

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 949**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2015** **PCT/US2015/037785**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015** **WO15200693**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2015** **E 15739706 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020** **EP 3161154**

54 Título: **Polimerasas modificadas para la incorporación mejorada de análogos de nucleótidos**

30 Prioridad:

27.06.2014 US 201462018470 P

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

23.10.2020

73 Titular/es:

ILLUMINA, INC. (100.0%)
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122, US

72 Inventor/es:

CHEN, CHENG-YAO;
BOMATI, ERIN y
HE, MOLLY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 788 949 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

Polimerasas modificadas para la incorporación mejorada de análogos de nucleótidos

Antecedentes

- 5 Todos los organismos confían en las ADN polimerasas para replicar y mantener sus genomas. Permiten la replicación de ADN de alta fidelidad detectando la complementariedad entre bases, así como reconociendo características estructurales adicionales de la base. Sigue existiendo la necesidad de polimerasas modificadas con una incorporación mejorada de análogos de nucleótidos, en particular nucleótidos que se modifican en el hidroxilo de azúcar 3'.
- 10 El número de acceso a la base de datos UNIPROT: P61876 describe la polimerasa B que tiene una identidad del 80,3% a lo largo de 773 posiciones para la SEQ ID NO: 5 y que exhibe isoleucina en la posición correspondiente a la posición 477 de la SEQ ID NO: 5.
- El número de acceso a la base de datos UNIPROT: A8AACO describe la polimerasa B de *Archaea Ignicoccus hospitalis* DSM18386 que tiene una identidad del 27,6% a lo largo de 840 posiciones para la SEQ ID NO: 5 y que exhibe metionina en la posición correspondiente a la posición 477 de la SEQ ID NO: 5.
- 15 El documento US5948666 describe la polimerasa 23Py1 de *Metallosphaera prunae* con un 27,6% de identidad a lo largo de 838 posiciones para la SEQ ID NO: 5 y que exhibe metionina en la posición correspondiente a la posición 477 de la SEQ ID NO: 5.
- El documento US649216 divulga la ADN polimerasa de *Plasmodium* y *Drosophila* con una identidad del 28% o 26% a lo largo de 838 posiciones a la SEQ ID NO: 5 y que exhibe metionina en la posición correspondiente a la posición 477 de la SEQ ID NO: 5.
- 20 El documento EP0892058 describe enzimas quiméricas que combinan una región N-terminal derivada del dominio nucleasa 5' de especies *Thermus* con una región C-terminal derivada de la exonucleasa 3' a 5' y el dominio polimerasa de la Tma polimerasa.
- El documento WO2012/154934 describe proteínas mutantes que modifican las ADN polimerasas de la familia B que contienen actividad exonucleasa residual que interfiere con las técnicas de secuenciación y con la detección de polimorfismos de un solo nucleótido.
- 25

Listado de secuencias

- La presente solicitud se presenta junto con un Listado de Secuencias en formato electrónico. El Listado de Secuencias se proporciona como un archivo titulado IP1152.TXT, creado el 28 de mayo de 2014, que tiene un tamaño de 186 Kb. La información en el formato electrónico del Listado de Secuencias se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.
- 30

Breve resumen

- En este documento se presentan enzimas polimerasas para la incorporación mejorada de análogos de nucleótidos, en particular nucleótidos que se modifican en el hidroxilo 3' del azúcar de manera que el sustituyente es de mayor tamaño que el grupo hidroxilo 3' que se produce de forma natural. Los autores de la presente invención han identificado sorprendentemente ciertas polimerasas alteradas que exhiben una incorporación mejorada de los análogos deseados y tienen un cierto número de otras ventajas asociadas.
- 35
- En ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende al menos una mutación por sustitución de aminoácidos en la posición funcionalmente equivalente a Lys477 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. La secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N de tipo salvaje se recoge en la SEQ ID NO: 5. En ciertas realizaciones, la mutación por sustitución comprende una mutación a un residuo que tiene una cadena lateral más pequeña. En ciertas realizaciones, la mutación por sustitución comprende una mutación a un residuo que tiene una cadena lateral hidrofóbica. También se describen los casos en los que la mutación por sustitución comprende una mutación a un residuo de metionina.
- 40
- También se presenta en este documento una ADN polimerasa recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% idéntica a la SEQ ID NO: 29, ADN polimerasa recombinante que comprende en la posición funcionalmente equivalente a Lys477 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.
- 45
- También se presenta en este documento una ADN polimerasa recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% idéntica a la SEQ ID NO: 31, ADN polimerasa recombinante que comprende en la posición funcionalmente equivalente a Lys477 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.
- 50

También se presenta en este documento una ADN polimerasa recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% idéntica a la SEQ ID NO: 5, ADN polimerasa recombinante que comprende en la posición funcionalmente equivalente a Lys477 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.

- 5 De acuerdo con la invención, la polimerasa es una ADN polimerasa. La polimerasa alterada de la reivindicación 1, en donde la ADN polimerasa es una ADN polimerasa del tipo de la familia B. La polimerasa es una ADN polimerasa de arqueas de la familia B. También se describen los casos en los que la polimerasa es ADN polimerasa- α humana, T4, RB69, y ADN polimerasas del fago phi29. En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa de arqueas de la familia B es de un género seleccionado del grupo que consiste en *Thermococcus*, *Pyrococcus* y *Methanococcus*. Por ejemplo, la polimerasa se puede seleccionar del grupo que consiste en polimerasa Vent, Deep Vent, 9°N y Pfu. En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa de arqueas de la familia B es polimerasa 9°N.

- 15 De acuerdo con la invención, la polimerasa alterada comprende mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Leu408, Tyr409, Pro410 y Lys477 en la secuencia de aminoácidos de ADN polimerasa 9°N de tipo salvaje SEQ ID NO: 5, en donde las mutaciones por sustitución son posicionalmente equivalentes a Leu408Ala, Tyr409Ala, Pro410Ile y LYS477Met, en donde la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 5, y en donde, en uso, la ADN polimerasa de arqueas de la familia B exhibe actividad de polimerasa.

- 20 En algunas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una actividad exonucleasa reducida en comparación con una polimerasa de tipo salvaje. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Asp141 y/o Glu143 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.

- 25 En ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende, además, mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Ala485 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la polimerasa comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Ala485Leu o Ala485Val en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

- En ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende, además, una mutación por sustitución a un aminoácido diferente en la posición funcionalmente equivalente a Cys223 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Cys223Ser en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

- 30 En ciertas realizaciones, la al menos una mutación por sustitución comprende una mutación a la posición equivalente a Thr514 y/o Ile521. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Thr514Ala, Thr514Ser y/o Ile521Leu en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

- 35 También se describen los casos en los que la polimerasa alterada puede comprender una mutación por sustitución adicional para separar una metionina interna. Por ejemplo, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución a un aminoácido diferente en la posición funcionalmente equivalente a Met129 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. También se describen los casos en los que la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Met129Ala en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

- 40 También se presenta en este documento una polimerasa alterada que comprende una mutación por sustitución al dominio semi-conservado que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4, en la que la mutación por sustitución comprende una mutación en la posición 3 a cualquier residuo que no sea cualquier residuo aparte de Lys, Ile o Gln.

- 45 También se describen los casos en los que la polimerasa alterada comprende una mutación a Met en la posición 3 de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4.

- 50 De acuerdo con la invención, la polimerasa alterada comprende mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Leu408, Tyr409, Pro410 y Lys477 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 de la ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, las mutaciones por sustitución comprenden mutaciones por sustitución posicionalmente equivalentes a Leu408Ala, Tyr409Ala, Pro410Ile y Lys477Met, en donde la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 5, y en donde, en uso, la ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada exhibe actividad de polimerasa.

- 55 En algunas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una actividad de exonucleasa reducida en comparación con una polimerasa de tipo salvaje. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Asp141 y/o Glu143 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.

En ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende, además, mutaciones por sustitución en posiciones

funcionalmente equivalentes a Ala485 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la polimerasa comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Ala485Leu o Ala485Val en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

- 5 En ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende, además, una mutación a la posición equivalente a Thr514 y/o Ile521 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Thr514Ala, Thr514Ser y/o Ile521Leu en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

- 10 En ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende, además, una mutación por sustitución a un aminoácido diferente en la posición funcionalmente equivalente a Cys223 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Cys223Ser en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

- 15 También se describen los casos en los que la polimerasa alterada puede comprender una mutación por sustitución adicional para separar una metionina interna. Por ejemplo, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución a un aminoácido diferente en la posición funcionalmente equivalente a Met129 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. También se describen los casos en los que la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Met129Ala en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

También se presenta en este documento una polimerasa alterada que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 6-8, 10-12, 14-16, 18-20, 22-24, 26-28, 30 y 32.

- 20 También se presenta en este documento una molécula de ácido nucleico que codifica una polimerasa alterada según se define en cualquiera de las realizaciones anteriores. También se presenta en este documento un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente. También se presenta en este documento una célula huésped que comprende el vector descrito anteriormente.

- 25 También se presenta en este documento un método para incorporar nucleótidos modificados en el ADN, que comprende permitir que interactúen los siguientes componentes: (i) una polimerasa alterada de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, (ii) un molde de ADN; y (iii) una solución de nucleótidos. En ciertas realizaciones, el molde de ADN comprende una matriz agrupada.

- 30 También se proporciona en este documento un kit para realizar una reacción de incorporación de nucleótidos, que comprende: una polimerasa como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores y una solución de nucleótidos. La solución de nucleótidos puede comprender nucleótidos marcados. Los nucleótidos pueden comprender nucleótidos sintéticos. Los nucleótidos pueden comprender nucleótidos modificados. Los nucleótidos modificados pueden modificarse en el hidroxilo 3' del azúcar de modo que el sustituyente sea de mayor tamaño que el grupo hidroxilo 3' que se produce de forma natural. Los nucleótidos modificados pueden comprender un nucleótido modificado o una molécula de nucleósido que comprende una base de purina o pirimidina y un resto de azúcar ribosa o desoxirribosa que tiene un grupo bloqueante 3'-OH separable unido covalentemente al mismo, de modo que el átomo de carbono 3' tiene unido un grupo de la estructura



en donde Z es cualquiera de $-C(R')_2-O-R''$, $-C(R')_2-N(R'')_2$, $-C(R')_2-N(H)R''$, $-C(R')_2-S-R''$ y $-C(R')_2-F$,

en donde cada uno de los R'' es o es parte de un grupo protector separable;

- 40 cada uno de los R' es independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, alquilo sustituido, arilalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterocíclico, acilo, ciano, alcoxi, ariloxi, heteroariloxi o amido, o un marcador detectable unido a través de un grupo de enlace; o $(R')_2$ representa un grupo alquilideno de fórmula $=C(R'')_2$, en donde cada uno de los R'' puede ser igual o diferente y se selecciona del grupo que comprende átomos de hidrógeno y halógeno y grupos alquilo; y

- 45 en donde la molécula puede reaccionar para producir un compuesto intermedio en el que cada uno de los R'' se intercambia por H, o en donde Z es $-C(R')_2-F$, el F se cambia por OH, SH o NH_2 , preferiblemente OH, cuyo compuesto intermedio se disocia en condiciones acuosas para proporcionar una molécula con un 3'OH libre;

con la condición de que en los casos en los que Z sea $-C(R')_2-S-R''$, ambos grupos R' no son H.

- 50 R' del nucleótido o nucleósido modificado puede ser un alquilo o alquilo sustituido. -Z del nucleótido o nucleósido modificado puede ser de fórmula $-C(R')_2-N_3$. Z puede ser un grupo azidometilo.

Los nucleótidos modificados pueden marcarse con fluorescencia para permitir su detección. Los nucleótidos modificados pueden comprender un nucleótido o nucleósido que tiene una base unida a un marcador detectable a través de un enlazador escindible. El marcador detectable puede comprender un marcador fluorescente. El kit puede comprender, además, una o más moléculas de molde de ADN y/o cebadores.

Los detalles de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción que figuran a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un esquema que muestra el alineamiento de secuencias de aminoácidos de polimerasa 9°N-7 (9°N) de *Thermococcus* sp., polimerasa 9°N T514S/I521L mutante (Pol957), *Thermococcus gorgonarius* (TGO), *Thermococcus kodakaraensis* (KOD1), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Methanococcus maripaludis* (MMS2) y ADN polimerasa del fago RB69. La numeración que se muestra representa la numeración de los residuos de aminoácidos en la polimerasa 9°N.

La Figura 2 es un esquema que muestra dos partes resaltadas del alineamiento mostrado en la Figura 1.

Descripción detallada

En este documento se presentan enzimas polimerasas para la incorporación mejorada de análogos de nucleótidos, en particular nucleótidos que están modificados en el hidroxilo 3' del azúcar de manera que el sustituyente es de mayor tamaño que el grupo hidroxilo 3' que se produce de forma natural. Los autores de la presente invención han identificado sorprendentemente ciertas polimerasas alteradas que exhiben una incorporación mejorada de los análogos deseados y tienen una serie de otras ventajas asociadas.

Tal como se describe con mayor detalle en lo que sigue, los autores de la invención han descubierto sorprendentemente que una o más mutaciones en uno o más residuos en la polimerasa dan como resultado un aumento profundo en la velocidad de rotación y una reducción en la pirofosforólisis. Estas polimerasas alteradas tienen un rendimiento mejorado en la secuenciación del ADN por síntesis (SBS) y dan como resultado una reducción de los ajustes de fases y/o pre-ajuste de fases.

Tal como se usa en este documento, la expresión "ajustes de fases" se refiere a un fenómeno en SBS que es causado por la incorporación incompleta de un nucleótido en alguna porción de cadenas de ADN dentro de grupos por polimerasas en un ciclo de secuenciación dado. La expresión "pre-ajuste de fases" se refiere a un fenómeno en SBS que es causado por la incorporación de nucleótidos sin terminadores 3' efectivos, lo que provoca que el evento de incorporación avance 1 ciclo. El ajuste de fases y el pre-ajuste de fases hacen que las intensidades extraídas para un ciclo específico consistan en la señal del ciclo actual, así como en el ruido de los ciclos que le preceden y siguientes. A medida que aumenta el número de ciclos, aumenta la fracción de secuencias por grupo afectado por el ajuste de fases, lo que dificulta la identificación de la base correcta. El ajuste de fases puede ser causado, por ejemplo, por una polimerasa que realiza la reacción inversa de la incorporación de nucleótidos, como se sabe que ocurre en condiciones propicias para la pirofosforólisis. Por consiguiente, el descubrimiento de polimerasas alteradas que disminuyen la incidencia del ajuste de fases y/o el pre-ajuste de fases es sorprendente y proporciona una gran ventaja en las aplicaciones de SBS. Por ejemplo, las polimerasas alteradas proporcionan un tiempo de ciclo SBS más rápido, valores más bajos de ajuste de fases y pre-ajuste de fases y una mayor longitud de lectura de la secuencia. La caracterización de las polimerasas alteradas como se proporciona en este documento se expone en la sección de Ejemplos que figura más adelante.

La mutación por sustitución puede comprender una mutación a un residuo que tiene una cadena lateral más pequeña. Los tamaños relativos de las cadenas laterales de aminoácidos son bien conocidos en la técnica y se pueden comparar usando cualquier métrica conocida, incluidos los efectos estéricos y/o la densidad de electrones. Por lo tanto, un ejemplo de aminoácidos establecidos en orden de tamaño creciente sería G, A, S, C, V, T, P, I, L, D, N, E, Q, M, K, H, F, Y, R, W. La mutación por sustitución puede comprender una mutación a un residuo que tiene una cadena lateral hidrófoba, tal como A, I, L, V, F, W, Y.

También se presenta en este documento una polimerasa alterada que comprende una mutación por sustitución a un dominio semi-conservado de la polimerasa. Tal como se usa en este documento, la expresión "dominio semi-conservado" se refiere a una porción de polimerasa que está completamente conservada, o al menos parcialmente conservada entre diversas especies. Sorprendentemente, se descubrió que la mutación de uno o más residuos en el dominio semi-conservado afecta la actividad de la polimerasa en presencia de nucleótidos bloqueados en 3', lo que resulta en profundos aumentos en la velocidad de rotación y la reducción en la pirofosforólisis. Estas polimerasas alteradas tienen un rendimiento mejorado en la secuenciación del ADN por síntesis y dan como resultado errores de ajustes de fases reducidos tal como se describe en la sección de Ejemplos que figura más adelante.

También se describe que el dominio semi-conservado comprende aminoácidos que tienen la secuencia recogida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4. Las SEQ ID NOs: 1-4 corresponden a residuos en el dominio semi-conservado entre diversas especies. La SEQ ID NO: 4 corresponde a los residuos 475-492 de la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N, que se recoge en este documento como SEQ ID NO: 5. Se establece un alineamiento que muestra la conservación entre diversas especies en el dominio semi-conservado se recoge en las Figuras 1 y 2. Las secuencias de polimerasa mostradas en las Figuras 1 y 2 se obtuvieron de los números de acceso a la base de datos de Genbank Q56366 (ADN polimerasa 9°N), NP_577941 (Pfu), YP_182414 (KOD1), NP_987500 (MMS2), AAP75958 (RB69), P56689 (TGo).

Sorprendentemente, se ha encontrado que las mutaciones en uno o más residuos en el dominio semi-conservado

aumentan la velocidad de rotación y la reducción de la pirofosforólisis, lo que da como resultado una reducción de los errores del ajuste de fases. Por ejemplo, en algunas realizaciones de las polimerasas alteradas presentadas en este documento, la mutación por sustitución comprende una mutación en la posición 3 de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4 a cualquier resto que no sea Lys, Ile o Gln. En ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación a Met en la posición 3 de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4.

La polimerasa es una ADN polimerasa. La ADN polimerasa es una ADN polimerasa de tipo de la familia B. La polimerasa es una ADN polimerasa de arqueas de la familia B. También se describe la ADN polimerasa- α humana y las polimerasas de fago, por ejemplo, las polimerasas de fago, tales como las ADN polimerasas de fago T4, RB69 y phi29.

Las ADN polimerasas de arqueas de la familia B son bien conocidas en la técnica tal como se ejemplifica por la divulgación de la Patente de EE.UU. N° 8.283.149. En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa de arqueas es de arqueas hipertermófilas, lo que significa que las polimerasas son a menudo termoestables. Por consiguiente, en una realización preferida adicional, la polimerasa se selecciona de polimerasa Vent, Deep Vent, 9°N y Pfu. Vent y Deep Vent son nombres comerciales utilizados para las ADN polimerasas de la familia B aisladas de las arqueas hipertermófilas. La polimerasa 9°N de *Thermococcus litoralis* también se identificó a partir de *Thermococcus sp.* La polimerasa Pfu se aisló de *Pyrococcus furiosus*.

En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa de arqueas de la familia B es de un género tal como, por ejemplo, las del género *Thermococcus*, *Pyrococcus* y *Methanococcus*. Miembros del género *Thermococcus* son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a *Thermococcus 4557*, *Thermococcus barophilus*, *Thermococcus gammatolerans*, *Thermococcus onnurineus*, *Thermococcus sibiricus*, *Thermococcus kodakarensis*, *Thermococcus gorgonarius*. Miembros del género *Pyrococcus* son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a *Pyrococcus NA2*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus yayanosii*, *Pyrococcus endeavori*, *Pyrococcus glycovorans*, *Pyrococcus woesei*. Miembros del género *Methanococcus* son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a *M. aeolicus*, *M. maripaludis*, *M. vanniellii*, *M. voltae*, "M. thermolithotrophicus" y "M. jannaschii".

Por ejemplo, la polimerasa se puede seleccionar del grupo que consiste en polimerasa Vent, Deep Vent, 9°N y Pfu. En ciertas realizaciones, la ADN polimerasa de arqueas de la familia B es polimerasa 9°N.

Comparación de Secuencias, Identidad y Homología

El término "idéntico" o la expresión "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son el mismo, cuando se compara y se alinea para una correspondencia máxima, medido utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias que se describen más adelante (u otros algoritmos disponibles para personas expertas) o mediante inspección visual.

La expresión "sustancialmente idénticas", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos (p. ej., ADN que codifican una polimerasa, o la secuencia de aminoácidos de una polimerasa) se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos aproximadamente 60%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90-95%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más de identidad de residuos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se compara y se alinea para una correspondencia máxima, medida utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Dichas secuencias "sustancialmente idénticas" se consideran típicamente "homólogas", sin referencia a la ascendencia real. Preferiblemente, la "identidad sustancial" existe a lo largo de una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 50 residuos de longitud, más preferiblemente a lo largo de una región de al menos aproximadamente 100 residuos, y lo más preferiblemente, las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de al menos aproximadamente 150 residuos, o a lo largo de toda la longitud de las dos secuencias a comparar.

Las proteínas y/o secuencias de proteínas son "homólogas" cuando se derivan, de forma natural o artificialmente, de una proteína o secuencia de proteínas ancestral común. De manera similar, los ácidos nucleicos y/o las secuencias de ácido nucleico son homólogos cuando se derivan, de forma natural o artificialmente, de un ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico ancestral común. La homología generalmente se infiere de la similitud de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o proteínas (o secuencias de los mismos). El porcentaje exacto de similitud entre secuencias que es útil para establecer la homología varía con el ácido nucleico y la proteína en cuestión, pero se utiliza de forma rutinaria tan poco como un 25% de similitud de secuencia a lo largo de 50, 100, 150 o más residuos para establecer la homología. También se pueden usar niveles más altos de similitud de secuencia, p. ej., 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% o más, para establecer la homología. Métodos para determinar los porcentajes de similitud de secuencia (p. ej., BLASTP y BLASTN usando parámetros por defecto) se describen en este documento y están generalmente disponibles.

Para la comparación de secuencias y la determinación de homología, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en una computadora, se

designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de la secuencia. Luego, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros de programa designados.

- 5 El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación se puede realizar, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wisconsin) o mediante inspección visual (véase generalmente *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., complementada hasta 2004).

- 15 Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen una puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al., supra). Estas coincidencias iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contengan. Luego, las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las secuencias hasta que se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos que no coinciden; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras en cada una de las direcciones se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa cae en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa va a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un corte de 100, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915).

- 35 Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0,001.

- 45 Por "funcionalmente equivalente" se entiende que la polimerasa de control, en el caso de estudios que usan una polimerasa completamente diferente, contendrá la sustitución de aminoácidos que se considera que ocurre en la posición de aminoácidos en la otra polimerasa que tiene el mismo papel funcional en la enzima. Como ejemplo, la mutación en la posición 412 de Tirosina a Valina (Y412V) en la ADN polimerasa Vent sería funcionalmente equivalente a una sustitución en la posición 409 de Tirosina a Valina (Y409V) en la polimerasa 9°N.

- 50 En general, se producen mutaciones por sustitución funcionalmente equivalentes en dos o más polimerasas diferentes en posiciones de aminoácidos homólogas en las secuencias de aminoácidos de las polimerasas. Por lo tanto, el uso en este documento de la expresión "funcionalmente equivalente" también abarca mutaciones que son "posicionalmente equivalentes" u "homólogas" a una mutación dada, independientemente de si se conoce o no la función particular del aminoácido mutado. Es posible identificar residuos de aminoácidos posicionalmente equivalentes u homólogos en las secuencias de aminoácidos de dos o más polimerasas diferentes sobre la base del alineamiento de secuencia y/o el modelado molecular. Un ejemplo de alineamiento de secuencia para identificar residuos posicionalmente equivalentes y/o funcionalmente equivalentes se recoge en las Figuras 1 y 2. Así, por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 2, los residuos en el dominio semi-conservado identificados como posiciones 475-492 de la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. Los residuos correspondientes en las polimerasas TGO, KOD1, Pfu, MmS2 y RB69 se identifican en la Figura como alineados verticalmente y se consideran posicionalmente equivalentes, así como funcionalmente equivalentes al residuo correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.

Las polimerasas alteradas descritas anteriormente en este documento pueden comprender mutaciones por

sustitución adicionales que se sabe que potencian uno o más aspectos de la actividad de la polimerasa en presencia de nucleótidos bloqueados en 3' y/o en aplicaciones de secuenciación de ADN. Por ejemplo, en algunas realizaciones, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender, además, mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Leu408 y/o Tyr409 y/o Pro410 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. Se puede hacer cualquiera de una diversidad de mutaciones por sustitución en una o más de las posiciones en posiciones funcionalmente equivalentes a 408-410 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N, lo cual da como resultado una mayor incorporación de nucleótidos bloqueados tal como se conoce en la técnica y se ejemplifica por la divulgación de los documentos US 2006/0240439 y US 2006/0281109. Por ejemplo, las mutaciones por sustitución pueden comprender mutaciones por sustitución homólogas a Leu408Ala y/o Tyr409Ala y/o Pro410Ile en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. En ciertas realizaciones, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada comprende, además, mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Ala485 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la polimerasa comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Ala485Leu o Ala485Val en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

En algunas realizaciones, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender una actividad de exonucleasa reducida en comparación con una polimerasa de tipo salvaje. Se puede realizar cualquiera de una diversidad de mutaciones por sustitución en una o más de las posiciones que se sabe que dan como resultado una actividad de exonucleasa reducida tal como se conoce en la técnica y se ejemplifica por los documentos US 2006/0240439 y US 2006/0281109. Por ejemplo, en algunas realizaciones, además de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender, además, mutaciones por sustitución en posiciones funcionalmente equivalentes a Asp141 y/o Glu143 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.

En ciertas realizaciones, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada comprende, además, una mutación por sustitución a un aminoácido diferente en la posición funcionalmente equivalente a Cys223 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N tal como se conoce en la técnica y se ejemplifica por el documento US 2006/0281109. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación de sustitución funcionalmente equivalente a Cys223Ser en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

En ciertas realizaciones, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender una o más mutaciones a las posiciones equivalentes a Thr514 y/o Ile521 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N tal como se conoce en la técnica y se ejemplifica por la divulgación del documento PCT/US2013/031694. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Thr514Ala, Thr514Ser y/o Ile521Leu en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

También se describe en este documento que, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender una o más mutaciones en las posiciones equivalentes a Arg713 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N tal como se conoce en la técnica y se ejemplifica por la divulgación de la Patente de EE.UU. Nº 8.623.628. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Arg713Gly, Arg713Met o Arg713Ala en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

También se describe en este documento que, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender una o más mutaciones en las posiciones equivalentes a Arg743 y/o Lys705 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N tal como se conoce en la técnica y se ejemplifica por la divulgación de la Patente de EE.UU. Nº 8.623.628. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Arg743Ala y/o Lys705Ala en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

También se describe en este documento que, además de cualquiera de las mutaciones anteriores, la polimerasa alterada puede comprender una o más mutaciones por sustitución adicionales para separar una metionina interna. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución a un aminoácido diferente en la posición funcionalmente equivalente a Met129 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N. En ciertas realizaciones, la polimerasa alterada comprende una mutación por sustitución funcionalmente equivalente a Met129Ala en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa 9°N.

Polimerasas mutantes

En la presente divulgación se usan opcionalmente diversos tipos de mutagénesis, p. ej., para modificar polimerasas para producir variantes, p. ej., de acuerdo con modelos de polimerasa y predicciones de modelos como se discutió anteriormente, o usando enfoques mutacionales aleatorios o semi-aleatorios. En general, cualquier procedimiento de mutagénesis disponible puede usarse para hacer mutantes de polimerasa. Tales procedimientos de mutagénesis incluyen opcionalmente la selección de ácidos nucleicos mutantes y polipéptidos para una o más actividades de interés (p. ej., reducción de pirofosforólisis, aumento de rotación, p. ej., para un análogo de nucleótido dado).

Procedimientos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a: mutagénesis puntual dirigida al sitio, mutagénesis puntual aleatoria, recombinación homóloga in vitro o in vivo (reordenamiento de ADN y PCR de solapamiento combinatoria), mutagénesis utilizando moldes que contienen uracilo, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificada con fosforotioato, mutagénesis utilizando ADN dúplex con huecos, reparación de emparejamiento erróneo puntual, mutagénesis utilizando cepas huésped deficientes en reparación, selección por restricción y purificación por restricción, mutagénesis por delección, mutagénesis por síntesis génica total, PCR degenerada, reparación de rotura de doble cadena, y muchos otros conocidos por personas expertas. La polimerasa de partida para la mutación puede ser cualquiera de las mencionadas en este documento, incluidos mutantes de polimerasa disponibles tales como los identificados, p. ej., en los documentos US 2006/0240439 y US 2006/0281109.

Opcionalmente, la mutagénesis puede guiarse por información conocida de una molécula de polimerasa que se produce de forma natural, o de una polimerasa alterada o mutada conocida (p. ej., usando una polimerasa mutante existente tal como se indica en las referencias anteriores), p. ej., secuencia, comparaciones de secuencia, propiedades físicas, estructura cristalina y/o similares tal como se discutió anteriormente. Sin embargo, en otra clase de realizaciones, la modificación puede ser esencialmente aleatoria (p. ej., tal como en el reordenamiento de ADN clásico o "familiar", véase, p. ej., Cramer et al. (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution" *Nature* 391:288-291).

Información adicional sobre formatos de mutación se encuentra en: Sambrook et al., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 ("Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel et al., Eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (complementado hasta 2011) ("Ausubel") y *Protocolos de PCR A guide to Methods and Applications* (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, California (1990) ("Innis"). Las siguientes publicaciones y referencias citadas en las mismas proporcionan detalles adicionales sobre formatos de mutación: Arnold, Protein engineering for unusual environments, *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Bass et al., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science* 242:240-245 (1988); Bordo y Argos (1991) Suggestions for "Safe" Residue Substitutions in Site-directed Mutagenesis 217:721-729; Botstein y Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, *Science* 229:1193-1201 (1985); Carter et al., Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Carter, Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 154: 382-403 (1987); Dale et al., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996); Eghtedarzadeh y Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, *Nucl. Acids Res.* 14: 5115 (1986); Fritz et al., Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, *Nucl. Acids Res.* 16:6987-6999 (1988); Grundstrom et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Hayes (2002) Combining Computational and Experimental Screening for rapid Optimization of Protein Properties *PNAS* 99 (25) 15926-15931; Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, en *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. y Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlín) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Kramer et al., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456 (1984); Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA de Kramer y Fritz, *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); Kramer et al., Point Mismatch Repair, *Cell* 38:879-887 (1984); Kramer et al., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed constructions of mutations, *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Ling et al., Approaches to DNA mutagenesis: an overview, *Anal Biochem.* 254(2): 157-178 (1997); Lorimer y Pastan *Nucl. Acids Res.* 23, 3067-8 (1995); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181 (1986); Nakamaye y Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease NciI cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, *Science* 223: 1299-1301 (1984); Sakamar y Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372 (1988); Sayers et al., Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers et al., Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromid, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Sieber, et al., *Nature Biotechnology*, 19: 456-460 (2001); Smith, In vitro mutagenesis, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462 (1985); *Methods in Enzymol.* 100: 468-500 (1983); *Methods in Enzymol.* 154: 329-350 (1987); Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); Taylor et al., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787 (1985); Wells et al., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423 (1986); Wells et al., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, *Gene* 34:315-323 (1985); Zoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M 13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, *Nucleic Acids Res.* 10: 6487-6500 (1982);

Zoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller y Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Clackson et al. (1991) "Making antibody fragments using phage display libraries" *Nature* 352:624-628; Gibbs et al. (2001) "Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling" *Gene* 271:13-20; e Hiraga y Arnold (2003) "General method for sequence-independent site-directed chimeragenesis": *J. Mol. Biol.* 330:287-296. Se pueden encontrar detalles adicionales sobre muchos de los métodos anteriores en *Methods in Enzymology Volumen 154*, que también describe controles útiles para resolver problemas con diversos métodos de mutagénesis.

10 Fabricación y Aislamiento de Polimerasas Recombinantes

En general, los ácidos nucleicos que codifican una polimerasa tal como se presenta en este documento pueden prepararse mediante clonación, recombinación, síntesis in vitro, amplificación in vitro y/u otros métodos disponibles. Se puede usar una diversidad de métodos recombinantes para expresar un vector de expresión que codifica una polimerasa tal como se presenta en este documento. Métodos para preparar ácidos nucleicos recombinantes, la expresión y el aislamiento de productos expresados son bien conocidos y se describen en la técnica. En este documento se describe un cierto número de mutaciones y combinaciones de mutaciones ilustrativas, así como estrategias para el diseño de mutaciones deseables. Métodos para realizar y seleccionar mutaciones en el sitio activo de las polimerasas, incluida la modificación de características estéricas en o cerca del sitio activo para permitir un acceso mejorado por los análogos de nucleótidos se encuentran en este documento anteriormente y, p. ej., en los documentos WO 2007/076057 y PCT/US2007/022459.

Referencias útiles adicionales para la mutación, métodos de manipulación de ácidos nucleicos recombinantes e in vitro (que incluyen clonación, expresión, PCR y similares) incluyen Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, *Methods in Enzymology* volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, California (Berger); Kaufman et al. (2003) *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine* Segunda edición Ceske (ed) CRC Press (Kaufman); y *The Nucleic Acid Protocols Handbook* Ralph Rapley (ed) (2000) Cold Spring Harbor, Humana Press Inc (Rapley); Chen et al. (ed) *PCR Cloning Protocols*, segunda edición (*Methods in Molecular Biology*, volumen 192) Humana Press; y en Viljoen et al. (2005) *Molecular Diagnostic PCR Handbook* Springer, ISBN 1402034032.

Además, hay una gran cantidad de kits disponibles comercialmente para la purificación de plásmidos u otros ácidos nucleicos relevantes de las células (véase, p. ej., EasyPrep.TM., FlexiPrep.TM. ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean.TM. de Stratagene; y QIAprep.TM de Qiagen). Cualquier ácido nucleico aislado y/o purificado puede manipularse adicionalmente para producir otros ácidos nucleicos, utilizados para transfectar células, incorporados en vectores relacionados para infectar organismos para la expresión, y/o similares. Vectores de clonación típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de inicio de la transcripción y la traducción y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico diana particular. Los vectores comprenden opcionalmente casetes de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia de terminador independiente, secuencias que permiten la replicación del casete en eucariotas o procariotas, o ambos (p. ej., vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas procariotas y eucariotas. Los vectores son adecuados para la replicación e integración en procariotas, eucariotas o ambos.

Otras referencias útiles, p. ej., para el aislamiento y el cultivo celular (por ejemplo, para el posterior aislamiento de ácidos nucleicos) incluyen Freshney (1994) *Culture of Animal Cells*, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias citadas allí; Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, N.Y.; Gamborg y Phillips (eds) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; *Fundamental Methods Springer Lab Manual*, Springer-Verlag (Berlín Heidelberg Nueva York) y Atlas y Parks (eds) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, Fla.

Los ácidos nucleicos que codifican las polimerasas recombinantes de las descritas en este documento también son una característica de las realizaciones presentadas en este documento. Un aminoácido particular puede ser codificado por múltiples codones, y ciertos sistemas de traducción (p. ej., células procariotas o eucariotas) a menudo exhiben preferencia codónica, p. ej., diferentes organismos prefieren a menudo uno de los varios codones sinónimos que codifican el mismo aminoácido. Como tales, los ácidos nucleicos presentados en este documento están opcionalmente "optimizado en codones", lo que significa que los ácidos nucleicos se sintetizan para incluir codones que son preferidos por el sistema de traducción particular que se emplea para expresar la polimerasa. Por ejemplo, cuando es deseable expresar la polimerasa en una célula bacteriana (o incluso una cepa particular de bacteria), el ácido nucleico puede sintetizarse para incluir codones que se encuentran con mayor frecuencia en el genoma de esa célula bacteriana, para una expresión eficiente de la polimerasa. Se puede emplear una estrategia similar cuando es deseable expresar la polimerasa en una célula eucariota, p. ej., el ácido nucleico puede incluir codones preferidos por esa célula eucariota.

Se conoce una diversidad de métodos de aislamiento y detección de proteínas y se pueden usar para aislar polimerasas, p. ej., de cultivos recombinantes de células que expresan las polimerasas recombinantes presentadas en este documento. Una diversidad de métodos de aislamiento y detección de proteínas son bien conocidos en la

técnica, incluidos, p. ej., los establecidos en R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, *Methods in Enzymology* vol. 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; Bollag et al. (1996) *Protein Methods*, 2.^a edición Wiley-Liss, NY; Walker (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ; Harris y Angal (1990): *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press en Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal: *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press en Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3.^a edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, segunda edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) *Protein Protocols* en CD-ROM Humana Press, NJ; y las referencias citadas allí. Se pueden encontrar detalles adicionales sobre los métodos de purificación y detección de proteínas en Satinder Ahuja ed., *Handbook of Bioseparations*, Academic Press (2000).

Métodos de uso

Las polimerasas alteradas presentadas en este documento pueden usarse en un procedimiento de secuenciación, tal como una técnica de secuenciación por síntesis (SBS). Brevemente, la SBS puede iniciarse poniendo en contacto los ácidos nucleicos diana con uno o más nucleótidos marcados, ADN polimerasa, etc. Las características en las que se extiende un cebador usando el ácido nucleico diana como molde incorporarán un nucleótido marcado que puede detectarse. Opcionalmente, los nucleótidos marcados pueden incluir, además, una propiedad de terminación reversible que termina una extensión adicional del cebador una vez que se ha añadido un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, un análogo de nucleótidos que tiene un resto terminador reversible se puede añadir a un cebador de modo que la extensión posterior no pueda ocurrir hasta que se administre un agente de desbloqueo para separar el resto. Por lo tanto, para realizaciones que usan terminación reversible, se puede administrar un reactivo de desbloqueo a la celda de flujo (antes o después de que se produzca la detección). Los lavados se pueden realizar entre las distintas etapas de suministro. El ciclo puede repetirse n veces para extender el cebador en n nucleótidos, detectando así una secuencia de longitud n. Procedimientos de SBS ilustrativos, los sistemas fluidicos y las plataformas de detección que se pueden adaptar fácilmente para uso con una matriz producida por los métodos de la presente divulgación se describen, por ejemplo, en Bentley et al., *Nature* 456:53-59 (2008), documentos WO 04/018497; WO 91/06678; WO 07/123744; patentes de EE.UU. N^o 7.057.026; 7.329.492; 7.211.414; 7.315.019 o 7.405.281 y publicación de solicitud de patente de EE.UU. N^o 2008/0108082 A1.

Se pueden usar otros procedimientos de secuenciación que usan reacciones cíclicas tales como la pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos particulares en una cadena de ácido nucleico naciente (Ronaghi, et al., *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi et al. *Science* 281 (5375), 363 (1998)); patentes de EE.UU. N^o 6.210.891; 6.258.568 y 6.274.320). En la pirosecuenciación, el PPi liberado puede detectarse al convertirse en trifosfato de adenosina (ATP) mediante ATP sulfurilasa, y el ATP resultante puede detectarse a través de fotones producidos por la luciferasa. Por lo tanto, la reacción de secuenciación puede controlarse mediante un sistema de detección de luminiscencia. Fuentes de radiación de excitación utilizadas para sistemas de detección basados en fluorescencia no son necesarias para los procedimientos de pirosecuenciación. Los sistemas fluidico, detectores y procedimientos útiles que se pueden usar para la aplicación de pirosecuenciación a matrices de la presente divulgación se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de la OMPI N^o de Serie PCT/US11/57111, publicación de solicitud de patente de EE.UU. N^o 2005/0191698 A1, patente de EE.UU. N^o 7.595.883 y patente de EE.UU. N^o 7.244.559.

Algunas realizaciones pueden utilizar métodos que implican la monitorización en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa. Por ejemplo, incorporaciones de nucleótidos se pueden detectar a través de interacciones de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre una polimerasa que contiene fluoróforo y nucleótidos marcados con γ -fosfato, o con guíaondas de modo cero. Técnicas y reactivos para la secuenciación basada en FRET se describen, por ejemplo, en Levene et al. *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist et al. *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korlach et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008).

Algunas realizaciones de SBS incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido en un producto de extensión. Por ejemplo, la secuenciación basada en la detección de protones liberados puede usar un detector eléctrico y técnicas asociadas que están disponibles comercialmente de Ion Torrent (Guilford, CT, una subsidiaria de Life Technologies) o métodos y sistemas de secuenciación descritos en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N^o 2009/0026082 A1; 2009/0127589 A1; 2010/0137143 A1; o 2010/0282617 A1.

Por consiguiente, en este documento se presentan métodos para incorporar análogos de nucleótidos en el ADN, que comprenden permitir que los siguientes componentes interactúen: (i) una polimerasa alterada de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, (ii) un molde de ADN; y (iii) una solución de nucleótidos. En ciertas realizaciones, el molde de ADN comprende una matriz agrupada. En ciertas realizaciones, los nucleótidos se modifican en el hidroxilo 3' del azúcar e incluyen modificaciones en el hidroxilo 3' del azúcar de modo que el sustituyente es de mayor tamaño que el grupo hidroxilo 3' que se produce de forma natural.

Ácidos nucleicos que codifican polimerasas alteradas

Además, en este documento se presentan moléculas de ácido nucleico que codifican las enzimas polimerasas

alteradas presentadas en este documento. Para cualquier polimerasa alterada dada que sea una versión mutante de una polimerasa para la que se conoce la secuencia de aminoácidos y preferiblemente también la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje que codifica la polimerasa es posible obtener una secuencia de nucleótidos que codifica el mutante de acuerdo con los principios básicos de la biología molecular. Por ejemplo, dado que se conoce la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje que codifica la polimerasa 9^oN, es posible deducir una secuencia de nucleótidos que codifique cualquier versión mutante dada de 9^oN que tenga una o más sustituciones de aminoácidos usando el código genético estándar. De manera similar, las secuencias de nucleótidos se pueden derivar fácilmente para versiones mutantes de otras polimerasas, tales como, por ejemplo, VentTM, Pfu, Tsp JDF-3, Taq, etc. Moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de nucleótidos requerida se pueden construir utilizando técnicas estándares de biología molecular conocidas en la técnica.

De acuerdo con las realizaciones presentadas en este documento, un ácido nucleico definido incluye no solo el ácido nucleico idéntico, sino también cualquier variación de base menor que incluye, en particular, sustituciones en los casos que dan como resultado un codón sinónimo (un codón diferente que especifica el mismo residuo de aminoácido) debido al código degenerado en sustituciones conservadoras de aminoácidos. La expresión "secuencia de ácido nucleico" también incluye la secuencia complementaria a cualquier secuencia de cadena sencilla dada con respecto a las variaciones de base.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento también pueden incluirse, ventajosamente, en un vector de expresión adecuado para expresar las proteínas de polimerasa codificadas a partir de ellas en un huésped adecuado. La incorporación de ADN clonado en un vector de expresión adecuado para la transformación posterior de dicha célula y la posterior selección de las células transformadas es bien conocida por los expertos en la técnica tal como se proporciona en Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.

Un vector de expresión de este tipo incluye un vector que tiene un ácido nucleico de acuerdo con las realizaciones presentadas en esta memoria operativamente enlazadas a secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de dichos fragmentos de ADN. La expresión "operativamente enlazado" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Vectores de este tipo pueden transformarse en una célula huésped adecuada para proporcionar la expresión de una proteína de acuerdo con las realizaciones presentadas en este documento.

La molécula de ácido nucleico puede codificar una proteína madura o una proteína que tiene una prosequencia, incluida la que codifica una secuencia conductora en la preproteína que luego es escindida por la célula huésped para formar una proteína madura. Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores de plásmidos, virus o fagos provistos de un origen de replicación y, opcionalmente, un promotor para la expresión de dicho nucleótido y, opcionalmente, un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más marcadores seleccionables, tales como, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos.

Elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias de promotor para unir la ARN polimerasa y dirigir un nivel apropiado de inicio de la transcripción y también secuencias de inicio de la traducción para la unión al ribosoma. Por ejemplo, un vector de expresión bacteriano puede incluir un promotor tal como el promotor lac y para el inicio de la traducción la secuencia de Shine-Dalgarno y el codón de inicio AUG. De manera similar, un vector de expresión eucariota puede incluir un promotor heterólogo u homólogo para la ARN polimerasa II, una señal de poliadenilación aguas abajo, el codón de inicio AUG y un codón de terminación para el desprendimiento del ribosoma. Vectores de este tipo pueden obtenerse comercialmente o ensamblarse a partir de las secuencias descritas por métodos bien conocidos en la técnica.

La transcripción de ADN que codifica la polimerasa por eucariotas superiores puede optimizarse incluyendo una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis que actúan sobre un promotor para aumentar el nivel de transcripción. Los vectores también incluirán generalmente orígenes de replicación además de los marcadores seleccionables.

Ejemplo 1

Métodos y Condiciones Generales de Ensayo

Los siguientes párrafos describen las condiciones generales de ensayo utilizadas en los Ejemplos que se presentan a continuación.

1. Ensayo basado en gel

Esta sección describe un ensayo basado en gel utilizado en los Ejemplos que figuran más adelante para controlar la actividad pirofosforolítica de una polimerasa.

Brevemente, la actividad pirofosforolítica de una polimerasa modificada ilustrativa se midió mezclando enzima 300 nM y ADN de molde de cebador dúplex 100 nM con diferentes concentraciones (0, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 y 4 mM) de pirofosfato de sodio, respectivamente, en el tampón de reacción que contiene: Tris-HCl 50 mM (pH 9,0), NaCl 50

mM, EDTA 1 mM, MgSO₄ 6 mM y Tween-20 al 0,05% (v/v). Las reacciones se realizaron a 55°C durante 1 minuto y se detuvieron agregando un volumen igual de solución de enfriamiento brusco 2X que contenía azul de bromofenol al 0,025%, EDTA 30 mM y formamida desionizada al 95%.

- 5 Los productos de reacción se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos y se resolvieron en electroforesis en gel de urea-poliacrilamida 7M al 15% (urea-PAGE). Los resultados se visualizaron escaneando el gel con el Typhoon 8000 PhosphorImager de GE Healthcare.

El dúplex cebador-molde dúplex se formó reasociando los siguientes oligonucleótidos:

Cebador: 5'-GCTTGCACAGGTGCGTTCGT*-3'

Molde: 5'-CGTTAGTCCACGAACGCACCTGTGCAAGC-3'

- 10 Este cebador comprende un colorante fluorescente 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) enlazado al extremo 5' del oligonucleótido. El último "T*" contiene un resto de bloqueo 3'-O azido metilo en el nucleótido. Las pistas que muestran degradación del cebador marcado indican pirofosforólisis mejorada (reacción inversa de la polimerización de ADN) en comparación con el control.

2. Clonación y expresión de polimerasas

- 15 Esta sección describe el enfoque utilizado para la clonación y expresión de los diversos mutantes de polimerasa utilizados en los Ejemplos que figuran más adelante.

La mutagénesis se realizó en el gen que codifica la secuencia del gen de la cadena principal para la polimerasa usando la metodología estándar de mutagénesis dirigida al sitio. Para cada una de las mutaciones realizadas, se confirmó la secuencia adecuada de los genes mutados secuenciando la secuencia del gen clonado.

- 20 Los genes de polimerasa se subclonaron en un vector pET11a y se transformaron en células de expresión BL21 Star (DE3) de Invitrogen. Las células transformadas se cultivaron a 37°C en matraces Fernback de 2,8 L hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 0,8. Luego se indujo la expresión de proteínas mediante la adición de IPTG 1 mM, seguido de 3 horas de crecimiento adicional. Los cultivos se centrifugaron luego a 7000 rpm durante 20 minutos. Los sedimentos celulares se almacenaron a - 20°C hasta la purificación.

- 25 La lisis de células bacterianas se realizó resuspendiendo los cultivos congelados en tampón de lisis 10x p/v (Tris pH 7,5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM). Se añadió inhibidor de proteasa libre de EDTA (Roche) al sedimento celular resuspendido. Todas las etapas de lisis y purificación se realizaron a 4°C. El cultivo resuspendido se hizo pasar a través de un microfluidizador cuatro veces para completar la lisis celular. El lisado se centrifugó luego a 20.000 rpm durante 20 minutos para separar los desechos celulares. Se añadió polietilénimina (concentración final 0,5%) al sobrenadante lentamente con agitación durante 45 minutos para precipitar el ácido nucleico bacteriano. El lisado se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 minutos; el sedimento fue descartado. El lisado se precipitó luego con sulfato de amonio usando dos volúmenes de (NH₄)₂SO₄ saturado en frío en dH₂O estéril. La proteína precipitada se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 minutos. Los sedimentos de proteína se resuspendieron en 250 mL de tampón A (Tris 50 mM pH 7,5, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM). El lisado resuspendido se purificó luego usando una columna SP FastFlow (GE) de 5 mL pre-equilibrada en tampón A. La columna se eluyó usando un gradiente de 50 mL de KCl 0,1 a 1 M. Las fracciones pico se agruparon y se diluyeron con tampón C (Tris pH 7,5, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM) hasta que la conductividad fue igual al tampón D (Tris pH 7,5, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM). Las fracciones agrupadas se cargaron luego en una columna HiTrap Heparin Fastflow de 5 mL. La polimerasa se eluyó luego usando un gradiente de 100 mL de KCl 50 mM a 1 M. Las fracciones pico se agruparon, se dializaron en tampón de almacenamiento (Tris 20 mM, pH 7,5, KCl 300 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol al 50%) y se congelaron a - 80°C.

3. Análisis de ajuste de fases/pre-ajuste de fases

Esta sección describe el enfoque utilizado para analizar el rendimiento de los mutantes de polimerasa utilizados en los Ejemplos que figuran a continuación en una secuenciación por ensayo de síntesis.

- 45 Se usaron experimentos cortos de secuenciación de 12 ciclos para generar valores de ajuste de fases y pre-ajuste de fases. Los experimentos se llevaron a cabo en un sistema Illumina Genome Analyzer que se convirtió en un sistema de una sola pita que ejecuta la química MiSeq Fast (Illumina, Inc., San Diego, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, para cada una de las polimerasas se generaron mezclas de incorporación separadas (IMX) y se realizó una operación de 4 x 12 ciclos usando una posición diferente para cada una de las IMX. Se usaron formulaciones de reactivos MiSeq estándar, con la polimerasa estándar sustituida con la polimerasa que se estaba ensayando. La colección de ADN utilizada se realizó siguiendo el protocolo estándar TruSeq HT de ADN genómico PhiX (suministrado como control con reactivos Illumina). El software Illumina RTA se utilizó para evaluar los niveles de ajuste de fases y pre-ajuste de fases.

Ejemplo 2

Identificación y Rastreo de Mutantes de polimerasa 9°N para el ajuste de fases/pre-ajuste de fases

Se realiza un rastreo de mutagénesis de saturación de residuos de mutagénesis en el bolsillo de bloque 3'. Se generaron mutaciones en dos secuencias de la cadena principal de polimerasa 9°N modificadas (SEQ ID NO: 29 y 31), se clonaron, se expresaron y se purificaron tal como se describe en general en el Ejemplo 1.

Las polimerasas mutantes purificadas se rastrean para determinar la cinética de explosión utilizando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparan con la polimerasa de control que tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 29 y 31. De esos mutantes que se seleccionan, un panel de los mutantes, incluidos los siguientes mutantes, se rastrean adicionalmente para determinar la actividad del ajuste de fases/pre-ajuste de fases tal como se describe anteriormente en el Ejemplo 1.

Los resultados del rastreo se resumen en la Tabla que figura a continuación. Como se muestra en la Tabla, cada uno de los mutantes anteriores muestra mejoras inesperadas y significativas en uno o más de los ajustes de fase y pre-ajustes de fase en comparación con las polimerasas de control, Pol957 o Pol955.

Mutación (nombre)	SEQ ID NO:	¿Reducción del ajuste de fases en comparación con el control?
Control	29	-
K477M	30	Sí
Control	31	-
K477M	32	Sí

Ejemplo 3

Rastreo de Mutantes de Polimerasa 9°N WT

Se generan, clonan, expresan y purifican mutaciones a la secuencia de la cadena principal de la polimerasa de tipo salvaje 9°N-7 (9°N) (SEQ ID NO: 5) de *Thermococcus sp* tal como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NO: 6-8.

Las polimerasas mutantes purificadas se seleccionan para determinar la cinética de explosión utilizando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparan con la polimerasa de control que tiene la secuencia recogida en SEQ ID NO: 5. De esos mutantes que se rastrean, se rastrea adicionalmente un panel de mutantes en cuanto a la actividad de ajuste de fases/pre-ajuste de fases tal como se describe en general en el Ejemplo 1. Las polimerasas que tienen las siguientes mutaciones muestran una actividad de ajuste de fases y/o pre-ajuste de fases mejorada en comparación con el control:

Mutante	SEQ ID NO:
K477M	6
K477M L408A Y409A P410I	7
K477M L408A Y409A P410V	7
K477M L408A Y409A P410A	7
K477M Y409A	8

Ejemplo 4

Rastreo de mutantes de la Exo⁻ Polimerasa 9^oN

Se generan, clonan, expresan y purifican mutaciones a la secuencia de la cadena principal de la Exo⁻polimerasa 9^oN (SEQ ID NO: 9) tal como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NO: 10-12.

Las polimerasas mutantes purificadas se rastrean para determinar la cinética de explosión utilizando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparan con la polimerasa de control que tiene la secuencia recogida en SEQ ID NO: 9. De esos mutantes que se rastrean, se rastrea adicionalmente un panel de mutantes en cuanto a la actividad de ajuste de fases/pre-ajuste de fases tal como se describe en general en el Ejemplo 1. Las polimerasas que tienen las siguientes mutaciones muestran una actividad de ajuste de fases y/o de pre-ajuste de fases mejorada en comparación con el control:

Mutante	SEQ ID NO:
K477M	10
K477M L408A Y409A P410I	11
K477M L408A Y409A P410V	11
K477M L408A Y409A P410A	11
K477M Y409A	12

Ejemplo 5

Rastreo de Mutantes de Polimerasa 9^oN Alterada

Se generan, clonan, expresan y purifican mutaciones a la secuencia de la cadena principal de la polimerasa 9^oN alterada (SEQ ID NO: 13) tal como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NO: 14-16.

Las polimerasas mutantes purificadas se rastrean para determinar la cinética de explosión utilizando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparan con la polimerasa de control que tiene la secuencia recogida en la SEQ ID NO: 13. De esos mutantes que se rastrean, se rastrea adicionalmente un panel de mutantes en cuanto a la actividad de ajuste de fases/pre-ajuste de fases tal como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1. Se demuestra que las polimerasas que tienen las siguientes mutaciones tienen actividad de ajuste de fases y/o pre-ajuste de fases mejorada en comparación con el control:

Mutante	SEQ ID NO:
K477M	14
K477M L408A Y409A P410I	15

Mutante	SEQ ID NO:
K477M L408A Y409A P410V	15
K477M L408A Y409A P410A	15
K477M Y409A	16

Ejemplo 6

Rastreo de mutantes de Exo⁻ Polimerasa Pfu

5 Basado en el análisis del alineamiento de la secuencia con la secuencia de la cadena principal de la polimerasa 9°N (véase la Figura 1), se generan, clonan, expresan y purifican mutaciones a la secuencia de la cadena principal de las mutaciones específicas para Exo⁻ polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (SEQ ID NO: 17) tal como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NO: 18-20.

10 Las polimerasas mutantes purificadas se rastrean para determinar la cinética de explosión utilizando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparan con la polimerasa de control que tiene la secuencia recogida en SEQ ID NO: 17. De esos mutantes que se rastrean, se rastrea adicionalmente un panel de mutantes en cuanto a la actividad de ajuste de fases/pre-ajuste de fases tal como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1. Se demuestra que las polimerasas que tienen las siguientes mutaciones tienen actividad de ajuste de fases y/o pre-ajuste de fases mejorada en comparación con el control:

Mutante	SEQ ID NO:
K477M	18
K477M L408A Y409A P410I	19
K477M L408A Y409A P410V	19
K477M L408A Y409A P410A	19
K477M Y409A	20

Ejemplo 7

Rastreo de Mutantes de Exo⁻ Polimerasa KOD1

Basado en el análisis del alineamiento de la secuencia con la secuencia de la cadena principal de la polimerasa 9°N (véase la Figura 1), se generan, clonan, expresan y purifican mutaciones específicas a la secuencia de la cadena

principal de mutaciones específicas para la cadena principal de la Exo⁻ polimerasa de *Thermococcus kodakaraensis* (KOD1) (SEQ ID NO: 21) tal como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NO: 22-24.

- 5 Las polimerasas mutantes purificadas se rastrean para determinar la cinética de explosión utilizando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparan con la polimerasa de control que tiene la secuencia recogida en SEQ ID NO: 21. De esos mutantes que se rastrean, se rastrea adicionalmente un panel de mutantes en cuanto a la actividad de ajuste de fases/pre-ajuste de fases tal como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1. Se demuestra que las polimerasas que tienen las siguientes mutaciones tienen actividad de ajuste de fases y/o pre-ajuste de fases mejorada en comparación con el control:

Mutante	SEQ ID NO:
K477M	22
K477M L408A Y409A P410I	23
K477M L408A Y409A P410V	23
K477M L408A Y409A P410A	23
K477M Y409A	24

10

Ejemplo 8

Rastreo de Mutantes de Exo⁻ Polimerasa MMS2

- 15 Basado en el análisis del alineamiento de la secuencia con la secuencia de la cadena principal de la polimerasa 9°N (véase la Figura 1), se identifican mutaciones específicas para la cadena principal de la Exo⁻ polimerasa de *Methanococcus maripaludis* (MMS2) (SEQ ID NO: 25) en base a la homología en un alineamiento con la polimerasa 9°N (véase la Figura 2). Los mutantes se generan, clonan, expresan y purifican tal como se describe en general en el Ejemplo 1, produciendo enzimas polimerasa que tienen las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NO: 26-28.

- 20 Las polimerasas mutantes purificadas se rastrean para determinar la cinética de explosión utilizando el ensayo basado en gel descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y se comparan con la polimerasa de control que tiene la secuencia recogida en la SEQ ID NO: 25. De esos mutantes que se rastrean, se rastrea adicionalmente un panel de mutantes en cuanto a la actividad de ajuste de fases/pre-ajuste de fases tal como se describe en general anteriormente en el Ejemplo 1. Se demuestra que las polimerasas que tienen las siguientes mutaciones tienen una actividad de ajuste de fases y/o pre-ajuste de fases mejorada en comparación con el control:

25

Mutante	SEQ ID NO:
Q493M	26
Q493M L417A Y418A P419I	27

Mutante	SEQ ID NO:
Q493M L417A Y418A P419V	27
Q493M L417A Y418A P419A	27
Q493M Y418A	28

A lo largo de esta solicitud, se ha hecho referencia a diversas publicaciones, patentes y/o solicitudes de patente.

Listado de secuencias

<110> Illumina, Inc.

5 <120> POLIMERASAS MODIFICADAS PARA LA INCORPORACIÓN MEJORADA DE ANÁLOGOS DE NUCLEÓTIDOS

<130> IP-1152-PRV

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210>1
<211>18
<212>PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Varios, incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.

<220>
<221>VARIANTE
<222>(2)..(2)
<223> X = cualquier AA

20 <220>
<221>VARIANTE
<222>(3)..(3)
<223>X = cualquier AA

25 <220>
<221>VARIANTE
<222>(4)..(4)
<223> X = cualquier AA

30 <220>
<221>VARIANTE
<222>(8)..(8)
<223>X = cualquier AA

35 <220>
<221>VARIANTE
<222>(10)..(10)
<223>X = cualquier AA

<220>
<221>VARIANTE
<222>(11)..(11)
<223>X = cualquier AA

5 <220>
<221>VARIANTE
<222>(12)..(12)
<223>X = cualquier AA

10 <220>
<221>VARIANTE
<222>(14)..(14)
<223>X = cualquier AA

<400>
Glu Xaa Xaa Xaa Leu Asp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Leu Ala
1 5 10 15

1

Asn Ser

15 <210>2
 <211>18
 <212>PRT
 <213>Secuencia artificial

20 <223> Varios, incluyendo *Thermococcus* sp. o *Pyrococcus* sp.

<220>
<221>VARIANTE
<222>(2)..(2)
<223> X = K, R, Y

25 <220>
<221>VARIANTE
<222>(3)..(3)
<223> X = K, I, Q

30 <220>
<221>VARIANTE
<222>(4)..(4)
<223> X = L, I, M

35 <220>
 <221>VARIANTE
 <222>(8)..(8)
 <223> X = R, E

40

<220>	
<221>	VARIANTE
<222>	(10)..(10)
<223>	X = R, K, I

<220>
<221>VARIANTE
<222>(11)..(11)
<223> X = A, K, L, V, S

45 <220>
 <221>VARIANTE
 <222>(12)..(12)
 <223> X = I, V, L, N

50 <220>
<221>VARIANTE
<222>(14)..(14)
<223> X = I, V, L

2

<400>
Glu Xaa Xaa Xaa Leu Asp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Leu Ala
1 5 10 15

Asn Ser

- 5 <210>3
<211>18
<212>PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Varios, incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.
- <220>
<221>VARIANTE
<222>(2)..(2)
<223> X = R, K
- 15 <220>
<221>VARIANTE
<222>(3)..(3)
<223> X = K, I
- 20 <220>
<221>VARIANTE
<222>(10)..(10)
<223> X = R, K
- 25 <220>
<221>VARIANTE
<222>(14)..(14)
<223> X = I, L

3

<400>
Glu Xaa Xaa Leu Leu Asp Tyr Arg Gln Xaa Ala Ile Lys Xaa Leu Ala
1 5 10 15

Asn Ser

- 30 <210>4
<211>18
<212>PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Varios, incluyendo Thermococcus sp. o Pyrococcus sp.
- 35 <400>4
Glu Lys Lys Leu Leu Asp Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala
1 5 10 15
- Asn Ser
- <210>5
<211>775
<212>PRT
40 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

ES 2 788 949 T3

<400>5

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

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

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys

ES 2 788 949 T3

225		230		235		240									
Ile	Gln	Arg	Met	Gly	Asp	Arg	Phe	Ala	Val	Glu	Val	Lys	Gly	Arg	Ile
				245					250					255	
His	Phe	Asp	Leu	Tyr	Pro	Val	Ile	Arg	Arg	Thr	Ile	Asn	Leu	Pro	Thr
			260					265					270		
Tyr	Thr	Leu	Glu	Ala	Val	Tyr	Glu	Ala	Val	Phe	Gly	Lys	Pro	Lys	Glu
		275					280					285			
Lys	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Ile	Ala	Gln	Ala	Trp	Glu	Ser	Gly	Glu	Gly
	290					295					300				
Leu	Glu	Arg	Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Met	Glu	Asp	Ala	Lys	Val	Thr	Tyr
305					310					315					320
Glu	Leu	Gly	Arg	Glu	Phe	Phe	Pro	Met	Glu	Ala	Gln	Leu	Ser	Arg	Leu
				325					330					335	
Ile	Gly	Gln	Ser	Leu	Trp	Asp	Val	Ser	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Asn	Leu
			340					345					350		
Val	Glu	Trp	Phe	Leu	Leu	Arg	Lys	Ala	Tyr	Lys	Arg	Asn	Glu	Leu	Ala
		355					360					365			
Pro	Asn	Lys	Pro	Asp	Glu	Arg	Glu	Leu	Ala	Arg	Arg	Arg	Gly	Gly	Tyr
	370					375					380				
Ala	Gly	Gly	Tyr	Val	Lys	Glu	Pro	Glu	Arg	Gly	Leu	Trp	Asp	Asn	Ile
385					390					395					400
Val	Tyr	Leu	Asp	Phe	Arg	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ile	Ile	Ile	Thr	His
				405					410					415	
Asn	Val	Ser	Pro	Asp	Thr	Leu	Asn	Arg	Glu	Gly	Cys	Lys	Glu	Tyr	Asp
			420					425					430		
Val	Ala	Pro	Glu	Val	Gly	His	Lys	Phe	Cys	Lys	Asp	Phe	Pro	Gly	Phe
		435					440					445			
Ile	Pro	Ser	Leu	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Glu	Arg	Gln	Lys	Ile	Lys
	450					455					460				
Arg	Lys	Met	Lys	Ala	Thr	Val	Asp	Pro	Leu	Glu	Lys	Lys	Leu	Leu	Asp
465					470					475					480

ES 2 788 949 T3

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
 485 490 495
 Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
 500 505 510
 Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
 515 520 525
 Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
 530 535 540
 His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
 545 550 555 560
 Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
 565 570 575
 Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
 580 585 590
 Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
 595 600 605
 Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
 610 615 620
 Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
 625 630 635 640
 Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
 645 650 655
 Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
 660 665 670
 Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
 675 680 685
 Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
 690 695 700
 Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
 705 710 715 720
 Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
 725 730 735
 Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
 740 745 750
 Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
 755 760 765
 Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
 770 775

<210>6
 <211>775
 <212>PRT
 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

5 <400>6
 Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
 1 5 10 15
 Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
 20 25 30
 Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
 35 40 45
 Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
 50 55 60
 Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
 65 70 75 80
 Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
 85 90 95
 Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
 100 105 110
 Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
 115 120 125
 Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr
 130 135 140
 Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
 145 150 155 160
 Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
 165 170 175

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

675

680

685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210>7

<211>775

<212>PRT

5 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

<220>

<221>VARIANTE

<222>(410)..(410)

<223> X = I, V, A

10 <400>7

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

595 600 605
 Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
 610 615 620
 Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
 625 630 635 640
 Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
 645 650 655
 Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
 660 665 670
 Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
 675 680 685
 Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
 690 695 700
 Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
 705 710 715 720
 Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
 725 730 735
 Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
 740 745 750
 Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
 755 760 765
 Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
 770 775

<210>8

<211>775

<212>PRT

5 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

<400>

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
 1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
 20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile

8

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210>9

<211>775

<212>PRT

5 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

ES 2 788 949 T3

<400>9

```

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1           5           10           15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
          20           25           30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
          35           40           45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50           55           60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65           70           75           80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
          85           90           95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
          100          105          110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
          115          120          125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130           135           140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145           150           155           160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
          165          170          175

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

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
          195          200          205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210           215           220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225           230           235           240

```

ES 2 788 949 T3

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
 245 250 255
 His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
 275 280 285
 Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
 290 295 300
 Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
 305 310 315 320
 Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
 325 330 335
 Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
 340 345 350
 Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
 355 360 365
 Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
 370 375 380
 Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
 385 390 395 400
 Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
 405 410 415
 Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
 420 425 430
 Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
 435 440 445
 Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
 450 455 460
 Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr

ES 2 788 949 T3

485	490	495
Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser 500 505 510		
Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu 515 520 525		
Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu 530 535 540		
His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala 545 550 555 560		
Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu 565 570 575		
Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys 580 585 590		
Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu 595 600 605		
Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala 610 615 620		
Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val 625 630 635 640		
Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro 645 650 655		
Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp 660 665 670		
Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala 675 680 685		
Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu 690 695 700		
Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe 705 710 715 720		
Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln 725 730 735		
Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys 740 745 750		
Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp 755 760 765		
Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys 770 775		

ES 2 788 949 T3

<210>10
 <211>775
 <212>PRT
 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

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

ES 2 788 949 T3

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

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
 195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
 210 215 220

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
 245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
 260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
 275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
 290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
 305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
 325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
 340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
 355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
 370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
 385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
 405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
 420 425 430

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210>11

<211>775

<212>PRT

5 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

<220>

<221>VARIANTE

<222>(410)..(410)

<223> X = I, V, A

10 <400>11

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210>12

<211>775

<212>PRT

5 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

<400>12

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
545 550 555 560

Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210>13

<211>775

<212>PRT

5 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

ES 2 788 949 T3

<400>13

```

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1           5           10           15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
          20           25           30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
          35           40           45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50           55           60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65           70           75           80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
          85           90           95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
          100          105          110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
          115          120          125

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130           135           140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145           150           155           160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
          165          170          175

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

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
          195          200          205

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

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225           230           235           240

```

ES 2 788 949 T3

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
 245 250 255
 His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
 275 280 285
 Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
 290 295 300
 Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
 305 310 315 320
 Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
 325 330 335
 Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
 340 345 350
 Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
 355 360 365
 Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
 370 375 380
 Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
 385 390 395 400
 Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Ala Ala Ser Ile Ile Ile Thr His
 405 410 415
 Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
 420 425 430
 Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
 435 440 445
 Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
 450 455 460
 Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Lys Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Tyr Arg Gln Arg Leu Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
 485 490 495

ES 2 788 949 T3

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
 500 505 510
 Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
 515 520 525
 Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
 530 535 540
 His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
 545 550 555 560
 Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
 565 570 575
 Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
 580 585 590
 Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
 595 600 605
 Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
 610 615 620
 Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
 625 630 635 640
 Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
 645 650 655
 Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
 660 665 670
 Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
 675 680 685
 Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
 690 695 700
 Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
 705 710 715 720
 Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
 725 730 735
 Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
 740 745 750
 Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
 755 760 765
 Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
 770 775

ES 2 788 949 T3

<210>14
 <211>775
 <212>PRT
 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

5 <400>14
 Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
 1 5 10 15
 Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
 20 25 30
 Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
 35 40 45
 Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
 50 55 60
 Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
 65 70 75 80
 Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
 85 90 95
 Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
 100 105 110
 Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
 115 120 125
 Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
 130 135 140
 Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
 145 150 155 160
 Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
 165 170 175
 Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210>15

<211>775

<212>PRT

5 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

<220>

<221>VARIANTE

<222>(410)..(410)

<223> X = I, V, A

10 <400>15

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210>16

<211>775

<212>PRT

5 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

<400>16

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Ala Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
420 425 430

Val Ala Pro Glu Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
450 455 460

Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Met Leu Leu Asp
465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Leu Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
515 520 525

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
530 535 540

His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala

ES 2 788 949 T3

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

<210>17

<211>775

<212>PRT

5 <213> Pyrococcus furiosus

ES 2 788 949 T3

<400>17

```

Met Ile Leu Asp Val Asp Tyr Ile Thr Glu Glu Gly Lys Pro Val Ile
1           5           10           15

Arg Leu Phe Lys Lys Glu Asn Gly Lys Phe Lys Ile Glu His Asp Arg
          20           25           30

Thr Phe Arg Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ile
          35           40           45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Gly Glu Arg His Gly Lys Ile Val Arg
50           55           60

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

Thr Val Trp Lys Leu Tyr Leu Glu His Pro Gln Asp Val Pro Thr Ile
          85           90           95

Arg Glu Lys Val Arg Glu His Pro Ala Val Val Asp Ile Phe Glu Tyr
          100          105          110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
          115          120          125

Met Glu Gly Glu Glu Glu Leu Lys Ile Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130           135           140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Lys Gly Pro Ile Ile Met Ile
145           150           155           160

Ser Tyr Ala Asp Glu Asn Glu Ala Lys Val Ile Thr Trp Lys Asn Ile
          165          170          175

Asp Leu Pro Tyr Val Glu Val Val Ser Ser Glu Arg Glu Met Ile Lys
          180          185          190

Arg Phe Leu Arg Ile Ile Arg Glu Lys Asp Pro Asp Ile Ile Val Thr
          195          200          205

Tyr Asn Gly Asp Ser Phe Asp Phe Pro Tyr Leu Ala Lys Arg Ala Glu
210           215           220

Lys Leu Gly Ile Lys Leu Thr Ile Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225           230           235           240

```

ES 2 788 949 T3

Met Gln Arg Ile Gly Asp Met Thr Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr His Val Ile Thr Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Lys Pro Lys Glu
275 280 285

Lys Val Tyr Ala Asp Glu Ile Ala Lys Ala Trp Glu Ser Gly Glu Asn
290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Lys Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Ala Thr Tyr
305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ile Gln Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Val Gly Gln Pro Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Val Ala
355 360 365

Pro Asn Lys Pro Ser Glu Glu Glu Tyr Gln Arg Arg Leu Arg Glu Ser
370 375 380

Tyr Thr Gly Gly Phe Val Lys Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn
385 390 395 400

Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr
405 410 415

His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Leu Glu Gly Cys Lys Asn Tyr
420 425 430

Asp Ile Ala Pro Gln Val Gly His Lys Phe Cys Lys Asp Ile Pro Gly
435 440 445

Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile
450 455 460

Lys Thr Lys Met Lys Glu Thr Gln Asp Pro Ile Glu Lys Ile Leu Leu
465 470 475 480

Asp Tyr Arg Gln Lys Leu Ile Lys Leu Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly
485 490 495

ES 2 788 949 T3

Tyr Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu
 500 505 510
 Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Ile Glu Leu Val Trp Lys Glu
 515 520 525
 Leu Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ile Asp Thr Asp Gly
 530 535 540
 Leu Tyr Ala Thr Ile Pro Gly Gly Glu Ser Glu Glu Ile Lys Lys Lys
 545 550 555 560
 Ala Leu Glu Phe Val Lys Tyr Ile Asn Ser Lys Leu Pro Gly Leu Leu
 565 570 575
 Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys
 580 585 590
 Lys Arg Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Val Ile Thr Arg Gly
 595 600 605
 Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln
 610 615 620
 Ala Arg Val Leu Glu Thr Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala
 625 630 635 640
 Val Arg Ile Val Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Ala Asn Tyr Glu Ile
 645 650 655
 Pro Pro Glu Lys Leu Ala Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Pro Leu His
 660 665 670
 Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Lys Leu Ala
 675 680 685
 Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val
 690 695 700
 Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn Arg Ala Ile Leu Ala Glu Glu
 705 710 715 720
 Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn
 725 730 735
 Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Gly Phe Gly Tyr Arg
 740 745 750
 Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Thr Ser
 755 760 765
 Trp Leu Asn Ile Lys Lys Ser
 770 775

<210>18

<211>775

<212>PRT

<213> Pyrococcus furiosus

ES 2 788 949 T3

<400>18

Met Ile Leu Asp Val Asp Tyr Ile Thr Glu Glu Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Lys Glu Asn Gly Lys Phe Lys Ile Glu His Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Arg Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Gly Glu Arg His Gly Lys Ile Val Arg
50 55 60

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

Thr Val Trp Lys Leu Tyr Leu Glu His Pro Gln Asp Val Pro Thr Ile
85 90 95

Arg Glu Lys Val Arg Glu His Pro Ala Val Val Asp Ile Phe Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Met Glu Gly Glu Glu Glu Leu Lys Ile Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Lys Gly Pro Ile Ile Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Asn Glu Ala Lys Val Ile Thr Trp Lys Asn Ile
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Glu Val Val Ser Ser Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val
690 695 700

Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn Arg Ala Ile Leu Ala Glu Glu
705 710 715 720

Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn
725 730 735

Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Gly Phe Gly Tyr Arg
740 745 750

Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Thr Ser
755 760 765

Trp Leu Asn Ile Lys Lys Ser
770 775

<210>19

<211>775

<212>PRT

5 <213> Pyrococcus furiosus

<220>

<221>VARIANTE

<222>(411)..(411)

<223> X = I, V, A

10 <400>19

Met Ile Leu Asp Val Asp Tyr Ile Thr Glu Glu Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Lys Glu Asn Gly Lys Phe Lys Ile Glu His Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Arg Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Gly Glu Arg His Gly Lys Ile Val Arg
50 55 60

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

Thr Val Trp Lys Leu Tyr Leu Glu His Pro Gln Asp Val Pro Thr Ile
85 90 95

Arg Glu Lys Val Arg Glu His Pro Ala Val Val Asp Ile Phe Glu Tyr
100 105 110

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln
610 615 620

Ala Arg Val Leu Glu Thr Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala
625 630 635 640

Val Arg Ile Val Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Ala Asn Tyr Glu Ile
645 650 655

Pro Pro Glu Lys Leu Ala Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Pro Leu His
660 665 670

Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Lys Leu Ala
675 680 685

Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val
690 695 700

Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn Arg Ala Ile Leu Ala Glu Glu
705 710 715 720

Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn
725 730 735

Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Gly Phe Gly Tyr Arg
740 745 750

Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Thr Ser
755 760 765

Trp Leu Asn Ile Lys Lys Ser
770 775

<210>20

<211>775

<212>PRT

5 <213> Pyrococcus furiosus

<400>20

Met Ile Leu Asp Val Asp Tyr Ile Thr Glu Glu Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Lys Glu Asn Gly Lys Phe Lys Ile Glu His Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Arg Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Arg Asp Asp Ser Lys Ile
35 40 45

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Ala Leu Glu Phe Val Lys Tyr Ile Asn Ser Lys Leu Pro Gly Leu Leu
565 570 575

Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys
580 585 590

Lys Arg Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Val Ile Thr Arg Gly
595 600 605

Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln
610 615 620

Ala Arg Val Leu Glu Thr Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala
625 630 635 640

Val Arg Ile Val Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Ala Asn Tyr Glu Ile
645 650 655

Pro Pro Glu Lys Leu Ala Ile Tyr Glu Gln Ile Thr Arg Pro Leu His
660 665 670

Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Lys Leu Ala
675 680 685

Ala Lys Gly Val Lys Ile Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Tyr Ile Val
690 695 700

Leu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Ser Asn Arg Ala Ile Leu Ala Glu Glu
705 710 715 720

Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn
725 730 735

Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Gly Phe Gly Tyr Arg
740 745 750

Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Thr Ser
755 760 765

Trp Leu Asn Ile Lys Lys Ser
770 775

<210>21

<211>774

<212>PRT

5 <213> Thermococcus kodakaraensis

ES 2 788 949 T3

<400>21

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr
50 55 60

Val Lys Arg Val Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

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

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
210 215 220

Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile

ES 2 788 949 T3

	245		250		255
His Phe Asp	Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr				
	260		265		270
Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu					
	275		280		285
Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Thr Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn					
	290		295		300
Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr					
	305		310		315
Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu					
	325		330		335
Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu					
	340		345		350
Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala					
	355		360		365
Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr					
	370		375		380
Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile					
	385		390		395
Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His					
	405		410		415
Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp					
	420		425		430
Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe					
	435		440		445
Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys					
	450		455		460
Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp					
	465		470		475
Tyr Arg Gln Arg Leu Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr					
	485		490		495

ES 2 788 949 T3

Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
 500 505 510
 Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile
 515 520 525
 Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe
 530 535 540
 Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
 545 550 555 560
 Met Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu
 565 570 575
 Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
 580 585 590
 Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
 595 600 605
 Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
 610 615 620
 Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
 625 630 635 640
 Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
 645 650 655
 Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
 660 665 670
 Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
 675 680 685
 Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
 690 695 700
 Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
 705 710 715 720
 Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
 725 730 735
 Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
 740 745 750
 Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp
 755 760 765
 Leu Lys Pro Lys Gly Thr
 770

<210>22

<211>774

<212>PRT

<213> Thermococcus kodakaraensis

ES 2 788 949 T3

<400>22

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr
50 55 60

Val Lys Arg Val Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

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

Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val
165 170 175

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

ES 2 788 949 T3

Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
 195 200 205
 Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
 210 215 220
 Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
 245 250 255
 His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu
 275 280 285
 Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Thr Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn
 290 295 300
 Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
 305 310 315 320
 Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
 325 330 335
 Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
 340 345 350
 Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
 355 360 365
 Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr
 370 375 380
 Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile
 385 390 395 400
 Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
 405 410 415
 Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
 420 425 430
 Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
 435 440 445

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

690

695

700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Pro Lys Gly Thr
770

<210>23

<211>774

<212>PRT

5 <213> Thermococcus kodakaraensis

<220>

<221>VARIANTE

<222>(410)..(410)

<223> x = I, V, A

10 <400>23

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr
50 55 60

Val Lys Arg Val Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

ES 2 788 949 T3

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro
 115 120 125
 Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
 130 135 140
 Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile
 145 150 155 160
 Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val
 165 170 175
 Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys
 180 185 190
 Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
 195 200 205
 Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
 210 215 220
 Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
 245 250 255
 His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu
 275 280 285
 Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Thr Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn
 290 295 300
 Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
 305 310 315 320
 Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
 325 330 335
 Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
 340 345 350
 Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
 355 360 365

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

610

615

620

Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Pro Lys Gly Thr
770

<210>24

<211>774

<212>PRT

5 <213> Thermococcus kodakaraensis

<400>24

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Met Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Pro Lys Gly Thr
770

<210>25

<211>784

<212>PRT

5 <213> Methanococcus maripaludis

ES 2 788 949 T3

<400>25

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

500	505	510
Leu Ala Phe Pro Met Ala Arg Trp Tyr Ser Arg Asp Cys Ala Glu Ile 515 520 525		
Thr Thr His Leu Gly Arg Gln Tyr Ile Gln Lys Thr Ile Glu Glu Ala 530 535 540		
Glu Asn Phe Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Phe Tyr 545 550 555 560		
Ser Lys Trp Ala Asp Asp Lys Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Leu Leu 565 570 575		
Glu Lys Thr Arg Glu Phe Leu Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu Pro Gly 580 585 590		
Glu Met Glu Leu Glu Phe Glu Gly Tyr Phe Lys Arg Gly Ile Phe Val 595 600 605		
Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Leu Ile Asp Glu Asn Glu Lys Ile Thr Val 610 615 620		
Lys Gly Leu Glu Val Val Arg Arg Asp Trp Ser Asn Val Ser Lys Asn 625 630 635 640		
Thr Gln Lys Asn Val Leu Asn Ala Leu Leu Lys Glu Gly Ser Val Glu 645 650 655		
Asn Ala Lys Lys Val Ile Gln Asp Thr Ile Lys Glu Leu Lys Asp Gly 660 665 670		
Lys Val Asn Asn Glu Asp Leu Leu Ile His Thr Gln Leu Thr Lys Arg 675 680 685		
Ile Glu Asp Tyr Lys Thr Thr Ala Pro His Val Glu Val Ala Lys Lys 690 695 700		
Ile Leu Lys Ser Gly Asn Arg Val Asn Thr Gly Asp Val Ile Ser Tyr 705 710 715 720		
Ile Ile Thr Ser Gly Asn Lys Ser Ile Ser Glu Arg Ala Glu Ile Leu 725 730 735		
Glu Asn Ala Lys Asn Tyr Asp Thr Asn Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Ile 740 745 750		
Leu Pro Pro Val Ile Arg Leu Met Glu Ala Leu Gly Ile Thr Lys Asp 755 760 765		
Glu Leu Lys Asp Ser Lys Lys Gln Tyr Thr Leu His His Phe Leu Lys 770 775 780		

<210>26

<211>784

<212>PRT

<213> Methanococcus maripaludis

ES 2 788 949 T3

<400>26

Met Glu Ser Leu Ile Asp Leu Asp Tyr Asn Ser Asp Asp Leu Cys Ile
1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Leu Ile Asn Ser Ile Ile Lys Glu Lys Asp Phe Lys Pro
20 25 30

Tyr Phe Tyr Val Asn Ser Thr Asp Lys Glu Gln Ile Leu Glu Phe Leu
35 40 45

Lys Asp Tyr Glu Lys Lys His Lys Leu Asp Ser Glu Ile Ser Lys Met
50 55 60

Ile Glu Asn Ile Glu Thr Val Lys Lys Ile Val Phe Asp Glu Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Glu Lys Glu Leu Ser Lys Val Thr Val Lys Tyr Pro Asn Asn Val
85 90 95

Lys Thr Val Arg Glu Ile Leu Met Glu Phe Glu Arg Leu Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Val Arg Arg Tyr Leu Ile Asp Asn Ser Val Ile Pro
115 120 125

Thr Ser Thr Trp Asp Phe Glu Asn Asn Lys Lys Ile Asp Asn Lys Ile
130 135 140

Pro Asp Phe Lys Thr Val Ser Phe Ala Ile Ala Val Tyr Cys Asn Lys
145 150 155 160

Glu Pro Asn Pro Lys Lys Asp Pro Ile Ile Met Ala Ser Phe Ser Ser
165 170 175

Lys Asp Phe Asn Thr Val Val Ser Thr Lys Lys Phe Asp His Glu Lys
180 185 190

ES 2 788 949 T3

Leu Glu Tyr Val Lys Asp Glu Lys Glu Leu Ile Lys Arg Ile Ile Glu
 195 200 205
 Ile Leu Lys Glu Tyr Asp Ile Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly Asp Asn Phe
 210 215 220
 Asp Phe Pro Tyr Leu Lys Lys Arg Ala Glu Ser Phe Gly Leu Glu Leu
 225 230 235 240
 Lys Leu Gly Lys Asn Asp Glu Lys Ile Lys Ile Thr Lys Gly Gly Met
 245 250 255
 Asn Ser Lys Ser Tyr Ile Pro Gly Arg Val His Ile Asp Leu Tyr Pro
 260 265 270
 Ile Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Thr Lys Tyr Arg Leu Glu Asn Val
 275 280 285
 Thr Glu Ala Leu Phe Asp Val Lys Lys Val Asp Val Gly His Glu Asn
 290 295 300
 Ile Pro Lys Met Trp Asp Asn Leu Asp Glu Thr Leu Val Glu Tyr Ser
 305 310 315 320
 His Gln Asp Ala Tyr Tyr Thr Gln Arg Ile Gly Glu Gln Phe Leu Pro
 325 330 335
 Leu Glu Ile Met Phe Ser Arg Val Val Asn Gln Ser Leu Tyr Asp Ile
 340 345 350
 Asn Arg Met Ser Ser Ser Gln Met Val Glu Tyr Leu Leu Leu Lys Asn
 355 360 365
 Ser Tyr Lys Met Gly Val Ile Ala Pro Asn Arg Pro Ser Gly Lys Glu
 370 375 380
 Tyr Gln Lys Arg Ile Arg Ser Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu
 385 390 395 400
 Pro Leu Lys Gly Ile His Glu Asp Ile Val Ser Met Asp Phe Leu Ser
 405 410 415
 Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Met Ser His Asn Leu Ser Pro Glu Thr Ile
 420 425 430
 Asp Cys Thr Cys Cys Ser Asp Glu Glu Asn Gly Glu Asn Glu Glu Ile
 435 440 445

ES 2 788 949 T3

Leu Gly His Lys Phe Cys Lys Lys Ser Ile Gly Ile Ile Pro Lys Thr
 450 455 460
 Leu Met Asp Leu Ile Asn Arg Arg Lys Lys Val Lys Lys Val Leu Arg
 465 470 475 480
 Glu Lys Ala Glu Lys Gly Glu Phe Asp Glu Glu Tyr Met Ile Leu Asp
 485 490 495
 Tyr Glu Gln Arg Leu Ile Lys Val Leu Ala Asn Ser His Tyr Gly Tyr
 500 505 510
 Leu Ala Phe Pro Met Ala Arg Trp Tyr Ser Arg Asp Cys Ala Glu Ile
 515 520 525
 Thr Thr His Leu Gly Arg Gln Tyr Ile Gln Lys Thr Ile Glu Glu Ala
 530 535 540
 Glu Asn Phe Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Phe Tyr
 545 550 555 560
 Ser Lys Trp Ala Asp Asp Lys Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Leu Leu
 565 570 575
 Glu Lys Thr Arg Glu Phe Leu Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu Pro Gly
 580 585 590
 Glu Met Glu Leu Glu Phe Glu Gly Tyr Phe Lys Arg Gly Ile Phe Val
 595 600 605
 Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Leu Ile Asp Glu Asn Glu Lys Ile Thr Val
 610 615 620
 Lys Gly Leu Glu Val Val Arg Arg Asp Trp Ser Asn Val Ser Lys Asn
 625 630 635 640
 Thr Gln Lys Asn Val Leu Asn Ala Leu Leu Lys Glu Gly Ser Val Glu
 645 650 655
 Asn Ala Lys Lys Val Ile Gln Asp Thr Ile Lys Glu Leu Lys Asp Gly
 660 665 670
 Lys Val Asn Asn Glu Asp Leu Leu Ile His Thr Gln Leu Thr Lys Arg
 675 680 685
 Ile Glu Asp Tyr Lys Thr Thr Ala Pro His Val Glu Val Ala Lys Lys
 690 695 700

ES 2 788 949 T3

Ile Leu Lys Ser Gly Asn Arg Val Asn Thr Gly Asp Val Ile Ser Tyr
705 710 715 720

Ile Ile Thr Ser Gly Asn Lys Ser Ile Ser Glu Arg Ala Glu Ile Leu
725 730 735

Glu Asn Ala Lys Asn Tyr Asp Thr Asn Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Ile
740 745 750

Leu Pro Pro Val Ile Arg Leu Met Glu Ala Leu Gly Ile Thr Lys Asp
755 760 765

Glu Leu Lys Asp Ser Lys Lys Gln Tyr Thr Leu His His Phe Leu Lys
770 775 780

<210>27

<211>784

<212>PRT

5 <213> Methanococcus maripaludis

<220>

<221>VARIANTE

<222>(419)..(419)

<223> X = I, V, A

10 <400>27

Met Glu Ser Leu Ile Asp Leu Asp Tyr Asn Ser Asp Asp Leu Cys Ile
1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Leu Ile Asn Ser Ile Ile Lys Glu Lys Asp Phe Lys Pro
20 25 30

Tyr Phe Tyr Val Asn Ser Thr Asp Lys Glu Gln Ile Leu Glu Phe Leu
35 40 45

Lys Asp Tyr Glu Lys Lys His Lys Leu Asp Ser Glu Ile Ser Lys Met
50 55 60

Ile Glu Asn Ile Glu Thr Val Lys Lys Ile Val Phe Asp Glu Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Glu Lys Glu Leu Ser Lys Val Thr Val Lys Tyr Pro Asn Asn Val
85 90 95

Lys Thr Val Arg Glu Ile Leu Met Glu Phe Glu Arg Leu Tyr Glu Tyr
100 105 110

ES 2 788 949 T3

Asp	Ile	Pro	Phe	Val	Arg	Arg	Tyr	Leu	Ile	Asp	Asn	Ser	Val	Ile	Pro	115	120	125
Thr	Ser	Thr	Trp	Asp	Phe	Glu	Asn	Asn	Lys	Lys	Ile	Asp	Asn	Lys	Ile	130	135	140
Pro	Asp	Phe	Lys	Thr	Val	Ser	Phe	Ala	Ile	Ala	Val	Tyr	Cys	Asn	Lys	145	150	155
Glu	Pro	Asn	Pro	Lys	Lys	Asp	Pro	Ile	Ile	Met	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser	165	170	175
Lys	Asp	Phe	Asn	Thr	Val	Val	Ser	Thr	Lys	Lys	Phe	Asp	His	Glu	Lys	180	185	190
Leu	Glu	Tyr	Val	Lys	Asp	Glu	Lys	Glu	Leu	Ile	Lys	Arg	Ile	Ile	Glu	195	200	205
Ile	Leu	Lys	Glu	Tyr	Asp	Ile	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Gly	Asp	Asn	Phe	210	215	220
Asp	Phe	Pro	Tyr	Leu	Lys	Lys	Arg	Ala	Glu	Ser	Phe	Gly	Leu	Glu	Leu	225	230	235
Lys	Leu	Gly	Lys	Asn	Asp	Glu	Lys	Ile	Lys	Ile	Thr	Lys	Gly	Gly	Met	245	250	255
Asn	Ser	Lys	Ser	Tyr	Ile	Pro	Gly	Arg	Val	His	Ile	Asp	Leu	Tyr	Pro	260	265	270
Ile	Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Asn	Leu	Thr	Lys	Tyr	Arg	Leu	Glu	Asn	Val	275	280	285
Thr	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Val	Lys	Lys	Val	Asp	Val	Gly	His	Glu	Asn	290	295	300
Ile	Pro	Lys	Met	Trp	Asp	Asn	Leu	Asp	Glu	Thr	Leu	Val	Glu	Tyr	Ser	305	310	315
His	Gln	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Thr	Gln	Arg	Ile	Gly	Glu	Gln	Phe	Leu	Pro	325	330	335
Leu	Glu	Ile	Met	Phe	Ser	Arg	Val	Val	Asn	Gln	Ser	Leu	Tyr	Asp	Ile	340	345	350
Asn	Arg	Met	Ser	Ser	Ser	Gln	Met	Val	Glu	Tyr	Leu	Leu	Leu	Lys	Asn	355	360	365

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Lys Gly Leu Glu Val Val Arg Arg Asp Trp Ser Asn Val Ser Lys Asn
625 630 635 640

Thr Gln Lys Asn Val Leu Asn Ala Leu Leu Lys Glu Gly Ser Val Glu
645 650 655

Asn Ala Lys Lys Val Ile Gln Asp Thr Ile Lys Glu Leu Lys Asp Gly
660 665 670

Lys Val Asn Asn Glu Asp Leu Leu Ile His Thr Gln Leu Thr Lys Arg
675 680 685

Ile Glu Asp Tyr Lys Thr Thr Ala Pro His Val Glu Val Ala Lys Lys
690 695 700

Ile Leu Lys Ser Gly Asn Arg Val Asn Thr Gly Asp Val Ile Ser Tyr
705 710 715 720

Ile Ile Thr Ser Gly Asn Lys Ser Ile Ser Glu Arg Ala Glu Ile Leu
725 730 735

Glu Asn Ala Lys Asn Tyr Asp Thr Asn Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Ile
740 745 750

Leu Pro Pro Val Ile Arg Leu Met Glu Ala Leu Gly Ile Thr Lys Asp
755 760 765

Glu Leu Lys Asp Ser Lys Lys Gln Tyr Thr Leu His His Phe Leu Lys
770 775 780

<210>28

<211>784

<212>PRT

5 <213> Methanococcus maripaludis

<400>28

Met Glu Ser Leu Ile Asp Leu Asp Tyr Asn Ser Asp Asp Leu Cys Ile
1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Leu Ile Asn Ser Ile Ile Lys Glu Lys Asp Phe Lys Pro
20 25 30

Tyr Phe Tyr Val Asn Ser Thr Asp Lys Glu Gln Ile Leu Glu Phe Leu
35 40 45

Lys Asp Tyr Glu Lys Lys His Lys Leu Asp Ser Glu Ile Ser Lys Met
50 55 60

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Ser Lys Trp Ala Asp Asp Lys Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Leu Leu
565 570 575

Glu Lys Thr Arg Glu Phe Leu Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu Pro Gly
580 585 590

Glu Met Glu Leu Glu Phe Glu Gly Tyr Phe Lys Arg Gly Ile Phe Val
595 600 605

Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Leu Ile Asp Glu Asn Glu Lys Ile Thr Val
610 615 620

Lys Gly Leu Glu Val Val Arg Arg Asp Trp Ser Asn Val Ser Lys Asn
625 630 635 640

Thr Gln Lys Asn Val Leu Asn Ala Leu Leu Lys Glu Gly Ser Val Glu
645 650 655

Asn Ala Lys Lys Val Ile Gln Asp Thr Ile Lys Glu Leu Lys Asp Gly
660 665 670

Lys Val Asn Asn Glu Asp Leu Leu Ile His Thr Gln Leu Thr Lys Arg
675 680 685

Ile Glu Asp Tyr Lys Thr Thr Ala Pro His Val Glu Val Ala Lys Lys
690 695 700

Ile Leu Lys Ser Gly Asn Arg Val Asn Thr Gly Asp Val Ile Ser Tyr
705 710 715 720

Ile Ile Thr Ser Gly Asn Lys Ser Ile Ser Glu Arg Ala Glu Ile Leu
725 730 735

Glu Asn Ala Lys Asn Tyr Asp Thr Asn Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Ile
740 745 750

Leu Pro Pro Val Ile Arg Leu Met Glu Ala Leu Gly Ile Thr Lys Asp
755 760 765

Glu Leu Lys Asp Ser Lys Lys Gln Tyr Thr Leu His His Phe Leu Lys
770 775 780

<210>29

<211>775

<212>PRT

5 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

ES 2 788 949 T3

<400>29

```

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1           5           10           15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
          20           25           30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
          35           40           45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50           55           60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65           70           75           80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
          85           90           95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
          100          105          110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
          115          120          125

Ala Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130           135           140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145           150           155           160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
          165          170          175

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

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
          195          200          205

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

Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
225           230           235           240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
          245          250          255

```

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

<210>30

<211>775

<212>PRT

<213> 9N-7 de Thermococcus sp.

ES 2 788 949 T3

<400>30

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Ala Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
165 170 175

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

Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr

ES 2 788 949 T3

195					200					205					
Tyr	Asn	Gly	Asp	Asn	Phe	Asp	Phe	Ala	Tyr	Leu	Lys	Lys	Arg	Ser	Glu
210						215					220				
Glu	Leu	Gly	Ile	Lys	Phe	Thr	Leu	Gly	Arg	Asp	Gly	Ser	Glu	Pro	Lys
225					230					235					240
Ile	Gln	Arg	Met	Gly	Asp	Arg	Phe	Ala	Val	Glu	Val	Lys	Gly	Arg	Ile
				245					250					255	
His	Phe	Asp	Leu	Tyr	Pro	Val	Ile	Arg	Arg	Thr	Ile	Asn	Leu	Pro	Thr
			260					265					270		
Tyr	Thr	Leu	Glu	Ala	Val	Tyr	Glu	Ala	Val	Phe	Gly	Lys	Pro	Lys	Glu
		275					280					285			
Lys	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Ile	Ala	Gln	Ala	Trp	Glu	Ser	Gly	Glu	Gly
	290					295					300				
Leu	Glu	Arg	Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Met	Glu	Asp	Ala	Lys	Val	Thr	Tyr
305					310					315					320
Glu	Leu	Gly	Arg	Glu	Phe	Phe	Pro	Met	Glu	Ala	Gln	Leu	Ser	Arg	Leu
				325					330					335	
Ile	Gly	Gln	Ser	Leu	Trp	Asp	Val	Ser	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Asn	Leu
			340					345					350		
Val	Glu	Trp	Phe	Leu	Leu	Arg	Lys	Ala	Tyr	Lys	Arg	Asn	Glu	Leu	Ala
		355					360					365			
Pro	Asn	Lys	Pro	Asp	Glu	Arg	Glu	Leu	Ala	Arg	Arg	Arg	Gly	Gly	Tyr
	370					375					380				
Ala	Gly	Gly	Tyr	Val	Lys	Glu	Pro	Glu	Arg	Gly	Leu	Trp	Asp	Asn	Ile
385					390					395					400
Val	Tyr	Leu	Asp	Phe	Arg	Ser	Ala	Ala	Ile	Ser	Ile	Ile	Ile	Thr	His
				405					410					415	
Asn	Val	Ser	Pro	Asp	Thr	Leu	Asn	Arg	Glu	Gly	Cys	Lys	Glu	Tyr	Asp
			420					425					430		
Val	Ala	Pro	Glu	Val	Gly	His	Lys	Phe	Cys	Lys	Asp	Phe	Pro	Gly	Phe
		435					440					445			

ES 2 788 949 T3

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
 450 455 460
 Arg Lys Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Leu Glu Lys Met Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Tyr Arg Gln Arg Val Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
 485 490 495
 Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
 500 505 510
 Val Ser Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Leu Glu Met Val Ile Arg Glu Leu
 515 520 525
 Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Leu
 530 535 540
 His Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
 545 550 555 560
 Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
 565 570 575
 Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Val Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
 580 585 590
 Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
 595 600 605
 Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
 610 615 620
 Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
 625 630 635 640
 Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
 645 650 655
 Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
 660 665 670
 Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
 675 680 685
 Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
 690 695 700

ES 2 788 949 T3

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210>31

<211>775

<212>PRT

5 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

<400>31

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95

Arg Asp Arg Ile Arg Ala His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110

Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
115 120 125

Ala Glu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Met Leu Ala Phe Ala Ile Ala Thr
130 135 140

ES 2 788 949 T3

Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Gly Thr Gly Pro Ile Leu Met Ile
 145 150 155 160
 Ser Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile
 165 170 175
 Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
 180 185 190
 Arg Phe Leu Arg Val Val Arg Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
 195 200 205
 Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
 210 215 220
 Glu Leu Gly Ile Lys Phe Thr Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
 245 250 255
 His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Lys Pro Lys Glu
 275 280 285
 Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Ser Gly Glu Gly
 290 295 300
 Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
 305 310 315 320
 Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
 325 330 335
 Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
 340 345 350
 Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Asn Glu Leu Ala
 355 360 365
 Pro Asn Lys Pro Asp Glu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
 370 375 380
 Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Asp Asn Ile
 385 390 395 400

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

645

650

655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
770 775

<210>32

<211>775

<212>PRT

5 <213> 9N-7 de Thermococcus sp.

<400>32

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15

Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45

Glu Asp Val Lys Lys Val Thr Ala Lys Arg His Gly Thr Val Val Lys
50 55 60

Val Lys Arg Ala Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile
65 70 75 80

Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Asn His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

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

ES 2 788 949 T3

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
 595 600 605
 Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
 610 615 620
 Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
 625 630 635 640
 Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
 645 650 655
 Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Arg Asp
 660 665 670
 Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
 675 680 685
 Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
 690 695 700
 Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Ala Asp Glu Phe
 705 710 715 720
 Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
 725 730 735
 Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
 740 745 750
 Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Lys Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
 755 760 765
 Leu Lys Val Lys Gly Lys Lys
 770 775

REIVINDICACIONES

1. Una ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada que comprende mutaciones de sustitución de aminoácidos en posiciones posicionalmente equivalentes a Leu408, Tyr409, Pro410 y Lys477 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N de tipo salvaje SEQ ID NO: 5, en donde las mutaciones por sustitución son homólogas a Leu408Ala, Tyr409Ala, Pro410Ile y Lys477Met, en donde la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa de arquea de la familia B alterada es al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 5 y, en uso, la ADN polimerasa de arqueas de la familia B exhibe actividad de polimerasa.
2. La ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada de la reivindicación 1, en donde la ADN polimerasa de arqueas de la familia B es de un género seleccionado del grupo que consiste en Thermococcus, Pyrococcus y Methanococcus.
3. La ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada de la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en polimerasa Vent, Deep Vent, 9°N y Pfu; y en donde preferiblemente la ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada es polimerasa 9°N.
4. La ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada de la reivindicación 1, en donde la ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada comprende, además, mutaciones por sustitución en posiciones posicionalmente equivalentes a Asp 141 y/o Glu143 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.
5. La ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada comprende, además, una mutación por sustitución en una posición posicionalmente equivalente a Ala485 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.
6. La ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada de la reivindicación 5, en donde dicha mutación por sustitución adicional es homóloga a Ala485Leu o Ala485Val.
7. La ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende, además, una mutación por sustitución a un aminoácido diferente en la posición posicionalmente equivalente a Cys223 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.
8. La ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada de la reivindicación 7, en donde dicha mutación por sustitución adicional en la posición posicionalmente equivalente a Cys223 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N es homóloga a Cys223Ser.
9. La ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende, además, una mutación por sustitución a un aminoácido diferente en la posición posicionalmente equivalente a Thr514 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.
10. La ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada de la reivindicación 9, en donde dicha mutación por sustitución adicional en la posición posicionalmente equivalente a Thr514 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N es homóloga a Thr514Ala o Thr514Ser.
11. La ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende, además, una mutación de sustitución a un aminoácido diferente en la posición posicionalmente equivalente a Ile521 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N.
12. La ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada de la reivindicación 11, en donde dicha mutación por sustitución adicional en la posición posicionalmente equivalente a Ile521 en la secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°N es homóloga a Ile521Leu.
13. Una ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-8, 10-12, 14-16, 18-20, 22-24 y 26-28, 30 y 32.
14. Una molécula de ácido nucleico que codifica una ADN polimerasa de arqueas de la familia B alterada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
15. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 14.
16. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 15.

FIG. 1

Pol1957	210	220	230	240	250	260	
9oN	LITVNGDN	FDFAYL	KRRSEELG	KIKET	...AVEV	KGR	
TGO	LITVNGDN	FDFAYL	KRRSEELG	KIKET	...AVEV	KGR	
KOD1	LITVNGDN	FDFAYL	KRRSEELG	KIKET	...AVEV	KGR	
Pfu	LITVNGDN	FDFAYL	KRRSEELG	KIKET	...AVEV	KGR	
Mm S2	LITVNGDN	FDFAYL	KRRSEELG	KIKET	...AVEV	KGR	
RB69	LITVNGDN	FDFAYL	KRRSEELG	KIKET	...AVEV	KGR	
Pol1957	270	280	290	300	310	320	330
9oN	NLPPTY	TLEAV	VEAVF	CKPK	KEKV	...YAE	EIAQ
TGO	NLPPTY	TLEAV	VEAVF	CKPK	KEKV	...YAE	EIAQ
KOD1	NLPPTY	TLEAV	VEAVF	CKPK	KEKV	...YAE	EIAQ
Pfu	NLPPTY	TLEAV	VEAVF	CKPK	KEKV	...YAE	EIAQ
Mm S2	NLPPTY	TLEAV	VEAVF	CKPK	KEKV	...YAE	EIAQ
RB69	NLPPTY	TLEAV	VEAVF	CKPK	KEKV	...YAE	EIAQ
Pol1957	340	350	360	370	380	390	
9oN	QLSRLI	QSSLD	VSRS	STGN	LV	EM	FL
TGO	QLSRLI	QSSLD	VSRS	STGN	LV	EM	FL
KOD1	QLSRLI	QSSLD	VSRS	STGN	LV	EM	FL
Pfu	QLSRLI	QSSLD	VSRS	STGN	LV	EM	FL
Mm S2	QLSRLI	QSSLD	VSRS	STGN	LV	EM	FL
RB69	QLSRLI	QSSLD	VSRS	STGN	LV	EM	FL
Pol1957	400	410	420	430	440		
9oN	WDNI	VVLD	FRS	AAI	IS	II	ITH
TGO	WDNI	VVLD	FRS	AAI	IS	II	ITH
KOD1	WDNI	VVLD	FRS	AAI	IS	II	ITH
Pfu	WDNI	VVLD	FRS	AAI	IS	II	ITH
Mm S2	WDNI	VVLD	FRS	AAI	IS	II	ITH
RB69	WDNI	VVLD	FRS	AAI	IS	II	ITH

FIG. 1 (continúa)

		450	460	470	
Pol1957		FIPSLG	LLERQKI	KRMKATVD	
9oN		FIPSLG	LLERQKI	KRMKATVD	
TGO		FIPSLG	LLERQKI	KRMKATVD	
KOD1		FIPSLG	LLERQKI	KRMKATVD	
Pfu		FIPSLG	LLERQKI	KRMKATVD	
Mm S2		IIPKTL	MLINRRKKV	KVLRKAKEGEF	
RB69		VVPTEIT	VFNQRKEH	KGYMLAAQRNGEI	KEALHNPNSVDEPLVDYRFDSDEIKKLSAKSLN
		480	490	500	510
Pol1957		PLEKKL	DYRCRAIKILANS	FYGYGYAKARMYCKE	AESVSAN
9oN		PLEKKL	DYRCRAIKILANS	FYGYGYAKARMYCKE	AESVSAN
TGO		PLEKKL	DYRCRAIKILANS	FYGYGYAKARMYCKE	AESVSAN
KOD1		PLEKKL	DYRCRAIKILANS	FYGYGYAKARMYCKE	AESVSAN
Pfu		PIERKL	DYRCRAIKILANS	FYGYGYAKARMYCKE	AESVSAN
Mm S2		PIERKL	DYRCRAIKILANS	FYGYGYAKARMYCKE	AESVSAN
RB69		DEEYQI	TYEGRSIRKILANS	FYGYGYAKARMYCKE	AESVSAN
		EMLFRAQR	TEVAGMTACINRKL	INSIYGALGNVWFERYDLRNATAITTFQ	QMALQWIERKVNNEYLNEVC
		540	550	560	570
Pol1957		FKVLYADTDG	LHATIPGAD	AEIVKK	KAKEFLKYINIKLP
9oN		FKVLYADTDG	LHATIPGAD	AEIVKK	KAKEFLKYINIKLP
TGO		FKVLYADTDG	LHATIPGAD	AEIVKK	KAKEFLKYINIKLP
KOD1		FKVLYADTDG	LHATIPGAD	AEIVKK	KAKEFLKYINIKLP
Pfu		FKVLYADTDG	LHATIPGAD	AEIVKK	KAKEFLKYINIKLP
Mm S2		FKVLYADTDG	LHATIPGAD	AEIVKK	KAKEFLKYINIKLP
RB69		GTEGEAFVLYG	DTDSIYVSA	DKIIDKVGESKFRDTNEMVD	FLCK
		580	590	600	610
Pol1957		GLELEYEGFYV	RGFFVT	KKKYAVIDE	EGKITTRGLEIVRRD
9oN		GLELEYEGFYV	RGFFVT	KKKYAVIDE	EGKITTRGLEIVRRD
TGO		GLELEYEGFYV	RGFFVT	KKKYAVIDE	EGKITTRGLEIVRRD
KOD1		GLELEYEGFYV	RGFFVT	KKKYAVIDE	EGKITTRGLEIVRRD
Pfu		GLELEYEGFYV	RGFFVT	KKKYAVIDE	EGKITTRGLEIVRRD
Mm S2		GLELEYEGFYV	RGFFVT	KKKYAVIDE	EGKITTRGLEIVRRD
RB69		CEYMNKNQ	HLMFMDREAIAC	PTLCSKCI	GGENTGKKRYALNVWDMECTRYAEPK

FIG. 1 (continúa)

	620	630	640	650	660	670	
Pol1957	AKETQARVLEAAILKHGDVEE	AVRIVKEVTEKLS	KYEVPP	EKLVIH	QITRDLRDYKAT	GP	
9oN	AKETQARVLEAAILKHGDVEE	AVRIVKEVTEKLS	KYEVPP	EKLVIH	QITRDLRDYKAT	GP	
TGO	AKETQARVLEAAILKHGDVEE	AVRIVKEVTEKLS	KYEVPP	EKLVIH	QITRDLKDYKAT	GP	
KOD1	AKETQARVLEAAILKHGDVEE	AVRIVKEVTEKLS	KYEVPP	EKLVIH	QITRDLKDYKAT	GP	
Pfu	AKETQARVLEAAILKHGDVEE	AVRIVKEVTEKLS	KYEVPP	EKLVIH	QITRDLKDYKAT	GP	
Mm S2	SKNTQKNVLEAAILKHGDVEE	AVRIVKEVTEKLS	KYEVPP	EKLVIH	QITRDLKDYKAT	GP	
RB69	VQKALKECIRRMLEGEES	Q	EYFKEFEKEFRQ	..LNYISIASVS	SANNIAKYDVGGF	PGPKCFHIRG	
	680	690	700	710	720	730	
Pol1957	HVAVAKRLAARGVKIR	PGT	VISYIVLKGSGRIG	...DRAIPAD	EFDPTKHRY	DAEYIENQVL	
9oN	HVAVAKRLAARGVKIR	PGT	VISYIVLKGSGRIG	...DRAIPAD	EFDPTKHRY	DAEYIENQVL	
TGO	HVAVAKRLAARGVKIR	PGT	VISYIVLKGSGRIG	...DRAIPAD	EFDPTKHRY	DAEYIENQVL	
KOD1	HVAVAKRLAARGVKIR	PGT	VISYIVLKGSGRIG	...DRAIPAD	EFDPTKHRY	DAEYIENQVL	
Pfu	HVAVAKRLAARGVKIR	PGT	VISYIVLKGSGRIG	...DRAIPAD	EFDPTKHRY	DAEYIENQVL	
Mm S2	HVEVAKKILKSGNRVN	TGD	VISYIITSGNKSIS	...ERA	...EILENAKNY	DTNYYIENQIL	
RB69	ILTYNRAIKGNIDAPQ	VVEGEKVYVLP	LREGNPF	GDCKCIAWPSCT	TEITDLIKDDV	LHWN	DYTVLLEKTFI
	740	750	760	770			
Pol1957	PAVERILKAFGYRKE	DLRYQKT	KQVGLGAWLKVKGKK	...			
9oN	PAVERILKAFGYRKE	DLRYQKT	KQVGLGAWLKVKGKK	...			
TGO	PAVERILKAFGYRKE	DLRYQKT	KQVGLGAWLKVKGKK	...			
KOD1	PAVERILKAFGYRKE	DLRYQKT	KQVGLGAWLKVKGKK	...			
Pfu	PAVERILKAFGYRKE	DLRYQKT	KQVGLGAWLKVKGKK	...			
Mm S2	PPVIRLMEALGITKDE	LKDSK	KQYTLHHFLK	...			
RB69	KPLEGFTSAKLDYKK	...	...	ASLFDMFD			

FIG. 1 (continúa)

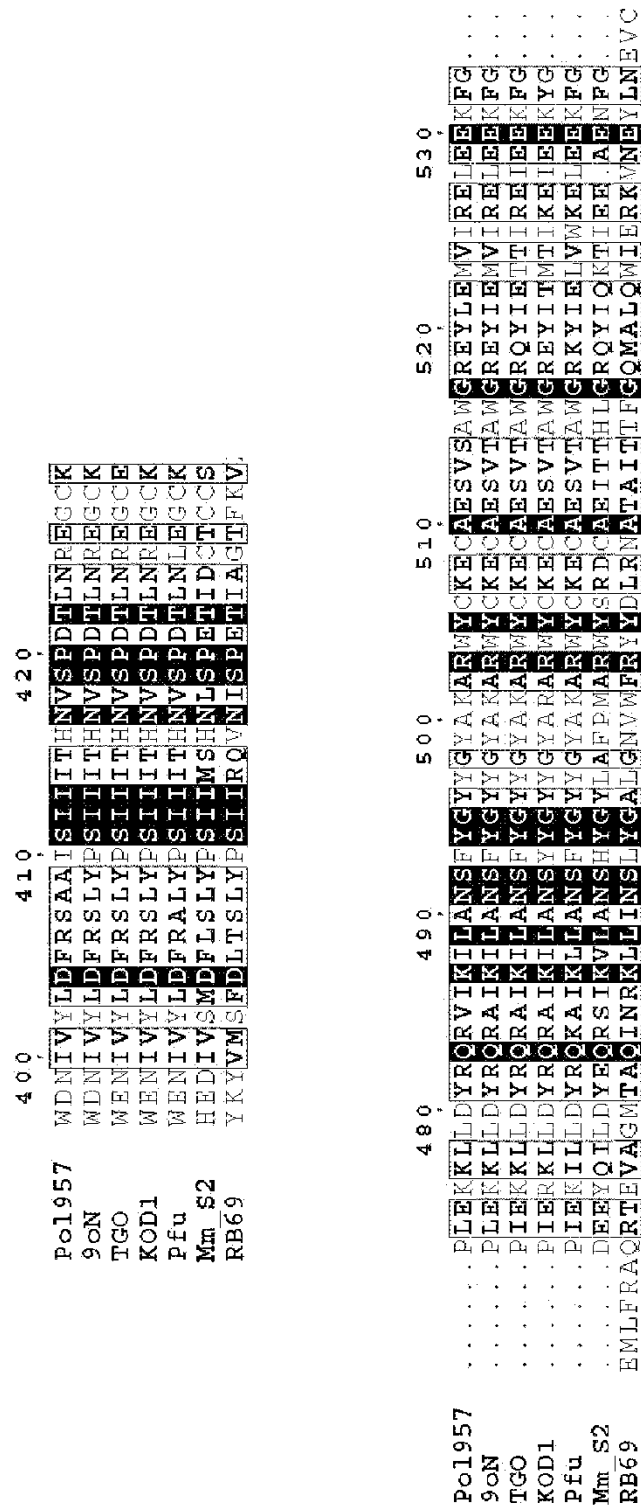


FIG. 2