoácidos que tienen propiedades químicas similares en relación con la hidrofobicidad, carga, polaridad, características estéricas, aromaticidad, etc. Los ejemplos de aminoácidos que son homólogos entre sí incluyen, en términos de carga positiva: lisina, arginina, histidina; en términos de carga negativa: ácido glutámico, ácido aspártico; en términos de hidrofobicidad: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina; en términos de polaridad: serina,

treonina, cisteína, metionina, triptófano, tirosina, asparagina, glutamina; en términos de aromaticidad: fenilalanina, tirosina, triptófano; en términos de grupos laterales químicamente similares: serina y treonina; o glutamina y asparaginas; o leucina e isoleucina.

5 Los ejemplos de aminoácidos que pueden sustituir a un aminoácido original en una proteína y que se consideran como sustituciones conservadoras incluyen: Ala por Ser; Arg por Lys; Asn por Gln o His; Asp por Glu; Cys por Ser; Gln por Asn; Glu por Asp; Gly por Pro; His por Asn o Gln; Ile por Leu o Val; Leu por Ile o Val; Lys por Arg o Gln Met; por Leu o Ile; Met, Phe por Leu o Tyr; Ser por Thr; Thr por Ser; Trp por Tyr; Tyr por Trp o Phe; y Val por Ile o Leu.

10 Por ejemplo, se proporciona una guía de cómo hacer sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas en Bowie, J. U. et al., *Science* 247:1306-1310 (1990), en donde los autores indican que hay dos procedimientos principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio. El primer procedimiento se basa en el proceso de evolución, en el que las mutaciones son aceptadas o rechazadas por selección natural. El segundo procedimiento usa ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado y selecciona o criba para identificar secuencias que mantienen la funcionalidad. Como exponen los autores, estos estudios han puesto de manifiesto que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a sustituciones de aminoácidos. Los autores indican además que es probable que los cambios sean permisivos en una determinada posición de la proteína. Por ejemplo, la mayoría de los restos de aminoácidos enterrados requieren cadenas laterales no polares, mientras que en general se conservan pocas características de cadenas laterales de la superficie. Otras de dichas sustituciones fenotípicamente silenciosas se describen en Bowie et al., véase antes, y las referencias citadas en el mismo.

20 Como se define en la presente memoria, la expresión “sustancialmente homóloga” se refiere a una secuencia de aminoácidos que contiene un número suficiente o mínimo de aminoácidos idénticos o equivalentes (p. ej., con cadena lateral similar) respecto a una segunda secuencia de aminoácidos de modo que la primera y la segunda secuencias de aminoácidos tienen un dominio común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que contienen un dominio común que tiene una identidad de aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más, se definen en la presente memoria como suficientemente idénticas, con la condición de que se mantienen la o las sustituciones de las posiciones de aminoácidos de acuerdo con la presente invención como se definen en la presente memoria.

30 También los ácidos nucleicos que codifican otros miembros de la familia de hidantoinasas, que por lo tanto tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos de la presente invención, están dentro del alcance de la invención, con la condición de que se mantienen la o las sustituciones de las posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos codificada de acuerdo con la presente invención como se definen en la presente memoria. Dichas moléculas de ácidos nucleicos que corresponden a variantes (p. ej., variantes alélicas naturales) y homólogos del ADN de acuerdo con la invención se pueden aislar basándose en su homología con los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria usando los ADNc descritos en la presente memoria o un fragmento adecuado de los mismos, como una sonda de hibridación de acuerdo con técnicas de hibridación convencionales preferiblemente en condiciones de hibridación altamente restrictivas.

40 Además de variantes alélicas de las secuencias proporcionadas en la presente memoria que se encuentran de forma natural, el experto en la técnica reconocerá que se pueden introducir cambios adicionales por mutación en las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la presente invención, conduciendo así a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína hidantoinasa sin alterar sustancialmente la función de la proteína, con la condición de que se mantienen la o las sustituciones de las posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos codificada de acuerdo con la presente invención como se definen en la presente memoria.

45 De acuerdo con la presente invención se proporcionan hidantoinasas mejoradas. Las hidantoinasas mejoradas son proteínas en donde se mejora la actividad catalítica y/o la enantioselectividad. Dichas proteínas se pueden obtener introduciendo mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden ser expresados de forma recombinante y cribados según su respectiva actividad biológica. Por ejemplo, la técnica proporciona ensayos estándar para medir la actividad catalítica de hidantoinasas y por lo tanto se pueden seleccionar fácilmente proteínas mejoradas.

50 Como se usa en la presente memoria, los términos “gen” y “gen recombinante” se refieren a moléculas de ácido nucleico que se pueden aislar del ADN cromosómico, que incluye un marco de lectura abierto que codifica una proteína, p. ej., hidantoinasa. Un gen puede incluir secuencias codificantes, secuencias no codificantes, intrones y secuencias reguladoras. Además, un gen se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada como se define en la presente memoria.

55 Una molécula de ácido nucleico de la presente invención o un equivalente funcional de la misma, se puede aislar usando técnicas de biología molecular convencionales y la información de secuencia proporcionada en la presente memoria. Por ejemplo, usando toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico descrita en la presente memoria como una sonda de hibridación, se pueden aislar moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, usando técnicas de hibridación y clonación estándar (p. ej., como se describe en Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

Además, se puede aislar una molécula de ácido nucleico que abarca toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores oligonucleótidos sintéticos diseñados basándose en la información de secuencia contenida en las secuencias descritas.

Una molécula de ácido nucleico de la invención se puede amplificar usando ADNc, ARNm o alternativamente, ADN genómico, como un molde y cebadores oligonucleótidos adecuados de acuerdo con técnicas de amplificación por PCR convencionales. El ácido nucleico así amplificado se puede clonar en un vector adecuado y caracterizar por análisis de secuencia de ADN.

Además, los oligonucleótidos que corresponden o que pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención, se pueden preparar por técnicas sintéticas convencionales, p. ej., usando un sintetizador de ADN automático.

Una molécula de ácido nucleico que es complementaria de otra secuencia de ácido nucleico es una que es suficientemente complementaria de las otras secuencias de modo que puede hibridar con la otra secuencia de nucleótidos forman así un dúplex estable.

Un "polinucleótido aislado" o "ácido nucleico aislado" es un ADN o ARN que no es inmediatamente contiguo a ambas secuencias codificantes con las que es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma natural del organismo del que se obtiene. Por lo tanto, en una realización, un ácido nucleico aislado incluye algunas o todas las secuencias 5' no codificantes (p. ej., promotor) que son inmediatamente contiguas a la secuencia codificante. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido de replicación autónoma o virus, o en ADN genómico de una procarionota o eucariota, o que existe como una molécula separada (p. ej., un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por la PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) independientemente de otras secuencias. También está incluido un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica un polipéptido adicional que carece sustancialmente de material celular, material vírico o medio de cultivo (cuando se produce por técnicas de ADN recombinante), o precursores químicos u otros productos químicos (cuando se sintetizan químicamente). Además, un "fragmento de ácido nucleico aislado" es un fragmento de ácido nucleico que no se encuentra de forma natural como un fragmento y no se encontraría en el estado natural.

Como se usa en la presente memoria, los términos "polinucleótido" o "molécula de ácido nucleico" se pretende que incluyan moléculas de ADN (p. ej., ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (p. ej., ARNm) y análogos de ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario. El ácido nucleico se puede sintetizar usando análogos o derivados de oligonucleótidos (p. ej., nucleótidos inosina o fosforotioato). Dichos oligonucleótidos se pueden usar, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que tienen las capacidades de emparejamiento de bases alteradas o mayor resistencia a nucleasas.

También están incluidas dentro del alcance de la invención las cadenas complementarias de las moléculas de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria.

La información de secuencia proporcionada en la presente memoria no debe interpretarse de forma muy concreta para requerir la inclusión de bases identificadas de forma errónea. Las secuencias específicas descritas en la presente memoria se pueden usar fácilmente para aislar el gen completo de *Arthrobacter sp.* que a su vez se puede someter fácilmente a análisis de secuencia adicional identificando así errores de secuenciación.

Salvo que se indique de otra forma, todas las secuencias de nucleótidos determinadas por secuenciación de una molécula de ADN en la presente memoria, se determinaron usando un secuenciador de ADN automático y todas las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados por moléculas de ADN determinadas en la presente memoria se predijeron por traducción de una secuencia de ADN determinada como antes. Por lo tanto, como se conoce en la técnica, para cualquier secuencia de ADN determinada por este procedimiento automático, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en la presente memoria puede contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas por este procedimiento automático, típicamente son al menos aproximadamente 90% idénticas, más típicamente de al menos aproximadamente 95% a al menos aproximadamente 99,9% idénticas con la secuencia de nucleótidos real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real se puede determinar de forma más precisa por otros procedimientos que incluyen procedimientos de secuenciación de ADN manual bien conocidos en la técnica. Como también se conoce en la técnica, una sola inserción o eliminación en una secuencia de nucleótidos determinada comparada con la secuencia real producirá un desplazamiento del marco en la traducción de la secuencia de nucleótidos de modo que la secuencia de aminoácidos prevista codificada por una determinada secuencia de nucleótidos será completamente diferente de la secuencia de aminoácidos codificada realmente por la molécula de ADN secuenciada, empezando en el punto de dicha inserción o eliminación.

El experto en la técnica es capaz de identificar dichas bases identificadas de forma errónea y sabe cómo corregir dichos errores.

Los términos “homología” o “porcentaje de identidad” se usan de forma intercambiable en la presente memoria. Para el propósito de esta invención, se define aquí que con el fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para fines de comparación óptimos (p. ej., se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para el alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Se comparan después estos restos de aminoácidos o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (es decir, posiciones que solapan)\*100). Preferiblemente, las dos secuencias tienen la misma longitud.

El experto en la técnica será consciente del hecho de que están disponibles varios programas informáticos diferentes para determinar la homología entre dos secuencias. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48): 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de programas GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El experto en la técnica apreciará que todos estos parámetros diferentes darán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje de identidad total de las dos secuencias no se altera significativamente cuando se usan diferentes algoritmos.

En otra realización más, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de programas GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 o 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En otra realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se determina usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*CABIOS*, 4:11-17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) (disponible en: <http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) usando una tabla de pesos de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de la presente invención se pueden usar además como una “secuencia de consulta” para llevar a cabo una búsqueda en bases de datos públicas, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden llevar a cabo usando los programas BLASTN y BLASTX (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST se pueden llevar a cabo con el programa BLASTN, puntuación=100, longitud de palabra=12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico PLP03 de la invención. Las búsquedas de proteínas con BLAST se pueden llevar a cabo con el programa BLASTX, puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de proteína PLP03 de la invención. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., BLASTX y BLASTN). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

El “porcentaje de identidad de aminoácidos” o “porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos” se refiere a una comparación de los aminoácidos de dos polipéptidos que, cuando se alinean de forma óptima, tienen aproximadamente el porcentaje designado de los mismos aminoácidos. Por ejemplo, “95% de identidad de aminoácidos” se refiere a una comparación de los aminoácidos de dos polipéptidos que cuando se alinean de forma óptima tienen 95% de identidad de aminoácidos. Preferiblemente, las posiciones de los restos que no son idénticos difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, no es probable que la sustitución de los aminoácidos que tienen propiedades químicas similares tales como la carga o polaridad, afecte a las propiedades de una proteína. Los ejemplos incluyen glutamina por asparagina o ácido glutámico por ácido aspártico.

Como se usa en la presente memoria, el término “hibridar” se pretende que describa condiciones para la hibridación y el lavado en las que secuencias de nucleótidos al menos aproximadamente 90%, preferiblemente al menos aproximadamente 95%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 96%, más preferiblemente al menos 98% homólogas entre sí, típicamente permanecen hibridadas entre sí. El experto en la técnica entiende que se aplica una condición adicional, en concreto que se mantienen la o las sustituciones de las posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos codificada de acuerdo con la presente invención como se define en la presente memoria.

Un ejemplo no limitante preferido de dichas condiciones de hibridación, son la hibridación en 6x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 1xSSC, SDS al 0,1% a 50°C, preferiblemente a 55°C, más preferido a 60°C e incluso preferiblemente a 65°C.

Las condiciones altamente restrictivas incluyen, por ejemplo, hibridación a 68°C, en 5xSSC/5x solución de

Denhardt/SDS al 1,0% y lavado en 0,2\*SSC/SDS al 0,1% a temperatura ambiente. Alternativamente, el lavado se puede llevar a cabo a 42°C.

5 El experto en la técnica sabrá qué condiciones aplicar para las condiciones de hibridación restrictivas y altamente restrictivas. Se encuentra fácilmente disponible en la técnica directrices relativas a dichas condiciones, por ejemplo, en Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N.Y.).

10 Por supuesto, un polinucleótido que hibrida solo con una secuencia de poli A (tal como el tramo de poli(A) 3' terminal de los ARNm), o con un tramo complementario de restos de T (o U), no estaría incluido en un polinucleótido de la invención usado específicamente para hibridar con una parte de un ácido nucleico de la invención, puesto que dicho polinucleótido hibridaría con cualquier molécula de ácido nucleico que contenga un tramo de poli(A) o el complementario del mismo (p. ej., prácticamente cualquier clon de ADN bicatenario).

15 La presente invención se refiere también a construcciones de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente unido a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula hospedante adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

20 Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una variedad de formas para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia de polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de polinucleótidos usando procedimientos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

25 La secuencia de control puede ser una secuencia promotora adecuada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una célula hospedante para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia promotora contiene secuencias de control de la transcripción que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula hospedante de elección, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares sean homólogos o heterólogos para la célula hospedante.

30 Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención, en especial en una célula hospedante bacteriana, son los promotores obtenidos del operón lac de *E. coli*, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), gen de levansucrasa *Bacillus subtilis* (sacB), gen de alfa-amilasa *Bacillus licheniformis* (amyL), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), gen de penicilasa *Bacillus licheniformis* (penP), genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, y gen de beta-lactamasa procariota (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer et al., 1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 21-25). Se describen promotores adicionales en "Useful proteins from recombinant bacteria" en *Scientific American*, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, véase antes.

35 Como secuencia de unión al ribosoma, se puede usar casi cualquier secuencia siempre que pueda ser expresada en una célula hospedante. Sin embargo, se prefiere usar un plásmido en el que se ajusten una secuencia de Shine-Dalgarno y un codón de inicio para tener una distancia adecuada (p. ej., de 6 a 18 bases) entre ellos.

40 Con el fin de llevar a cabo eficazmente la transcripción y traducción, se puede expresar una proteína, en la que el extremo N-terminal de una proteína que tiene actividad de la proteína o una proteína derivada de dicha proteína por eliminación de una parte de la misma, se fusiona con el extremo N-terminal de una proteína codificada por un vector de expresión.

45 Las secuencias de control también pueden ser una secuencia terminadora de la transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula hospedante para terminar la transcripción. Aunque no siempre es necesaria una secuencia de terminación de la transcripción para la expresión de una proteína de interés, normalmente es parte de vectores disponibles en el mercado. La secuencia de terminación está operativamente unida al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Es preferible poner una secuencia de terminación de la transcripción directamente debajo de un gen estructural. Se puede usar cualquier terminador que sea funcional en la célula hospedante de elección en la presente invención.

50 La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula hospedante. La secuencia líder está operativamente unida al extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Se puede usar en la presente invención cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula hospedante de elección.

55 La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente unida al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos y que, cuando se transcribe es reconocida por la célula hospedante como una señal para añadir restos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede usar en la presente invención

cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula hospedante de elección.

La secuencia de control también puede ser una región que codifica un péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos unida al extremo amino de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado en la ruta secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener inherentemente una región codificante de un péptido señal naturalmente unido en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región codificante que codifica el polipéptido secretado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región que codifica un péptido señal que es extraño para la secuencia codificante. La región que codifica un péptido señal extraño puede ser necesaria donde la secuencia codificante no contiene de forma natural una región que codifica un péptido señal. Alternativamente, la región que codifica un péptido señal extraño puede sustituir simplemente la región que codifica un péptido señal natural con el fin de potenciar la secreción del polipéptido. Sin embargo, se puede usar en la presente invención cualquier región que codifica un péptido señal que dirija al polipéptido expresado a la ruta secretora de una célula hospedante de elección, es decir, en un medio de cultivo.

La secuencia de control también puede ser una región que codifica un propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos situada en el extremo amino de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido en general es inactivo y se puede transformar en un polipéptido activo maduro por escisión catalítica o autocatalítica del polipéptido a partir del propolipéptido. La región que codifica el propéptido se puede obtener a partir de los genes para la proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutral de *Bacillus subtilis* (nprT), factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica *Rhizomucor miehei*, y lacasa *Myceliophthora thermophila*.

Cuando están presentes tanto las regiones de péptido señal como de propéptido en el extremo amino de un polipéptido, la región propéptido está colocada cerca del extremo amino de un polipéptido y la región del péptido señal está colocada cerca del extremo amino de la región de propéptido. También puede ser conveniente añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula hospedante. Los ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen que la expresión del gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procariotas incluyen los sistemas operadores lac, tac y trp. En levaduras, se puede usar el sistema de ADH2 o el sistema de GAL1. En hongos filamentosos, se pueden usar el promotor de alfa-amilasa TAKA, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*, como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten la amplificación de genes. En sistemas eucariotas, estos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa que es amplificado en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que son amplificados con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido estaría operativamente unida con la secuencia reguladora.

La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprende un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada de transcripción y traducción. Los diferentes ácidos nucleicos y secuencias de control descritas en la presente memoria se pueden unir entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en dichos sitios. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede expresar insertando la secuencia de nucleótidos o una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia en un vector adecuado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante está situada en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente unida con las secuencias de control adecuadas para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que se puede someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede llevar a cabo la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula hospedante en la que se va a introducir el vector. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un elemento extracromosómico, un minocromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedante, se integra en el genoma y es replicado junto con el o los cromosomas en el que se ha integrado. Además, se puede usar un solo vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula hospedante, o un transposón.

Con el fin de identificar y seleccionar estos transformantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador seleccionable (p. ej., resistencia a antibióticos) en las células hospedantes junto con el gen de interés. Los vectores de la presente invención contienen preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. Los ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes dal de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, kanamicina,



cloramfenicol, o tetraciclina. Las células transformadas con el ácido nucleico introducido se pueden identificar por selección de fármacos (p. ej., células que han incorporado el gen de marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras morirán). Los marcadores adecuados para células hospedantes de levaduras son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para usar en una célula hospedante de hongo filamentoso incluyen, pero no se limitan a amdS (acetamidasa), argB (ornitina carbamoiltransferasa), bar (fosfotricina acetiltransferasa), hph (higromicina fosfotransferasa), niaD (nitrato reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato descarboxilasaa), sC (sulfato adeniltransferasa), y trpC (antranilato sintasa), así como sus equivalentes.

Los vectores de la presente invención pueden contener un elemento o elementos que permiten la integración del vector en el genoma de la célula hospedante o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

Para la integración en el genoma de la célula hospedante, el vector se puede basar en la secuencia de polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedante en una situación o situaciones precisas en el o los cromosomas. Para aumentar la probabilidad de la integración en una situación precisa, los elementos de integración deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que es homóloga con la secuencia diana en el genoma de la célula hospedante. Además, los elementos de integración pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otra parte, el vector se puede integrar en el genoma de la célula hospedante por recombinación no homóloga.

Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de la replicación que permite al vector replicarse de forma autónoma en la célula hospedante en cuestión. El origen de la replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que media la replicación autónoma que funciona en una célula. La expresión "origen de replicación" o "replicador de plásmido" se define en la presente memoria como una secuencia de nucleótidos que permite que el plásmido o vector se replique in vivo.

Los ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060, y pAMR1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

Los ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula hospedante de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en la célula hospedante para aumentar la producción del producto génico. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedante o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por lo tanto se pueden seleccionar copias adicionales del polinucleótido para cultivar las células en presencia del agente seleccionable adecuado.

Los procedimientos usados para ligar los elementos descritos antes para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención, son bien conocidos para el experto en la técnica (véase, p. ej., Sambrook et al., 1989, véase antes).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedantes, que significa que el vector de expresión recombinante incluye una o más secuencias reguladoras seleccionadas basándose en las células hospedantes que se van a usar para la expresión, que están operativamente unidas a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "operativamente unido" se pretende que signifique que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la o las secuencias reguladoras de una forma que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (p. ej., en un sistema de transcripción/traducción in vitro o en una célula hospedante cuando el vector se introduce en la célula hospedante). La expresión "secuencia reguladora" se pretende que incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology" 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva o inducible de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedantes.

El inserto de ADN debería estar operativamente unido a un promotor adecuado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores lacI y lacZ de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor gpt, los promotores lambda PR, PL y el promotor trp, el promotor de HSV timidina quinasa, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de LTR retrovíricos, tales como los del virus del sarcoma de Rous ("RSV"), promotores de CMV (citomegalovirus) y metalotioneína, tales como el promotor de la metalotioneína-I de ratón. El experto en la técnica conocerá otros promotores adecuados. La expresión de proteínas en procariontes a menudo se lleva a cabo en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas. En una realización

específica, se prefieren promotores que sean capaces de dirigir un nivel de expresión alto de hidantoinasas en microorganismos, preferiblemente en *E. coli*, bacterias corineformes *Bacillus sp.* Dichos promotores son conocidos en la técnica. Las construcciones de expresión pueden contener sitios para el inicio, terminación de la transcripción, y en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para traducción. La parte codificante de los transcritos maduros expresados por las construcciones incluirán una traducción que empieza en AUG al principio y un codón de terminación colocado de forma adecuada al final del polipéptido que se va a traducir.

El vector de ADN se puede introducir en células procariotas o eucariotas por técnicas de transformación o transfección convencionales. Como se usa en la presente memoria, los términos “transformación” y “transfección” se pretende que se refieran a una variedad de técnicas reconocidas en la materia para la introducción de ácido nucleico extraño (p. ej., ADN) en una célula hospedante, que incluyen coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transducción, infección, lipofección, transfección o electroporación mediada por lípido catiónico. Se pueden encontrar procedimientos adecuados para la transformación o transfección de células hospedantes en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) y otros manuales de laboratorio.

Entre los vectores preferidos para usar en bacterias están pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles en Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, disponibles en Stratagene; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles en Pharmacia. Entre los vectores eucariotas preferidos están PWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pZT1 y pSG disponibles en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Pharmacia. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica.

La presente invención también se refiere a células hospedantes recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención, que se usan ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos de hidantoinasa. Se introduce un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención en una célula hospedante de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante. La expresión “célula hospedante” abarca también cualquier progenie de una célula original que no es idéntica a la célula original debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula hospedante dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

También se hace referencia a una “célula transformada” o “célula recombinante” que es una célula (hospedante) en la que (o en un antecesor de la cual) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Están incluidas tanto las células procariotas como las eucariotas, p. ej., bacterias, hongos, levadura y similares. En particular, los microorganismos útiles como células hospedantes son células bacterianas tales como bacterias gram positivas o gram negativas, que incluyen, pero no se limitan a *Bacillus sp.* p. ej., *Bacillus subtilis*, *Streptomyces sp.*, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella typhimurium*, bacterias corineformes, y también actinomicetos, células fúngicas tales como levaduras, células animales y células vegetales.

La introducción de un vector en una célula hospedante bacteriana se puede llevar a cabo, por ejemplo, por transformación de protoplasma (véase, p. ej., Chang y Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (véase, p. ej., Young y Spizizen, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (véase, p. ej., Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), o conjugación (véase, p. ej., Koehler y Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

Los siguientes ejemplos proporcionan detalles adicionales relacionados con los procedimientos usados para identificar y aislar hidantoinasas modificadas de acuerdo con la presente invención. La presente invención no está limitada a la descripción de los ejemplos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Clonación y expresión de hidantoinasa

La hidantoinasa de *Arthrobacter sp.* (HyuH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se suministró en un vector pOM18. Para la manipulación adicional, era necesaria la subclonación con la orientación correcta del gen HyuH. Se usaron NdeI y HindIII para la doble digestión de vectores pOM18. La cadena principal del vector, gen carbA (carbamoilasa) de pAS6 y gen HyuH de pOM18 se extrajeron del gel de la PCR. Los tres productos extraídos del gel se purificaron por columna (Machery Nagel) y se sometieron a ligado y posterior transformación en DH5α de *E. coli*. Los clones se cultivaron durante la noche en LB-amp y se llevó a cabo la PCR del cultivo usando el cebador directo específico del gen de carbA y el cebador inverso para comprobar la orientación correcta. El plásmido pAS6-HyuH obtenido contenía el gen de hidantoinasa de tipo natural, que expresaba la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el gen de carbamoilasa que expresaba la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Los plásmidos del clon deseado se prepararon y se transformaron en células JM109 que contenían pOM21c (plásmido que expresa la hidantoina racemasa) para la comprobación de la expresión y de la actividad. Para el análisis de expresión, el precultivo se cultivó en medio LB (con antibióticos adecuados) durante

la noche a 37. Se añadieron 10 µl del precultivo a 3 ml de medio inductor (medio LB + ramnosa 2 mg/ml). El cultivo se cultivó durante 20 h a 30°C. 5 µl de células se sometieron a análisis de SDS PAGE. Se usó en el ensayo de cribado basado en fluorescencia para comprobar la actividad de la enzima.

#### Ejemplo 2: Mutantes de hidantoinasa

- 5 Se determinaron varios sitios dentro de la hidantoinasa de *Arthrobacter sp.* de tipo natural (SEQ ID NO: 1) para la mutagénesis. Se preparó una biblioteca mutante por mutagénesis de saturación en las posiciones de aminoácidos elegidas. Después, se cribó en la biblioteca mutante racional la mayor actividad usando el ensayo de cribado de alta capacidad. Se seleccionaron 5 sitios para saturación del sitio (Y72, I95, V154, P155, H316) y 2 sitios para mutagénesis (A152G, S153G). Para las posiciones de aminoácidos determinadas se llevaron a cabo 5 mutagénesis de saturación de sitio y 1 mutación de sitio dirigido.

#### Ejemplo 2.1: Construcción de bibliotecas mutantes enfocadas (SSM y SDM)

Se aplicó la polimerasa Phusion para la mutagénesis de saturación de sitio (ssm) y la mutagénesis de sitio dirigido (sdm) usando el plásmido obtenido en el ejemplo 1 (pAS6-HyuH; Fig. 1) que expresa la hidantoinasa de tipo natural o en una etapa posterior un plásmido que lleva un mutante de dicha hidantoinasa.

- 15 Para la mutagénesis de saturación/dirigida de sitio se aplicó un procedimiento de PCR de dos etapas para la generación de bibliotecas mutantes enfocadas. El producto de la PCR se purificó por columna y se sometió a digestión por DpnI durante la noche para eliminar el plásmido original. El producto que representa un plásmido de longitud completa que tiene todos los elementos de pAS6-HyuH después se transformó en células JM109 que contenían pOM21c.
- 20 En detalle: se siguió un protocolo de la PCR de dos etapas para la mutagénesis de sitio de saturación/dirigida (SSM). 50 µl de la mezcla de reacción de la PCR contenían 1 ng/µl de molde de plásmido, 1x tampón de Phusion (New England Biolabs, Frankfurt, Alemania), 1 U de polimerasa de Phusion y dNTP 300 µM. La mezcla de reacción se dividió en dos volúmenes iguales y se añadieron 400 nM de cebador directo y cebador inverso para la saturación de sitio de la respectiva posición de aminoácido (véase la tabla 1) a las mezclas de reacción separadas. El programa de la PCR era 98°C durante 45 s (1 ciclo); 98°C durante 15 s; 65°C durante 30 s; 72°C durante 3 min 30 s (5 ciclos); 72°C durante 5 min (1 ciclo). Después de la primera etapa, se juntaron ambas reacciones y se llevó a cabo el mismo programa con 18 repeticiones más.

La tabla 1 resume los cebadores (F = cebador directo; R = cebador inverso) usados para los métodos de la PCR descritos, indicando también la posición de aminoácido de la SEQ ID NO: 1 que se va a modificar.

#### 30 Ejemplo 2.2: Construcción de bibliotecas mutantes aleatorias de hidantoinasa de *Arthrobacter sp.* (HyuH)

- Para la generación de la biblioteca de mutantes por epPCR se generaron condiciones propensas al error usando MnCl<sub>2</sub>. La PCR se llevó a cabo inicialmente variando la concentración de MnCl<sub>2</sub> (0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM). La mezcla de reacción contenía 0,3 ng/µl de molde de plásmido (usando el plásmido obtenido en el ejemplo 1 [pAS6-HyuH; Fig. 1] que expresa la hidantoinasa de tipo natural o en una etapa posterior de los estudios un plásmido que lleva un mutante de dicha hidantoinasa obtenida), 1x tampón de Taq SeSaM® (SeSaM-Biotech GmbH, Bremen, Alemania), 1 U de polimerasa de Taq SeSaM®, 200 µM dNTPs y cebadores HyuH\_GS\_F y HyuH\_R 250 nM mostrados en la tabla 1 cada uno junto con una concentración variable de MnCl<sub>2</sub>. El programa de la PCR era 94°C durante 2 min (1 ciclo); 94°C durante 30 s; 56°C durante 30 s; 72°C durante 50 s (25 ciclos); 72°C durante 5 min (1 ciclo). Se usó el protocolo de SeSaM® (Mundhada et al. "SeSaM-Tv-II generates a protein sequence space that is unobtainable by epPCR" *Chembiochem*. 2011 Jul 4; 12(10):1595-601) para construir la biblioteca de mutantes desplazada de transversión. Los productos de la PCR se purificaron por columna y se sometieron a Megawhop para la clonación. 50 µl de mezclas de reacción de la PCR contenían molde de plásmido 1 ng/µl, 1 x tampón de Phusion (New England Biolabs, Frankfurt, Alemania), 1 U de polimerasa de Phusion, dNTP 300 µM y 5 ng/µl de molde mutado de epPCR o SeSaM®. El programa de la PCR para Megawhop era 72°C 3 min (1 ciclo); 98°C 45 s (1 ciclo); 98°C durante 15 s; 62°C durante 30 s; 72°C durante 5 min (25 ciclos); 72°C durante 5 min (1 ciclo). Después, la mezcla de la PCR se purificó en columna y se sometió a digestión por DpnI (10 U) durante la noche. El producto de la PCR que representa un plásmido de longitud completa que tiene todos los elementos de pAS6-HyuH se transformó en células JM109 químicamente competentes (Promega, Mannheim, Alemania) para la expresión de proteínas y posterior análisis.

#### 50 Ejemplo 2.3: Construcción de bibliotecas mutantes enfocadas Omichange

- El protocolo de Omichange permite la mutagénesis de saturación de sitio en posiciones remotas en la secuencia. Procede en cuatro etapas, empezando por la generación de fragmentos por PCR con cebadores que contienen codones NNK y enlaces fosforotodiéster, después la reacción de escisión de ADN con yodo elemental para la generación de segmentos protuberantes 5', en tercer lugar, la hibridación de ADN y finalmente la transformación y reparación de mella.

En detalle, 50 µl de mezcla de reacción de la PCR contenía molde de plásmido 0,5 ng/µl, 1 x tampón de Phusion

(New England Biolabs, Frankfurt, Alemania), 5 U de polimerasa de Phusion, dNTP 200  $\mu$ M y cebador directo e inverso específico de fragmento 400  $\mu$ M. El programa de la PCR para el fragmento corto era 94°C durante 3 min (1 ciclo); 94°C durante 30 s; 55°C durante 30 s; 72°C durante 30 s (25 ciclos); 72°C durante 1 min (1 ciclo). Para el fragmento de vector el programa de la PCR se cambió a 94°C durante 3 min (1 ciclo); 94°C durante 30 s; 55°C durante 30 s; 72°C durante 1,5 min (25 ciclos); 72°C durante 3 min (1 ciclo). Las mezclas de la PCR después se purificaron por columna y se sometieron a digestión por DpnI (10U) durante la noche, se purificaron por columna y se diluyeron a 0,05 pmol/pl. Se llevaron a cabo la escisión con yodo y la hibridación del fragmento de ADN de acuerdo con el protocolo original de Omnichange (Dennig et al. "OmniChange: The Sequence Independent Method for Simultaneous Site-Saturation of Five Codons" *PLoS ONE*, 2011, 6(10): e26222). Los productos de la hibridación después se transformaron en células JM109 químicamente competentes (Promega, Mannheim, Alemania) para la expresión y posterior análisis de proteínas.

#### Ejemplo 3: Ensayo de cribado basado en fluorescencia para placas de microvaloración (MTP)

Precltivo y expresión: se inocularon 100  $\mu$ l de medio LB que contenía el antibiótico adecuado en placas de microvaloración de 96 pocillos (MTP) con controles positivos y negativos así como con clones obtenidos, usando un palillo. Las placas se incubaron a 37°C (900 rpm) durante la noche. Para preparar las placas de cribado, se transfirieron clones a una nueva MTP con 200  $\mu$ l/pocillo de medio con antibiótico y ramnosa 2 mg/ml usando un replicador de 96 pocillos. Al resto del material de las placas se añadieron 100  $\mu$ l de glicerol al 50% (p/p), se mezcló brevemente y las placas se almacenaron a -80°C.

Biotransformación: Después de incubación a 30°C (900 rpm) durante la noche, se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de suspensión de L o D-triptófano-hidantoína homogeneizada (5 mg/ml en tampón de PBS a pH 7,4) a las placas de cribado. Las placas se incubaron a 30°C y 900 rpm y se midió la fluorescencia a 300/350 nm con un lector de placa adecuado en diferentes tiempos de medición.

#### Ejemplo 4: Resultados

Las hidantoinasas mutantes obtenidas del experimento de mutagénesis de saturación de sitio y la biblioteca de mutagénesis aleatoria de acuerdo con el ejemplo 2, se cribaron con respeto a su actividad usando el ensayo de fluorescencia descrito en el ejemplo 3. La lectura se refería a la medición diferencial entre 40 min y 60 min. Cada medición se llevó a cabo por triplicado. Como se ha descrito antes, se llevó a cabo el ensayo de las hidantoinasas mutantes con respecto a su actividad usando como sustratos L-5-indolilmetilhidantoína (= L-triptófano-hidantoína) y D-5-indolilmetilhidantoína (= D-triptófano-hidantoína), respectivamente, y sus actividades se compararon con la actividad de la hidantoinasa de tipo natural que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos. Como se muestra en ella, se obtuvieron una serie de mutantes mejorados que mostraban mayor actividad catalítica y/o mayor enantioselectividad comparado con la hidantoinasa de tipo natural producida por el microorganismo *Arthrobacter sp.* que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En la tabla 2, la columna "ciclos de mutagénesis" indica de qué tipo de mutagénesis deriva el mutante (SSM = mutagénesis de saturación de sitio; epPCR; PCR propensa a error; SSM combi = mutagénesis por saturación de sitio combinatoria, una mutagénesis en más de una posición de aminoácido). En la columna indicada "sustituciones" se indica la sustitución de un resto de aminoácido en la posición dada en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

La columna designada "Relación de actividad de D-Trp-hyd a HyuH nat" muestra el número de veces de mejora de la actividad catalítica con respecto a la hidantoinasa de tipo natural usando D-5-indolilmetilhidantoína (= D-triptófano-hidantoína) como sustrato. La columna designada "Relación de actividad de L-Trp-hyd a HyuH nat" muestra el número de veces de mejora de la actividad catalítica con respecto a la hidantoinasa de tipo natural usando L-5-indolilmetilhidantoína (= L-triptófano-hidantoína) como sustrato.

La columna de "Relación de actividad de D-Trp-hyd a L-Trp-hyd" indica la relación de la actividad catalítica de la hidantoinasa mutante para transformar la D-5-indolilmetilhidantoína frente a la actividad de la hidantoinasa mutante para transformar la L-5-indolilmetilhidantoína y muestra el número de veces de exceso de preferencia por cada enantiómero. En otras palabras, la columna "Relación de actividad de D-Trp-hyd a L-Trp-hyd" indica la enantioselectividad de la respectiva hidantoinasa.

La hidantoinasa de acuerdo con la presente invención mostraba mayores tasas de transformación con respecto a los compuestos de hidantoína 5-sustituída, en particular la D-triptófano-hidantoína. Por lo tanto, los mutantes de hidantoinasa de acuerdo con la presente invención descritos en la presente memoria se consideraban adecuados en un procedimiento para la producción de D-aminoácidos, en particular D-triptófano, partiendo de la D-triptófano-hidantoína usando la hidantoinasa mutante de acuerdo con la presente invención, así como la D-carbamoilasa.

Tabla 1. Lista de los cebadores y sus secuencias. El nombre del cebador indica el sitio diana para las bibliotecas mutantes enfocadas.

Posición(es) de aminoácido (F = cebador directo; R = cebador inverso)	SEQ ID NO:	Propósito	Secuencia
Y72 (F)	21	ssm	ATC TGA AGA ACC GGN NKG GCC GCT TCG AAC T
Y72 (R)	22	ssm	AGT TCG AAG CGG CCM NNC CGG TTC TTC AGA T
I95 (F)	23	ssm	CAT CGA GAT GCC GNN KAC CTT CCC GCC CAC
I95 (R)	24	ssm	GTG GGC GGG AAG GTM NNC GGC ATC TCG ATG
V154 (F)	25	ssm	TGA TGG CAG CCT CAN NKC CGG GCA TGT TCG
V154 (R)	26	ssm	CGA ACA TGC CCG GMN NTG AGG CTG CCA TCA
P155 (F)	27	ssm	TGG CAG CCT CAG TTN NKG GCA TGT TCG ACG
P155 (R)	28	ssm	GCG TCG AAC ATG CCM NNA ACT GAG GCT GCC A
G156 (F)	29	ssm	CAG CCT CAG TTC CGN NKC AGC CTC AGT TCC G
G156 (R)	30	ssm	CGG AAC TGA GGC TGM NNC GGA ACT GAG GCT G
H316 (F)	31	ssm	CCC TTG GGT CAG ACN NKG GCG GAC ATC CTG
H316 (R)	32	ssm	CAG GAT GTC CGC CMN NGT CTG ACC CAA GGG
A285 (F)	33	ssm	CGT ATA TGA AGG TCN NKC CGC CCG TCC GCT CA
A285 (R)	34	ssm	TGA GCG GAC GGG CGG MNN GAC CTT CAT ATA CG
V284 (F)	35	ssm	GAC CGT ATA TGA AGN NKG CGC CGC CCG TC
V284 (R)	36	ssm	GAC GGG CGG CGC MNN CTT CAT ATA CGG TC
P94 (F)	37	ssm	CAC CAT CAT CGA GAT GNN KAT AAC CTT CCC G
P94 (R)	38	ssm	CGG GAA GGT TAT MNN CAT CTC GAT GAT GGT G
P98 (F)	39	ssm	TGC CGA TAA CCT TCN NKC CCA CCA CTT TGG
P98 (R)	40	ssm	CCA AAG TGG TGG TGG GMN NGA AGG TTA TCG GCA
P99 (F)	41	ssm	CGA TAA CCT TCC CGN NKA CCA CCA CTT TGG AC
P99 (R)	42	ssm	GTC CAA AGT GGT MNN CGG GAA GGT TAT CG
R71 (F)	43	ssm	GGA TCT GAA GAA CNN KTA TGG CCG CTT CGA AC
R71 (R)	44	ssm	GTT CGA AGC GGC CAT AMN NGT TCT TCA GAT CC
A152 (F)	45	ssm	CAA GTC AAT GAT GGC ANN KTC AGT TCC GGG C
A152 (R)	46	ssm	GCC CGG AAC TGA MNN TGC CAT CAT TGA CTT G
F158 (F)	47	ssm	CAG TTC CGG GCA TGN NKG ACG CCG TCA GCG AC
F158 (R)	48	ssm	GTC GCT GAC GGC GTC MNN CAT GCC CGG AAC TG
R71 Y72 (F)	49	ssm combinatoria	CAT GGA TCT GAA GAA CND TND TGG CCG CTT CGA ACT C
R71 Y72 (R)	50	ssm combinatoria	GAG TTC GAA GCG GCC AHN AHN GTT CTT CAG ATC CAT G
A152 V154 (F)	51	ssm combinatoria	GCT TCA AGT CAA TGA TGG CAN DTT CAN DTC CGG GCA TGT TCG AC
A152 V154 (R)	52	ssm combinatoria	GTC GAA CAT GCC CGG AHN TGA AHN TGC CAT TGA CTT GAA GC
V284 A285 (F)	53	ssm combinatoria	GGA CCG TAT ATG AAG NDT NDT CCG CCC GTC CGC TC
V284 A285 (R)	54	ssm combinatoria	GAG CGG ACG GGC GGA HNA HNC TTC ATA TAC GGT CC
I65 (F)	55	ssm	GAA CAT GTG CAT ATC NNC GAC ATG GAT CTG AAG
I65 (R)	56	ssm	CTT CAG ATC CAT GTC MNN GAT ATG CAC ATG TTC

Posición(es) de aminoácido (F = cebador directo; R = cebador inverso)	SEQ ID NO:	Propósito	Secuencia
HyuH_R	57	cebador inverso específico de gen de HyuH	TCA CTT CGA CGC CTC GTA GTC G
HyuH_GS_F	58	cebador directo específico de gen para epPCR	ATG TTT GAC GTA ATA GTT AAG AAC TGC CG
SeSaMR_HyuHR2	59	construcción de biblioteca SeSaM	GTG TGA TGG CGT GAG GCA GCC TAC TGC CGC CAG GCA AAT TCT
SEeSaMF_carbAF	60	construcción de biblioteca SeSaM	CAC ACT ACC GCA CTC CGT CGC GTC AGC CAC AGC ACT ACG G
S14 (F)	61	OmniChange	cgtatggtgccnNKGACGCGGAATCACCAG
S14 (R)	62	OmniChange	ggacaccatagcGCA GTT CTT AAC TAT TAC G
S37 (F)	63	OmniChange	agctcgacacaNKGATGTTGAGCGGAG
S37 (R)	64	OmniChange	tgt gtc cga get GAT TGC GGC G
S153 V154 (F)	65	ssm combi	GTC AATGATGGCAAGTNDTDNYCCGGGCATGTTGACCG
S153 V154 (R)	66	ssm combi	CGT CGA ACA TGC CCG GRN HAH NAC TTG CCA TCA TTG AC
S14 D15 (F)	67	ssm combi	CCGTATGGTGTCCBBTNNKGGAAATCACCAGG
S14 D15 (R)	68	ssm combi	CCT CGG TGA TTC CMN NAV VGG ACA CCA TAC GG
C64I (F)	69	sdm	GAACATGTGCATATCATCGACATGGATCTGAAGA
C64I (R)	70	sdm	TCT TCA GAT CCA TGT CGA TGA TAT GCA CAT GTT C
S152A (F)	71	sdm	CAA GTC AAT GAT GGC AGC CTC AGT TCC GGG CAT G
S152A (R)	72	sdm	CAT GCC CCG AAC TGA GGC TGC CAT CAT TGA CTT G

Tabla 2: Resumen de la actividad y selectividad de todos los mutantes HyuH.

Nombre del mutante	ciclo de mutagénesis	Sustituciones	Relación de actividad de D-Trp-hyd a HyuH nat	Relación de actividad de L-Trp-hyd a HyuH nat	Relación de actividad de D-Trp-hyd a L-Trp-hyd
P2.2	SSM - I95	I95H	~1,2	~1,2	~1
P3.1	SSM - V154	V154G	~1,3	~1,3	~1
P6.1	SSM - V154	V154N	~1,3	~1,3	~1
P15.2	SSM - R71	R71Q	1,0	1,0	0,97
P24.3	SSM - R71	R71D	1,9	1,9	1,76
P25.2	SSM - R71	R71E	1,9	1,2	1,58
P32.2	SSM - A152	A152G	4,0	0,9	4,61
P33.18	SSM - A152	A152T	3,3	1,0	3,21
P34.8	SSM - V284	V284F	1,8	1,1	1,60
P37.1	SSM - A285	A285D	1,1	0,2	6,19
P3.11	SSM - V154	V154A	2,0	0,67	3,03
P7.3	epPCR	I64T	2,1	0,31	6,87
P7.4	epPCR	I64V	1,9	0,54	3,49
P10.1	epPCR	V154S	1,6	0,34	4,84
P18.1	epPCR	V154A, T398A, H452L	1,4	0,29	4,89

Nombre del mutante	ciclo de mutagénesis	Sustituciones	Relación de actividad de D-Trp-hyd a HyuH nat	Relación de actividad de L-Trp-hyd a HyuH nat	Relación de actividad de D-Trp-hyd a L-Trp-hyd
P52.2	SSM combi	A152S, V154I	7,26	0,43	16,76
P52.7	SSM combi	A152V, V154C	1,38	0,23	6,07
P53.2	SSM combi	A152C, V154S	6,49	0,44	14,86
P53.3	SSM combi	A152S	5,09	0,95	5,34
P56.3	SSM combi	R71D, Y72H, A152S	5,26	0,37	14,33
P56.9	SSM combi	R71V, Y72N, A152S	4,03	0,19	20,74
P59.1	SSM combi	R71S, Y72N, A152C, V154S, V181A	3,73	0,13	29,79
P60.5	SSM combi	R71D, Y72N, A152S	3,73	0,07	54,61
P61.1	SSM combi	R71Y, Y72N, A152S	4,13	0,03	131,16
P62.1	SSM combi	R71L, A152C, V154S	4,79	0,13	36,85
P62.2	SSM combi	R71Y, Y72H, A152S	3,66	0,06	57,15
P76.1	SSM5 - I64	I64V, R71I, Y72N, A152S	10,97	0,04	245,23
P83.2	SSM5 - I64	I64C, R71Y, Y72N, A152S	6,76	0,08	89,72
P84.1	SSM5 - I64	I64C, R71D, Y72H, A152S	4,48	0,13	34,57
P106.2	epPCR2	I64C, R71D, Y72H, A152S, F448L	6,05	0,06	93,63
P110.1	epPCR2	I64C, R71D, Y72H, A152S, M417V	5,62	0,14	39,90
P111.1	epPCR2	S14G, I64C, R71D, Y72H, A152S	3,50	0,15	23,11
P112.1	epPCR2	S37R, I64C, R71D, Y72H, A152S	3,74	0,14	26,68
P119.1	epPCR2	S14G, I64C, R71D, Y72H, A152S, E358K	9,12	0,05	181,46
P121.1	epPCR3	S37R, I64C, R71D, Y72H, A152S, V318A	10,15	0,08	120,79
P128.1	epPCR3	S37R, I64C, R71D, Y72H, A152S, N303S, Q404R	9,50	0,07	136,72
P130.1	epPCR3	S14G, I64C, R71D, Y72H, A152S, N70D	4,93	0,06	76,53
P132.3	epPCR3	S14G, I64C, R71D, Y72H, A152S, V154A	5,31	0,01	480,31
P137.1	Omnichange	S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S	21,47	0,20	150,97
P138.1	Omnichange	S14A, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S	21,13	0,20	180,00
P140.1	Omnichange	S14V, I64C, R71D, Y72H, A152S	21,42	0,20	186,89
P140.2	Omnichange	S14G, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S	21,49	0,20	187,98
P143.1	Omnichange	S14A, S37W, I64C, R71D, Y72H, A152S	17,06	0,16	230,36
P143.2	Omnichange	S14A, S37V, I64C, R71D, Y72H, A152S	19,97	0,19	187,91
P143.3	Omnichange	D15N, I64C, R71D, Y72H, A152S	20,61	0,19	160,71
P143.4	Omnichange	S14V, S37R, I64C, R71D, Y72H, A152S	20,58	0,19	171,64
P146.1	SSM combi 3	D15N, I64C, R71D, Y72H, A152S, V154C	4,61	0,04	129,72
P148.3	SSM combi 3	D15N, I64C, R71D, Y72H, A152S, V154I	4,18	0,07	60,60
P152.4	SSM combi 4	S14P, D15G, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S	11,63	0,21	56,37
P152.5	SSM combi 4	S14G, D15R, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S	16,92	0,06	277,95
P153.2	SSM combi 4	S14G, D15Q, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S	12,75	0,00	5069,66
P153.3	SSM combi 4	S14F, D15A, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S	10,46	0,10	110,01
P156.1	SSM combi 4	D15S, S37G, I64C, R71D, Y72H, A152S	6,75	0,17	38,67
P161.7	SDM C64I	S14P, D15G, S37G, R71D, Y72H, A152S	4,01	0,08	52,00
P161.9	SDM S152A	S14P, D15G, S37G, I64C, R71D, Y72H	2,42	0,06	41,82

Nombre del mutante	ciclo de mutagénesis	Sustituciones	Relación de actividad de D-Trp-hyd a HyuH nat	Relación de actividad de L-Trp-hyd a HyuH nat	Relación de actividad de D-Trp-hyd a L-Trp-hyd
P162.9	SDM S152A	D15S, S37G, I64C, R71D, Y72H	3,19	0,10	31,84



Lista de secuencias

<110> Evonik Industries AG

<120> Mutantes de Hidantoinasa

5

<130> 201100405

<160> 119

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 458

15

<212> PRT

<213> Arthrobacter sp.

<400> 1

Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Arg Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ala Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
165 170 175

20

ES 2 652 387 T3

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
 180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
 195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
 210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
 225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
 245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
 260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
 275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
 290 295 300

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
 305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
 325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
 340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

5 <210> 2  
 <211> 1377  
 <212> ADN

ES 2 652 387 T3

<213> Arthrobacter sp.

<400> 2

```

atgtttgacg taatagttaa gaactgccgt atggtgtcca gcgacggaat caccgaggca      60
gacattctgg tgaagacggy caaagtccgc gcaatcagct cggacacaag tgatgttgag      120
gcgagccgaa ccattgacgc ggggtggcaag ttcgtgatgc cgggctggtg cgatgaacat      180
gtgcatatca tcgacatgga totgaagaac cggatggccc gcttcgaact cgattccgag      240
tctgcggccg tgggaggcat caccaccatc atcgagatgc cgataacctt cccgccacc      300
accactttgg acgccttcct cgaaaagaag aagcaggcgy ggcagcgytt gaaagttgac      360
ttcgcgctct atggcgytgg agtgccgyga aacctgcccg agatccgcaa aatgcacgac      420
gccggycgag tgggcttcaa gtcaatgatg gcagcctcag ttcgggcat gttcgacgcc      480
gtcagcgacg gcgaactggt cgaaatcttc caggagatcg cagcctgtgg ttcagtctc      540
gtggtccatg ccgagaatga aacgatcatt caagcgtccc agaagcagat caaagccgct      600
ggtcgcaagg acatggccgc ctacgaggca tcccaaccag ttttccagga gaacgaggcc      660
attcagcgtg cgttactact gcagaaagaa gccgctgtc gactgattgt gttcacgty      720
agcaaccctg acggggtcga gctgatacat caggcgyaat ccgagggcca ggacgtccac      780
tgcgagtcgg tccgcagta totgaatata accacggacg acgcccgaac aatcgyaccg      840
tatatgaagg tcgcccgcgc cgtcccctca gccgagatga acgtcagatt atgggaacaa      900
cttgagaacg ggctcatcga cacccttggg tcagaccacg gcggacatcc tgtcgaggac      960
aaagaacccg gctggaagga cgtgtggaaa gccggaacg gtgcgctggg cttgagaca      1020
tccctgccta tgatgctgac caacggagty aataaaggca ggctatcctt ggaacgcctc      1080
gtcgaggtga tgtcgagaa acctgcgaag ctctttggca tctatccgca gaagggcacg      1140
ctacaggttg gttccgacgc cgatctgctc atcctcgatc tggatattga caccaaagty      1200
gatgcctcgc agttccgatc cctgcataag tacagcccgt tcgacgggat gccctcacg      1260
ggtgcaccgg ttctgacgat ggtgcggyga acgtygtygg cagagaaggy agaagttctg      1320
gtcgagcagg gattcggcca gttcgtcacc cgtcacgact acgaggyctc gaagtyga      1377

```

5

<210> 3

<211> 236

<212> PRT

<213> Agrobacterium sp.

10

<400> 3

ES 2 652 387 T3

Met Arg Ile Leu Val Ile Asn Pro Asn Ser Ser Ser Ala Leu Thr Glu  
 1 5 10 15

Ser Val Ala Asp Ala Ala Gln Gln Val Val Ala Thr Gly Thr Ile Ile  
 20 25 30

Ser Ala Ile Asn Pro Ser Arg Gly Pro Ala Val Ile Glu Gly Ser Phe  
 35 40 45

Asp Glu Ala Leu Ala Thr Phe His Leu Ile Glu Glu Val Glu Arg Ala  
 50 55 60

Glu Arg Glu Asn Pro Pro Asp Ala Tyr Val Ile Ala Cys Phe Gly Asp  
 65 70 75 80

Pro Gly Leu Asp Ala Val Lys Glu Leu Thr Asp Arg Pro Val Val Gly  
 85 90 95

Val Ala Glu Ala Ala Ile His Met Ser Ser Phe Val Ala Ala Thr Phe  
 100 105 110

Ser Ile Val Ser Ile Leu Pro Arg Val Arg Lys His Leu His Glu Leu  
 115 120 125

Val Arg Gln Ala Gly Ala Thr Asn Arg Leu Ala Ser Ile Lys Leu Pro  
 130 135 140

Asn Leu Gly Val Met Ala Phe His Glu Asp Glu His Ala Ala Leu Glu  
 145 150 155 160

Thr Leu Lys Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Gln Glu Asp Gly Ala Glu  
 165 170 175

Ser Ile Val Leu Gly Cys Ala Gly Met Val Gly Phe Ala Arg Gln Leu  
 180 185 190

Ser Asp Glu Leu Gly Val Pro Val Ile Asp Pro Val Glu Ala Ala Cys  
 195 200 205

Arg Val Ala Glu Ser Leu Val Ala Leu Gly Tyr Gln Thr Ser Lys Ala  
 210 215 220

Asn Ser Tyr Gln Lys Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Leu  
 225 230 235

5 <210> 4  
 <211> 306  
 <212> PRT  
 <213> Agrobacterium sp.

10 <400> 4

ES 2 652 387 T3

Met Thr Arg Gln Met Ile Leu Ala Val Gly Gln Gln Gly Pro Ile Ala  
 1 5 10 15

Arg Ala Glu Thr Arg Glu Gln Val Val Gly Arg Leu Leu Asp Met Leu  
 20 25 30

Thr Asn Ala Ala Ser Arg Gly Val Asn Phe Ile Val Phe Pro Glu Leu  
 35 40 45

Ala Leu Thr Thr Phe Phe Pro Arg Trp His Phe Thr Asp Glu Ala Glu  
 50 55 60

Leu Asp Ser Phe Tyr Glu Thr Glu Met Pro Gly Pro Val Val Arg Pro  
 65 70 75 80

Leu Phe Glu Thr Ala Ala Glu Leu Gly Ile Gly Phe Asn Leu Gly Tyr  
 85 90 95

Ala Glu Leu Val Val Glu Gly Gly Val Lys Arg Arg Phe Asn Thr Ser  
 100 105 110

Ile Leu Val Asp Lys Ser Gly Lys Ile Val Gly Lys Tyr Arg Lys Ile  
 115 120 125

His Leu Pro Gly His Lys Glu Tyr Glu Ala Tyr Arg Pro Phe Gln His  
 130 135 140

Leu Glu Lys Arg Tyr Phe Glu Pro Gly Asp Leu Gly Phe Pro Val Tyr  
 145 150 155 160

Asp Val Asp Ala Ala Lys Met Gly Met Phe Ile Cys Asn Asp Arg Arg  
 165 170 175

Trp Pro Glu Thr Trp Arg Val Met Gly Leu Lys Gly Ala Glu Ile Ile  
 180 185 190

Cys Gly Gly Tyr Asn Thr Pro Thr His Asn Pro Pro Val Pro Gln His  
 195 200 205

Asp His Leu Thr Ser Phe His His Leu Leu Ser Met Gln Ala Gly Ser

ES 2 652 387 T3

210	215	220																
Tyr	Gln	Asn	Gly	Ala	Trp	Ser	Ala	Ala	Ala	Gly	Lys	Val	Gly	Met	Glu			
225					230					235					240			
Glu	Gly	Cys	Met	Leu	Leu	Gly	His	Ser	Cys	Ile	Val	Ala	Pro	Thr	Gly			
				245					250					255				
Glu	Ile	Val	Ala	Leu	Thr	Thr	Thr	Leu	Glu	Asp	Glu	Val	Ile	Thr	Ala			
			260					265						270				
Ala	Val	Asp	Leu	Asp	Arg	Cys	Arg	Glu	Leu	Arg	Glu	His	Ile	Phe	Asn			
		275					280						285					
Phe	Lys	Ala	His	Arg	Gln	Pro	Gln	His	Tyr	Gly	Leu	Ile	Ala	Glu	Phe			
	290					295					300							

Gly Ile  
305

5 <210> 5  
<211> 458  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> polipéptido mutante

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (64)..(64)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentra de forma natural

20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (71)..(72)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentra de forma natural

25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (95)..(95)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentra de forma natural

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (152)..(152)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentra de forma natural

35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (154)..(154)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentra de forma natural

40 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (181)..(181)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentra de forma natural

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (284)..(285)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentra de forma natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (398)..(398)

5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentra de forma natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (452)..(452)

10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentra de forma natural

<400> 5

Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Xaa  
50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Xaa Xaa Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Xaa Thr  
85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Xaa Ser Xaa Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
165 170 175

ES 2 652 387 T3

Gly Ser Val Val Xaa Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
 180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
 195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
 210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
 225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
 245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
 260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Xaa Xaa Pro Pro Val  
 275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
 290 295 300

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
 305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
 325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
 340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Xaa Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg Xaa Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

5 <210> 6  
 <211> 458  
 <212> PRT



ES 2 652 387 T3

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia mutante

5

<220>

<221> VARIANTE

<222> (152)..(152)

<223> A sustituido por G

10

<400> 6

Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Arg Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Gly Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala

# ES 2 652 387 T3

145	150	155	160
Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys	165	170	175
Gly Ser Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala	180	185	190
Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr	195	200	205
Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala	210	215	220
Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val	225	230	235
Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly	245	250	255
Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr	260	265	270
Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val	275	280	285
Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly	290	295	300
Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp	310	315	320
Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu	325	330	335
Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys	340	345	350
Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro	355	360	365
Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly	370	375	380
Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val	385	390	395
			400

ES 2 652 387 T3

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

<210> 7  
 <211> 458  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> secuencia mutante

10

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (152)..(152)  
 <223> A sustituido por C

15

<400> 7  
 Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
 20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
 35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
 50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Arg Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
 85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
 100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

ES 2 652 387 T3

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Cys Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
165 170 175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
290 295 300

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

ES 2 652 387 T3

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 8  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10  
<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (152)..(152)  
<223> A sustituido por S

15 <400> 8  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Arg Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

<210> 9  
 <211> 458  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> secuencia mutante

10

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (152)..(152)  
 <223> A sustituido por T

15

<400> 9  
 Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
 20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
 35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
 50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Arg Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
 65 70 75 80

ES 2 652 387 T3

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Thr Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
165 170 175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
290 295 300

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335



ES 2 652 387 T3

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
 340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

<210> 10  
 <211> 458  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> secuencia mutante

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (152)..(152)  
 <223> A sustituido por V

15 <400> 10  
 Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
 20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
 35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 11  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10  
<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (152)..(152)  
<223> A sustituido por S

15  
<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (154)..(154)  
<223> V sustituido por I

20  
<400> 11  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

ES 2 652 387 T3

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
 20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
 35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
 50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Arg Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
 85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
 100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
 130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ser Ser Ile Pro Gly Met Phe Asp Ala  
 145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
 165 170 175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
 180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
 195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
 210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
 225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
 245 250 255

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

ES 2 652 387 T3

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

<210> 12  
 <211> 458  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> secuencia mutante

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (152)..(152)  
 <223> A sustituido por V

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (154)..(154)  
 <223> V sustituido por C

20 <400> 12

ES 2 652 387 T3

Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
 20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
 35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
 50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Arg Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
 85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
 100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
 130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Val Ser Cys Pro Gly Met Phe Asp Ala  
 145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
 165 170 175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
 180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
 195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
 210 215 220

ES 2 652 387 T3

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
290 295 300

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 13  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (152)..(152)  
<223> A sustituido por C

ES 2 652 387 T3

<220>

<221> VARIANTE

<222> (154)..(154)

5 <223> V sustituido por S

<400> 13

Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Arg Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Cys Ser Ser Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
165 170 175



ES 2 652 387 T3

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
 180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
 195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
 210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
 225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
 245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
 260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
 275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
 290 295 300

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
 305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
 325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
 340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

5 <210> 14  
 <211> 458  
 <212> PRT

ES 2 652 387 T3

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia mutante

5

<220>

<221> VARIANTE

<222> (71)..(71)

<223> R sustituido por D

10

<220>

<221> VARIANTE

<222> (72)..(72)

<223> Y sustituido por H

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> (152)..(152)

<223> A sustituido por S

20

<400> 14

Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
 20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
 35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
 50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Asp His Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
 85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
 100 105 110

ES 2 652 387 T3

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
 130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ser Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala  
 145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
 165 170 175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
 180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
 195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
 210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
 225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
 245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
 260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
 275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
 290 295 300

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
 305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
 325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
 340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

ES 2 652 387 T3

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

<210> 15  
 <211> 458  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> secuencia mutante

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (71)..(71)  
 <223> R sustituido por D

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (72)..(72)  
 <223> Y sustituido por N

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (152)..(152)  
 <223> A sustituido por S

25 <400> 15  
 Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
 20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
 35 40 45

ES 2 652 387 T3

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Asp Asn Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ser Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
165 170 175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
290 295 300

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

5 <210> 16  
<211> 458  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> secuencia mutante

15 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (71)..(71)  
<223> R sustituido por V

20 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (72)..(72)  
<223> Y sustituido por N

25 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (152)..(152)  
<223> A sustituido por S

<400> 16

ES 2 652 387 T3

Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
 20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
 35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
 50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Val Asn Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
 85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
 100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
 130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ser Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala  
 145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
 165 170 175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
 180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
 195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
 210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
 225 230 235 240

ES 2 652 387 T3

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
 245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
 260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
 275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
 290 295 300

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
 305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
 325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
 340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

<210> 17  
 <211> 458  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> secuencia mutante

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (71)..(71)  
 <223> R sustituido por S

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (72)..(72)



<223> Y sustituido por N

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> (152)..(152)

<223> A sustituido por C

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (154)..(154)

<223> V sustituido por S

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (181)..(181)

<223> V sustituido por A

<400> 17

Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Ser Asn Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
115 120 125

20

ES 2 652 387 T3

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
 130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Cys Ser Ser Pro Gly Met Phe Asp Ala  
 145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
 165 170 175

Gly Ser Val Val Ala Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
 180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
 195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
 210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
 225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
 245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
 260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
 275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
 290 295 300

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
 305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
 325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
 340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

ES 2 652 387 T3

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 18  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10  
<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (71)..(71)  
<223> R sustituido por Y

15  
<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (72)..(72)  
<223> Y sustituido por N

20  
<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (152)..(152)  
<223> A sustituido por S

25  
<400> 18  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
50 55 60

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
 325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
 340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

<210> 19

<211> 458

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia mutante

10

<220>

<221> VARIANTE

<222> (71)..(71)

<223> R sustituido por L

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> (152)..(152)

<223> A sustituido por C

20

<220>

<221> VARIANTE

<222> (154)..(154)

<223> V sustituido por S

25

<400> 19

ES 2 652 387 T3

Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
 20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
 35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile  
 50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Leu Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
 65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
 85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
 100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
 130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Cys Ser Ser Pro Gly Met Phe Asp Ala  
 145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
 165 170 175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
 180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
 195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
 210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
 225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
 245 250 255

ES 2 652 387 T3

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
 260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
 275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
 290 295 300

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
 305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
 325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
 340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

- <210> 20
- <211> 458
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
  
- <220>
- <223> secuencia mutante
- 10 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (71)..(71)
- <223> R sustituido por Y
- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (72)..(72)
- <223> Y sustituido por H
- 20 <220>

ES 2 652 387 T3

<221> VARIANTE  
 <222> (152)..(152)  
 <223> A substituido por S

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



ES 2 652 387 T3

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
 195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
 210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
 225 230 235

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
 245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
 260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
 275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
 290 295 300

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
 305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
 325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
 340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

5 <210> 21  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> péptido sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 5 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <400> 21  
 atctgaagaa ccggnnkggc cgcttccaac t 31  
  
 10 <210> 22  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> ADN sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (16)..(17)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <400> 22  
 25 agttcgaagc ggccmnnccg gttctcaga t 31  
  
 <210> 23  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (14)..(15)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <400> 23  
 40 catcgagatg ccggnkacct tcccgccac 30  
  
 <210> 24  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
  
 50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(17)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 55 <400> 24  
 gtgggcggga aggtmnnccg catctcgatg 30  
  
 <210> 25  
 <211> 30  
 60 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 65  
 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 <223> n es a, c, g, o t

5 <400> 25  
 tgatggcagc ctcanckccg ggcattgtcg 30

<210> 26  
 <211> 30  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADN sintético

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 <223> n es a, c, g, o t

20 <400> 26  
 cgaacatgcc cggmmtgag gctgcatca 30

<210> 27  
 <211> 30  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 30 <223> ADN sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 35 <223> n es a, c, g, o t

<400> 27  
 tggcagcctc agttnkggc atgttcgacg 30

40 <210> 28  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> ADN sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(17)  
 50 <223> n es a, c, g, o t

<400> 28  
 gcgtcgaaca tgccmnaac tgaggctgcc a 31

55 <210> 29  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> ADN sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 65 <223> n es a, c, g, o t

<223> n es a, c, g, o t  
 <400> 29  
 5 cagcctcagt tccgnkcg cctcagtcc g 31  
 <210> 30  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(17)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <400> 30  
 20 cggaactgag gctgmncgg aactgaggct g 31  
 <210> 31  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <400> 31  
 35 ccctgggtc agacnkggc ggacatcctg 30  
 <210> 32  
 <211> 30  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 50 <400> 32  
 caggatgtcc gccmngtct gaccaaggg 30  
 <210> 33  
 55 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> ADN sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 65 <223> n es a, c, g, o t

<400> 33  
 cgtatatgaa ggtcnnkccg cccgtccgct ca 32

5 <210> 34  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> ADN sintético

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(18)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 34  
 tgagcggacg ggcggmnga ccttcatata cg 32

20 <210> 35  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> ADN sintético

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 <223> n es a, c, g, o t

35 <400> 35  
 gaccgtatat gaagnkcg cgcgccgctc 29

40 <210> 36  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(15)  
 <223> n es a, c, g, o t

50 <400> 36  
 gacggcggc gcmnctca tatacggctc 29

55 <210> 37  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> ADN sintético

65 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(18)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 37  
 caccatcatc gagatgnka taacctccc g 31

<210> 38  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
  
 10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(15)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 15 <400> 38  
 cggaaggt atmncatct cgatgatggt g 31  
  
 <210> 39  
 <211> 33  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 30 <400> 39  
 tgccgataac cttcnkccc accaccactt tgg 33  
  
 <210> 40  
 <211> 33  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 40 <223> ADN sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(19)  
 45 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <400> 40  
 ccaaagtgt ggtggmng aaggttatcg gca 33  
  
 50 <210> 41  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> ADN sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (15)..(16)  
 <223> n es a, c, g, o t  
  
 <400> 41  
 65 cgataacctt cccgnkacc accacttgg ac 32  
  
 <210> 42

<211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> ADN sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (17)..(18)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 42  
 15 gtccaaagtg gtggtmnncg ggaaggttat cg 32

<210> 43  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> ADN sintético

<220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(15)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 43  
 30 ggatctgaag aacnkatg gccgctcga ac 32

<210> 44  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADN sintético

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(19)  
 <223> n es a, c, g, o t

45 <400> 44  
 gtcgaagcg gccatamng ttctcagat cc 32

<210> 45  
 <211> 31  
 50 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADN sintético

55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(18)  
 <223> n es a, c, g, o t

60 <400> 45  
 caagtcaatg atggcannkt cagttccggg c 31

<210> 46  
 65 <211> 31  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(15)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 10  
 <400> 46  
 gcccggaact gamnntgcca tcattgactt g 31  
 <210> 47  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 25  
 <400> 47  
 cagttccggg catgnnkgac gccgtcagcg ac 32  
 30  
 <210> 48  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(18)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 40  
 <400> 48  
 gtcgctgacg gcgcmnna tgcccgaac tg 32  
 45  
 <210> 49  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 55  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(20)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 60  
 <400> 49  
 catggatctg aagaacndtn dtggccgctt cgaactc 37  
 65



<210> 50  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(21)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <400> 50  
 20 gagttcgaag cggccahnah ngttcttcag atccatg 37  
 <210> 51  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(21)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (27)..(27)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 40 <400> 51  
 gcttcaagtc aatgatggca ndttcandtc cgggcatgtt cgac 44  
 <210> 52  
 <211> 44  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (24)..(24)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 60 <400> 52  
 gtcgaacatg cccggahntg aahntgcat cattgactg aagc 44  
 <210> 53  
 65 <211> 35  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 10  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19)..(19)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 15  
 <400> 53  
 ggaccgtata tgaagndtnd tccgcccgtc cgctc 35  
 <210> 54  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(20)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 35  
 <400> 54  
 gagcggacgg gcgahnahn ctcatatac ggtcc 35  
 <210> 55  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(17)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 50  
 <400> 55  
 gaacatgtc atacnnkga catgcatctg aag 33  
 55  
 <210> 56  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(18)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 56  
cttcagatcc atgtcmnnga tatgcacatg ttc 33

5

<210> 57  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> ADN sintético

<400> 57  
tcacttcgac gcctcgtagt cg 22

15

<210> 58  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> ADN sintético

<400> 58  
atgtttgacg taatagtaa gaactgccg 29

25

<210> 59  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Artificial

30

<220>  
<223> ADN sintético

<400> 59  
gtgtgatggc gtgaggcagc ctactgccgc caggcaaatt ct 42

35

<210> 60  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Artificial

40

<220>  
<223> ADN sintético

<400> 60  
cacactaccg cactccgctcg cgtcagccac agcactacgg 40

45

<210> 61  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Artificial

50

<220>  
<223> ADN sintético

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (13)..(14)  
<223> n es a, c, g, o t

60

<400> 61  
cgtatggtgt ccnngacgg aatcaccgag 30

65

<210> 62

<211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> ADN sintético

<400> 62  
 ggacaccata cggcagttct taactattac g 31

10 <210> 63  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> ADN sintético

<220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(14)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 63  
 25 agctcggaca cannkgatgt tgaggcgag 29

<210> 64  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADN sintético

35 <400> 64  
 tgtgtccgag ctgattgcgg cg 22

<210> 65  
 <211> 38  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADN sintético

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 <223> n es a, c, g, o t

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(21)  
 <223> n es a, c, g, o t

55 <400> 65  
 gtcaatgatg gcaagtndtd nyccgggcat gttcgacg 38

<210> 66  
 60 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 65 <223> ADN sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(22)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 10  
 <400> 66  
 cgtcgaacat gcccggrmha hnactgcca tcattgac 38  
 15  
 <210> 67  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(18)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 25  
 <400> 67  
 ccgtaggtg tcbbttnkg gaatcaccga gg 32  
 30  
 <210> 68  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(16)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 40  
 <400> 68  
 cctcgtgat tccmnavvg gacaccatac gg 32  
 45  
 <210> 69  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <400> 69  
 gaacatgtgc atatcatcga catggatctg aaga 34  
 55  
 <210> 70  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 <400> 70  
 tcttcagatc catgtcgtg atatgcacat gtgc 34  
 65

ES 2 652 387 T3

<210> 71  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
  
 10 <400> 71  
 caagccaatg atggcagcct cagttccggg catg 34  
  
 <210> 72  
 <211> 34  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> ADN sintético  
 20  
 <400> 72  
 catgcccgga actgaggctg ccatcattga cttg 34  
  
 <210> 73  
 <211> 458  
 25 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> secuencia mutante  
  
 <400> 73  
 Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
 1 5 10 15  
  
 Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
 20 25 30  
  
 Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
 35 40 45  
  
 Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 74  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 74  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile



ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 75  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 75  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 76  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 76  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile

ES 2 652 387 T3

50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Asp Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ala Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
165 170 175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
290 295 300

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 77  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 77  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 78  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 78  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile



# ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 79  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 79  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile

ES 2 652 387 T3

```
      50                      55                      60
Asp Met Asp Leu Lys Asn Arg Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu
65              70              75              80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr
      85                      90                      95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln
      100                      105                      110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val
      115                      120                      125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val
      130                      135                      140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ala Ser Ala Pro Gly Met Phe Asp Ala
145              150              155              160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys
      165                      170                      175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala
      180                      185                      190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr
      195                      200                      205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala
      210                      215                      220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val
225              230              235              240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly
      245                      250                      255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr
      260                      265                      270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val
      275                      280                      285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly
290              295                      300
```

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 80  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 80  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Thr

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 81  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 81  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Val

ES 2 652 387 T3

```

50             55             60
Asp Met Asp Leu Lys Asn Arg Tyr Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu
65             70             75             80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr
85             90             95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln
100            105            110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val
115            120            125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val
130            135            140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ala Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala
145            150            155            160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys
165            170            175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala
180            185            190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr
195            200            205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala
210            215            220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val
225            230            235            240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly
245            250            255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr
260            265            270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val
275            280            285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly
290            295            300

```

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 82  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 82  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile





ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 83  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 83  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Ala Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg Leu Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 84  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 84  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 85  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 85  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 86  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 86  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile





ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 87  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 87  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 88  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 88  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 89  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 89  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 90  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 90  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys





ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 91  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 91  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 92  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 92  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 93  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 93  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Leu  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 94  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 94  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

50    55    60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Asp His Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65    70    75    80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
    85    90    95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
    100    105    110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
    115    120    125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
130    135    140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ser Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145    150    155    160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
    165    170    175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
    180    185    190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
195    200    205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
210    215    220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
225    230    235    240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
    245    250    255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
260    265    270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
275    280    285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
290    295    300

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Val Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 95  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 95  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Gly Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys

ES 2 652 387 T3

```

50              55              60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Asp His Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu
65                70                75                80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr
85                90                95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln
100               105               110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val
115                120                125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val
130               135               140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ser Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala
145                150                155                160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys
165                170                175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala
180                185                190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr
195                200                205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala
210                215                220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val
225                230                235                240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly
245                250                255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr
260                265                270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val
275                280                285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly
290                295                300

```

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 96  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 96  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Arg Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys

ES 2 652 387 T3

50															
Asp 65	Met	Asp	Leu	Lys	Asn 70	Asp	His	Gly	Arg	Phe 75	Glu	Leu	Asp	Ser	Glu 80
Ser	Ala	Ala	Val	Gly 85	Gly	Ile	Thr	Thr	Ile	Ile	Glu	Met	Pro	Ile	Thr 95
Phe	Pro	Pro	Thr 100	Thr	Thr	Leu	Asp	Ala 105	Phe	Leu	Glu	Lys	Lys	Lys	Gln 110
Ala	Gly	Gln	Arg	Leu	Lys	Val	Asp	Phe	Ala	Leu	Tyr	Gly 125	Gly	Gly	Val
Pro	Gly	Asn	Leu	Pro	Glu	Ile	Arg	Lys	Met	His	Asp	Ala	Gly	Ala	Val 130
Gly 145	Phe	Lys	Ser	Met	Met	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Gly	Met	Phe	Asp	Ala 160
Val	Ser	Asp	Gly	Glu	Leu	Phe	Glu	Ile	Phe	Gln	Glu	Ile	Ala	Ala	Cys 175
Gly	Ser	Val	Val	Val	Val	His	Ala	Glu	Asn	Glu	Thr	Ile	Ile	Gln	Ala 180
Leu	Gln	Lys	Gln	Ile	Lys	Ala	Ala	Gly	Arg	Lys	Asp	Met	Ala	Ala	Tyr 205
Glu	Ala	Ser	Gln	Pro	Val	Phe	Gln	Glu	Asn	Glu	Ala	Ile	Gln	Arg	Ala 210
Leu 225	Leu	Leu	Gln	Lys	Glu 230	Ala	Gly	Cys	Arg	Leu	Ile	Val	Leu	His	Val 240
Ser	Asn	Pro	Asp	Gly	Val	Glu	Leu	Ile	His	Gln	Ala	Gln	Ser	Glu	Gly 255
Gln	Asp	Val	His	Cys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gln	Tyr	Leu	Asn	Ile	Thr	Thr 260
Asp	Asp	Ala	Glu	Arg	Ile	Gly	Pro	Tyr	Met	Lys	Val	Ala	Pro	Pro	Val 275
Arg	Ser	Ala	Glu	Met	Asn	Val	Arg	Leu	Trp	Glu	Gln	Leu	Glu	Asn	Gly 290

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 97  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 97  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Gly Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys

ES 2 652 387 T3

50    55    60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Asp His Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65    70    75    80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
    85    90    95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
    100                                        105                                        110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
    115                                        120                                        125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
    130                                        135                                        140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ser Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145                                        150                                        155                                        160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
    165                                        170                                        175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
    180                                        185                                        190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
    195                                        200                                        205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
210                                        215                                        220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
225                                        230                                        235                                        240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
    245                                        250                                        255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
    260                                        265                                        270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
275                                        280                                        285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
290                                        295                                        300

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Ala Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 98  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 98  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Arg Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



## ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Lys Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 99  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 99  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Arg Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Arg Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 100  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 100  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Gly Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 101  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 101  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Gly Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 102  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 102  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Gly Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys





ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 103  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 103  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ala Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Gly Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 104  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 104  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Val Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 105  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 105  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Gly Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Gly Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 106  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 106  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ala Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Trp Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Asp His Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ser Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
165 170 175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
290 295 300

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 107  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 107  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ala Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Val Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 108  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 108  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asn Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 109  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 109  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Val Asp Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Arg Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 110  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 110  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asn Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



## ES 2 652 387 T3

50 55 60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Asp His Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
85 90 95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
100 105 110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
130 135 140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ser Ser Cys Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145 150 155 160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
165 170 175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
180 185 190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
195 200 205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
210 215 220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
245 250 255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
260 265 270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
275 280 285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
290 295 300

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 111  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 111  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Asn Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Ser Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 112  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 112  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Gly Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 113  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 113  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Gly Arg Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Gly Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 114  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 114  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Gly Gln Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Gly Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 115  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 115  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Phe Ala Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Gly Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 116  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia mutante

10

<400> 116  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Ser Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Gly Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys

## ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 117  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 117  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Gly Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Ile

ES 2 652 387 T3

50                                    55                                    60

Asp Met Asp Leu Lys Asn Asp His Gly Arg Phe Glu Leu Asp Ser Glu  
65                                    70                                    75                                    80

Ser Ala Ala Val Gly Gly Ile Thr Thr Ile Ile Glu Met Pro Ile Thr  
                                  85                                    90                                    95

Phe Pro Pro Thr Thr Thr Leu Asp Ala Phe Leu Glu Lys Lys Lys Gln  
                                  100                                    105                                    110

Ala Gly Gln Arg Leu Lys Val Asp Phe Ala Leu Tyr Gly Gly Gly Val  
                                  115                                    120                                    125

Pro Gly Asn Leu Pro Glu Ile Arg Lys Met His Asp Ala Gly Ala Val  
                                  130                                    135                                    140

Gly Phe Lys Ser Met Met Ala Ser Ser Val Pro Gly Met Phe Asp Ala  
145                                    150                                    155                                    160

Val Ser Asp Gly Glu Leu Phe Glu Ile Phe Gln Glu Ile Ala Ala Cys  
                                  165                                    170                                    175

Gly Ser Val Val Val Val His Ala Glu Asn Glu Thr Ile Ile Gln Ala  
                                  180                                    185                                    190

Leu Gln Lys Gln Ile Lys Ala Ala Gly Arg Lys Asp Met Ala Ala Tyr  
                                  195                                    200                                    205

Glu Ala Ser Gln Pro Val Phe Gln Glu Asn Glu Ala Ile Gln Arg Ala  
210                                    215                                    220

Leu Leu Leu Gln Lys Glu Ala Gly Cys Arg Leu Ile Val Leu His Val  
225                                    230                                    235                                    240

Ser Asn Pro Asp Gly Val Glu Leu Ile His Gln Ala Gln Ser Glu Gly  
                                  245                                    250                                    255

Gln Asp Val His Cys Glu Ser Gly Pro Gln Tyr Leu Asn Ile Thr Thr  
                                  260                                    265                                    270

Asp Asp Ala Glu Arg Ile Gly Pro Tyr Met Lys Val Ala Pro Pro Val  
                                  275                                    280                                    285

Arg Ser Ala Glu Met Asn Val Arg Leu Trp Glu Gln Leu Glu Asn Gly  
290                                    295                                    300

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 118  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 118  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Gly Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys



ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
450 455

<210> 119  
<211> 458  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> secuencia mutante

<400> 119  
Met Phe Asp Val Ile Val Lys Asn Cys Arg Met Val Ser Ser Ser Gly  
1 5 10 15

Ile Thr Glu Ala Asp Ile Leu Val Lys Asp Gly Lys Val Ala Ala Ile  
20 25 30

Ser Ser Asp Thr Gly Asp Val Glu Ala Ser Arg Thr Ile Asp Ala Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Val Met Pro Gly Val Val Asp Glu His Val His Ile Cys

ES 2 652 387 T3

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

ES 2 652 387 T3

Leu Ile Asp Thr Leu Gly Ser Asp His Gly Gly His Pro Val Glu Asp  
 305 310 315 320

Lys Glu Pro Gly Trp Lys Asp Val Trp Lys Ala Gly Asn Gly Ala Leu  
 325 330 335

Gly Leu Glu Thr Ser Leu Pro Met Met Leu Thr Asn Gly Val Asn Lys  
 340 345 350

Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Glu Val Met Cys Glu Lys Pro  
 355 360 365

Ala Lys Leu Phe Gly Ile Tyr Pro Gln Lys Gly Thr Leu Gln Val Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ile Leu Asp Leu Asp Ile Asp Thr Lys Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Ser Gln Phe Arg Ser Leu His Lys Tyr Ser Pro Phe Asp Gly  
 405 410 415

Met Pro Val Thr Gly Ala Pro Val Leu Thr Met Val Arg Gly Thr Val  
 420 425 430

Val Ala Glu Lys Gly Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Phe Gly Gln Phe  
 435 440 445

Val Thr Arg His Asp Tyr Glu Ala Ser Lys  
 450 455

## REIVINDICACIONES

1.- Hidantoinasa que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de (i) o (ii), con

5 (i) secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, o SEQ ID NO: 119,

15 (ii) secuencia de aminoácidos en donde en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, o SEQ ID NO: 119, de 1 a  $\varphi$  restos de aminoácidos se han sustituido, eliminado, insertado y/o añadido, en donde, sin embargo se mantiene/mantienen la o las sustituciones de las secuencias anteriores con respecto a las secuencia de referencia SEQ ID NO: 1,

y en donde  $\varphi$  se define como  $\varphi = 75$ ,

25 y en donde además la actividad catalítica de la hidantoinasa es mayor en un factor de al menos  $\zeta$  que la actividad catalítica de la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1,

y en donde  $\zeta$  se define como  $\zeta = 1,2$ ,

30 y en donde la actividad catalítica de una hidantoinasa debe entenderse como la actividad catalítica de esta enzima con respecto a la transformación de un compuesto de D-hidantoína 5-sustituída en el correspondiente D-carbamoilaminoácido.

2. Hidantoinasa según la reivindicación 1, en donde  $\varphi$  se selecciona de 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.

3. Hidantoinasa según la reivindicación 1, en donde  $\zeta$  se selecciona de 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 o 30.

35 4. Hidantoinasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la hidantoinasa transforma al menos una de los siguientes sustratos hidantoína, 5-metilhidantoína, 5-bencilhidantoína, 5-(4-hidroxibencil)hidantoína, 5-indolilmetilhidantoína, 5-(3,4-dihidroxibencil)hidantoína, 5-metiltoetilhidantoína, 5-isopropilhidantoína, 5-isobutilhidantoína, 5-sec-butilhidantoína, 5-(4-aminobutil)hidantoína, 5-hidroxi-metilhidantoína, o un compuesto de hidantoína 5-sustituída que corresponde a un aminoácido no natural, respectivamente un derivado del mismo, en el respectivo carbamoilaminoácido, en donde la actividad catalítica de la hidantoinasa con respecto a la transformación de dicho sustrato es al menos tan alta como la actividad catalítica de la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 con respecto a la transformación de la D-5-indolilmetilhidantoína.

40 5. Hidantoinasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la enantioselectividad para la D-hidantoína es mayor en un factor de al menos 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 100 o 150 que la enantioselectividad de la hidantoinasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

45 6. Polinucleótido que codifica cualquiera de las hidantoinas de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 6.

8. Célula hospedante aislada o transformada que comprende el polinucleótido según la reivindicación 6, o el vector según la reivindicación 7.

50 9. Célula hospedante según la reivindicación 8, que expresa al menos las actividades enzimáticas seleccionadas de las siguientes: hidantoinasa; hidantoinasa e hidantoína racemasa; hidantoinasa y carbamoilasa; o hidantoinasa e hidantoína racemasa y carbamoilasa.

10. Procedimiento para preparar aminoácidos que comprende las etapas de

- (a) proporcionar actividad de hidantoinasa de una hidantoinasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y actividad de carbamoilasa y al menos una hidantoína 5-sustituida al medio de reacción, y opcionalmente proporcionar actividad de hidantoína racemasa a dicho medio de reacción;
- 5 (b) incubar el medio de reacción con el fin de permitir la transformación de la hidantoína 5-sustituida en los respectivos aminoácidos mediante las actividades enzimáticas proporcionadas en (a); y
- (c) recuperar los aminoácidos obtenidos de la transformación enzimática de la respectiva hidantoína 5-sustituida del medio de reacción.
- 10 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en donde dicha hidantoína 5-sustituida se selecciona de D,L-hidantoína 5-sustituida, D,L-5-indolilmetilhidantoína (= D,L-triptófano-hidantoína), D-hidantoína 5-sustituida, D-5-indolilmetilhidantoína (= D-triptófano-hidantoína).
12. Procedimiento según la reivindicación 10 u 11, en donde dicha hidantoína 5-sustituida proporcionada al medio de reacción es L-hidantoína 5-sustituida o D,L-hidantoína 5-sustituida, y en donde además se proporciona actividad de hidantoína racemasa al medio de reacción en la etapa (a) para transformar la L-hidantoína 5-sustituida o D,L-hidantoína 5-sustituida en D-hidantoína 5-sustituida.
- 15 13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el aminoácido que se va a preparar es el D-triptófano y en donde la hidantoína 5-sustituida se selecciona de D-5-indolilmetilhidantoína, L-5-indolilmetilhidantoína o D,L-5-indolilmetilhidantoína.
- 20 14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en donde el medio de reacción es un medio que consiste parcial o enteramente en medio de cultivo celular y en donde la actividad de hidantoinasa es proporcionada por una célula hospedante según la reivindicación 8 o 9, y en donde la célula hospedante se cultiva en dicho medio de reacción
- 25 15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde el medio de reacción es un medio que consiste parcial o enteramente en medio de cultivo celular y la actividad de carbamoilasa es proporcionada por una célula hospedante según la reivindicación 8 o 9 o por una segunda célula hospedante, en donde dicha célula o células hospedantes se cultivan en dicho medio de reacción.

Fig. 1

