

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 611 157**

(51) Int. Cl.:  
**C07K 14/00**  
(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2007 E 11189814 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2463297**

---

(54) Título: **Composiciones y métodos para la administración de oxígeno**

(30) Prioridad:

**22.05.2006 US 921505 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.05.2017**

(73) Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)  
1111 Franklin Street, 12th Floor  
Oakland, CA 94607, US**

(72) Inventor/es:

**CARY, STEPHEN P.L.;  
BOON, ELIZABETH M.;  
WEINERT, EMILY;  
WINGER, JONATHAN A. y  
MARLETTA, MICHAEL A.**

(74) Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 611 157 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

Composiciones y métodos para la administración de oxígeno

**5 Campo técnico**

La presente solicitud describe proteínas H-NOX y los métodos para usarlas para administrar oxígeno. Las proteínas H-NOX proporcionan una nueva herramienta terapéutica para administrar O<sub>2</sub> a seres humanos y, para fines veterinarios, a animales.

10

**10 Antecedentes de la invención**

El actual sistema de bancos de sangre tiene riesgos inherentes y graves limitaciones. Los errores de tipado de la sangre, inmunogenicidad, transmisión de agentes bacterianos e infecciones víricas tales como VIH-1 y hepatitis plantean peligros potencialmente mortales a los pacientes de transfusión. Además, la limitada disponibilidad de donantes, el requisito de tipos de sangre específicos, la corta estabilidad en almacén de glóbulos rojos y la necesidad de refrigeración limitan todos la accesibilidad de las transfusiones a pacientes. El desarrollo de un sucedáneo de la sangre estable podría eliminar los riesgos del actual sistema de bancos de sangre y aumentar la disponibilidad de transfusiones a pacientes en la mayoría de los entornos. Por tanto, la administración de oxígeno (O<sub>2</sub>) a órganos y tejidos para aliviar síntomas debidos a pérdida de sangre o hipoxia es un objetivo terapéutico importante.

Las terapias basadas en no hemoglobina han sido aprobadas para su uso en seres humanos en los EE.UU. Posibles terapias incluyen varios transportadores de O<sub>2</sub> artificiales (revisado por Spahn, D. R. et al. (2005). "Artificial O<sub>2</sub> carriers: status in 2005," Curr. Pharm. Des., 11(31):4099-4114), tal como hemoglobinas manipuladas (por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 6.022.849). Sin embargo, algunos posibles sucedáneos de la sangre, tales como sucedáneos de la sangre basados en hemoglobina, están limitados debido a su reactividad con óxido nítrico (NO). En particular, el NO actúa de mensajero químico en el control de muchos procesos importantes *in vivo*, que incluyen neurotransmisión, inflamación, agregación de plaquetas y regulación del tono de músculo liso gastrointestinal y vascular. El NO reacciona directamente con el O<sub>2</sub> que está unido a hemoglobina para formar metahemoglobina y nitrato. Tanto el hierro del hemo como el NO son oxidados por los átomos de oxígeno unidos, y la reacción se produce tan rápidamente que no se observa la sustitución de O<sub>2</sub> por NO (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.455.676).

35 Como el NO se produce y se consume continuamente, hay una renovación natural del NO *in vivo*. Cuando se administra hemoglobina sin células, el equilibrio entre la producción de NO y el consumo se altera mediante reacciones con hemoglobina sin células. La reacción oxidativa entre NO y O<sub>2</sub> unido a hemoglobina es irreversible, produciendo la destrucción de NO, O<sub>2</sub> y hemoglobina. La unión de NO a hemoglobina sin O<sub>2</sub> unido es eficazmente irreversible en escalas de tiempo fisiológicas ya que la semivida para la disociación de la nitrosilhemoglobina es 5-6 horas, inactivando así eficazmente la hemoglobina como transportador de O<sub>2</sub> sin células.

40 Una vez una molécula de NO reacciona con hemoglobina, se elimina del conjunto de moléculas señal, produciendo así ciertas condiciones adversas. Por ejemplo, la unión de NO a hemoglobina (con o sin O<sub>2</sub> unido) puede prevenir relajación vascular y posiblemente conduce a hipertensión, que se observa algunas veces después de la administración de ciertas soluciones de hemoglobina extracelular.

45 El NO también se necesita para mediar en ciertas respuestas inflamatorias. Por ejemplo, el NO producido por el endotelio inhibe la agregación de plaquetas. Por consiguiente, como el NO se une por hemoglobina sin células (con o sin O<sub>2</sub> unido), la agregación de plaquetas puede aumentar. A medida que se agregan las plaquetas, liberan 50 potentes compuestos vasoconstrictores tales como tromboxano A<sub>2</sub> y serotonina. Estos compuestos pueden actuar sinérgicamente con los niveles de NO reducidos producidos por la captación de hemoglobina para producir vasoconstricción significativa. Además de inhibir la agregación de plaquetas, el NO también inhibe la unión de neutrófilos a paredes celulares, que a su vez puede conducir a lesión de la pared celular. La lesión de la pared de células endoteliales se ha observado con la infusión de ciertas soluciones de hemoglobina.

55 Otro inconveniente importante de los sucedáneos de la sangre basados en hemoglobina es su alta afinidad por O<sub>2</sub>. Esta alta afinidad limita la capacidad de la hemoglobina para liberar oxígeno a una velocidad clínicamente útil en localizaciones deseadas (tal como tejidos periféricos). Alternativamente, la liberación de O<sub>2</sub> por sucedáneos de la sangre basados en hemoglobina de menor afinidad en arterias antes de alcanzar los lechos microvasculares puede producir vasoconstricción debido a una respuesta vasoconstrictora hiperóxica (hipótesis de Winslow). Adicionalmente, los sucedáneos de la sangre basados en hemoglobina son evitados por la rápida eliminación de hemoglobina sin células del plasma debido a la presencia de receptores para hemoglobina que eliminan la hemoglobina sin células del plasma. La hemoglobina sin células también puede producir toxicidad renal, posiblemente debido al agotamiento del NO en los glomérulos, causando constricción y posterior disfunción.

60

Debido a las limitaciones de los actuales sucedáneos de la sangre y la escasez crónica de sangre donada, sigue existiendo un nivel significativo de interés en y necesidad de terapias adicionales o alternativas para administrar oxígeno. En particular se desean sucedáneos de la sangre con una menor reactividad del NO y/o un tiempo de retención en plasma prolongado. También se necesitan transportadores de oxígeno con constantes de disociación

5 para la unión a O<sub>2</sub> que sean apropiados para aplicaciones clínicas o industriales particulares. Una aplicación industrial a modo de ejemplo para la que son deseables transportadores de O<sub>2</sub> incluye el crecimiento de células en cultivo, que está frecuentemente limitado por la cantidad de O<sub>2</sub> que llega a las células.

10 El documento WO 02/02757 divulga adenilil y guanilil ciclasas (ADGUC) humanas y métodos para el diagnóstico, tratamiento o prevención de trastornos asociados a la expresión anómala de las ADGUC.

#### Breve resumen de la invención

15 La presente invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que las proteínas H-NOX naturales y mutantes tienen una reactividad del NO mucho menor que la hemoglobina y, por tanto, son transportadores de O<sub>2</sub> deseables. Si se desea, las mutaciones pueden introducirse en proteínas H-NOX para alterar su unión de O<sub>2</sub> y ligandos de NO para optimizar adicionalmente el uso de proteínas H-NOX como transportadores de O<sub>2</sub>.

20 La invención proporciona una composición farmacéutica adecuada para la administración de O<sub>2</sub> a seres humanos que comprende (i) una cantidad farmacéuticamente aceptable de una proteína H-NOX y (ii) un transportador farmacéuticamente aceptable, en la que, ya sea

25 (a) la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre 1 nM y 1 mM a 20 °C y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C, o

25 (b) la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está dentro de dos órdenes de magnitud de la de la hemoglobina alfa humana y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina alfa humana

30 y en la que la proteína H-NOX comprende al menos una mutación en el bolsillo distal, siendo dicha mutación de un resto en la hélice alfa A, D, E o G  
y en la que la proteína H-NOX no es inmunogénica en seres humanos.

35 Por consiguiente, en algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína H-NOX aislada que tiene al menos una mutación que altera la constante de disociación del O<sub>2</sub> o reactividad del NO en comparación con la de una proteína H-NOX natural correspondiente. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante está dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 2 nM y aproximadamente 50 μM a 20 °C, aproximadamente 50 nM y aproximadamente 10 μM a 20 °C, aproximadamente 20 nM y aproximadamente 2 μM a 20 °C, aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1,9 μM a 20 °C, aproximadamente 150 nM y aproximadamente 1 μM a 20 °C, o aproximadamente 100 nM y aproximadamente 255 nM a 20 °C. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 80 nM a 20 °C, tal como entre aproximadamente 20 nM y aproximadamente 75 nM a 20 °C. En algunas realizaciones, la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es al menos 100 veces menor que la de la hemoglobina, tal como al menos 1.000 veces menor que la de la hemoglobina. En algunas realizaciones, la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C, tal como inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 400 s<sup>-1</sup>, 300 s<sup>-1</sup>, 200 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 75 s<sup>-1</sup>, 50 s<sup>-1</sup>, 25 s<sup>-1</sup> 20 s<sup>-1</sup>, 10 s<sup>-1</sup>, 50 s<sup>-1</sup>, 3 s<sup>-1</sup>, 2 s<sup>-1</sup>, 1,8 s<sup>-1</sup>, 1,5 s<sup>-1</sup>, 1,2 s<sup>-1</sup>, 1,0 s<sup>-1</sup>, 0,8 s<sup>-1</sup>, 0,7 s<sup>-1</sup> o 0,6 s<sup>-1</sup> a 20 °C. En algunas realizaciones, la k<sub>dis</sub> para el oxígeno de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 200 s<sup>-1</sup> a 20 °C, tal como aproximadamente 1,0 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 16,0 s<sup>-1</sup>. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1,9 μM a 20 °C, y la k<sub>dis</sub> para el oxígeno de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 1,35 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 14,5 s<sup>-1</sup> a 20 °C. En algunas realizaciones, la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C. En algunas realizaciones, la k<sub>dis</sub> para el oxígeno de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 1,35 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 14,5 s<sup>-1</sup> a 20 °C, y la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C. En algunas realizaciones, la k<sub>dis</sub> para el oxígeno de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 1,35 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 14,5 s<sup>-1</sup> a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones, la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C).

En algunas realizaciones, la invención presenta una composición farmacéutica que comprende una proteína H-NOX aislada que tiene al menos una mutación que altera la  $k_{dis}$  para el oxígeno o reactividad del NO en comparación con la de una proteína H-NOX natural correspondiente. En algunas realizaciones, la  $k_{dis}$  para el oxígeno de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 200 s<sup>-1</sup> a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX mutante tiene una  $k_{dis}$  para el oxígeno que es inferior a o igual a aproximadamente 0,65 s<sup>-1</sup> a 20 °C (tal como entre aproximadamente 0,21 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 0,65 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones, la proteína H-NOX mutante se deriva de una proteína de *T. tengcongensis* y tiene  $k_{dis}$  para el oxígeno entre aproximadamente 1,35 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 18 s<sup>-1</sup> a 20 °C. En algunas realizaciones, la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es al menos 100 veces menor que la de la hemoglobina, tal como al menos 1.000 veces menor que la de la hemoglobina. En algunas realizaciones, la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C, tal como inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 400 s<sup>-1</sup>, 300 s<sup>-1</sup>, 200 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 75 s<sup>-1</sup>, 50 s<sup>-1</sup>, 25 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup>, 10 s<sup>-1</sup>, 50 s<sup>-1</sup>, 3 s<sup>-1</sup>, 2 s<sup>-1</sup>, 1,8 s<sup>-1</sup>, 1,5 s<sup>-1</sup>, 1,2 s<sup>-1</sup>, 1,0 s<sup>-1</sup>, 0,8 s<sup>-1</sup>, 0,7 s<sup>-1</sup> o 0,6 s<sup>-1</sup> a 20 °C. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 1 mM a 20 °C, entre aproximadamente 2 nM y aproximadamente 50 μM a 20 °C, entre aproximadamente 50 nM y aproximadamente 10 μM a 20 °C, o entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1,9 μM a 20 °C. En algunas realizaciones, la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1,9 μM a 20 °C y la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1,9 μM a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones, la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C y la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C).

En diversas realizaciones, la invención presenta una composición farmacéutica que comprende una proteína H-NOX aislada que tiene al menos una mutación que altera la constante de disociación del O<sub>2</sub> o reactividad del NO en comparación con la de una proteína H-NOX natural correspondiente. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante está dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 255 nM a 20 °C. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante es inferior a 80 nM a 20 °C, tal como entre aproximadamente 20 nM y aproximadamente 75 nM a 20 °C. En algunas realizaciones, la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es al menos 100 veces menor que la de la hemoglobina, tal como al menos 1.000 veces menor que la de la hemoglobina. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX mutante tiene una  $k_{dis}$  para el oxígeno que es inferior a o igual a aproximadamente 0,65 s<sup>-1</sup> a 20 °C (tal como entre aproximadamente 0,21 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 0,65 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones, la  $k_{dis}$  para el oxígeno de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 1,35 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 2,9 s<sup>-1</sup> a 20 °C. En algunas realizaciones, la  $k_{dis}$  para el oxígeno de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 5,8 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 19 s<sup>-1</sup> a 20 °C. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX mutante es estable a 4 °C en aire.

En algunas realizaciones, la invención presenta una composición farmacéutica que comprende una proteína H-NOX aislada que tiene al menos una mutación que altera la  $k_{dis}$  para el oxígeno o reactividad del NO en comparación con la de una proteína H-NOX natural correspondiente. En algunas realizaciones, la  $k_{dis}$  para el oxígeno de la proteína H-NOX mutante es inferior a o igual a aproximadamente 0,65 s<sup>-1</sup> a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina. En algunas realizaciones, la  $k_{dis}$  para el oxígeno de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 0,21 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 0,65 s<sup>-1</sup> a 20 °C. En algunas realizaciones, la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es al menos 100 veces menor que la de la hemoglobina, tal como al menos 1.000 veces menor que la de la hemoglobina. En algunas realizaciones, la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C, tal como inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 400 s<sup>-1</sup>, 300 s<sup>-1</sup>, 200 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 75 s<sup>-1</sup>, 50 s<sup>-1</sup>, 25 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup>, 10 s<sup>-1</sup>, 50 s<sup>-1</sup>, 3 s<sup>-1</sup>, 2 s<sup>-1</sup>, 1,8 s<sup>-1</sup>, 1,5 s<sup>-1</sup>, 1,2 s<sup>-1</sup>, 1,0 s<sup>-1</sup>, 0,8 s<sup>-1</sup>, 0,7 s<sup>-1</sup> o 0,6 s<sup>-1</sup> a 20 °C. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1,9 μM a 20 °C. En algunas realizaciones, la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1,9 μM a 20 °C y la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX mutante está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1,9 μM a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup>, 1,8 s<sup>-1</sup> o 0,7 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones, la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX mutante es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX mutante es inferior a

aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup>, 1,8 s<sup>-1</sup> o 0,7 a 20 °C).

En diversas realizaciones, la invención presenta una composición farmacéutica que comprende una proteína H-NOX aisladamente seleccionada del grupo que consiste en H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOXN74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, L2F9W-F142Y, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β1(1-385), β1(1-385) I145Y, β1(1-385) I145H, β1(1-194), β1(1-194) I145Y, β1(1-194) L9W-I145Y, β2(1-217), β2(1-217) I142Y, H-NOX(1-175) de *C. botulinum*, H-NOX(1-186) de *C. botulinum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum* y H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*. En algunas realizaciones, la proteína β1 o β2 se deriva de una proteína β1 o β2 de *R. norvegicus* u *H. sapiens*.

En diversas realizaciones, la invención presenta una composición farmacéutica que comprende una proteína H-NOX aisladamente seleccionada del grupo que consiste en H-NOX 15A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L, β1(1-385) I145H, β1(1-194), β1(1-194) I145Y, β1(1-194) L9W-I145Y, β2(1-217), β2(1-217) I142Y de *D. desulfuricans*, H-NOX(1-175) de *C. botulinum*, H-NOX(1-186) de *C. botulinum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum* y H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*. En algunas realizaciones, la proteína β1 o β2 se deriva de una proteína β1 o β2 de *R. norvegicus* u *H. sapiens*.

En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*, tal como una constante de disociación del O<sub>2</sub> entre 0,1 y 10 veces o entre 0,5 y 2 veces la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. En algunas realizaciones, la reactividad del NO de la proteína H-NOX es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*, tal como al menos 100 veces o 1.000 veces menor que la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX contiene una o más mutaciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones) en comparación con la proteína H-NOX de la que se derivó. En diversas realizaciones, la proteína H-NOX contiene menos de 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 mutaciones en comparación con la proteína H-NOX de la que se derivó. En algunas realizaciones de las proteínas H-NOX aisladas, la proteína H-NOX tiene al menos una mutación en el bolsillo distal. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene al menos una mutación que no está en el bolsillo distal. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene al menos una mutación en la que un resto que se corresponde con Ile5, Trp9, Asn74, Pro115 o Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* o I145 de β1(1-385) está sustituido con cualquier otro aminoácido. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene al menos dos mutaciones, en la que al menos una mutación es la sustitución de un resto que se corresponde con Ile5, Trp9, Asn74, Pro115 o Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* o I145 de β1(1-385) con cualquier otro aminoácido. En algunas realizaciones, la mutación en la proteína H-NOX se corresponde con una mutación I5A, una mutación I5L, una mutación W9F, una mutación Y140F, una mutación Y140H, una mutación doble W9F Y140H, o una mutación doble F78Y Y140F de *T. tengcongensis* o una mutación I145Y de β1. En algunas realizaciones, la mutación en la proteína H-NOX se corresponde con una mutación W9Y, una mutación W9H, una mutación W9N, una mutación N74H, una mutación N74E, una mutación N74A, una mutación P115A, una mutación R135Q, un mutante doble I5L P115A, un mutante doble N74A Y140H, o un doble W9F N74A de *T. tengcongensis*. En algunas realizaciones, al menos un aminoácido del extremo C (tal como al menos aproximadamente 50 aminoácidos del extremo C contiguos o entre aproximadamente 25 y aproximadamente 200 aminoácidos del extremo C contiguos) en la proteína H-NOX ha sido eliminado en comparación con la proteína natural correspondiente.

En algunas realizaciones, la proteína H-NOX se deriva de una proteína de mamífero (por ejemplo, una proteína humana tal como β1). En diversas realizaciones, la proteína H-NOX se derivó de una proteína bacteriana (por ejemplo, una proteína de *T. tengcongensis*). En algunas realizaciones, la proteína H-NOX está covalentemente unida a otra molécula o fracción, tal como polietilenglicol. El hemo puede o puede no unirse a la proteína H-NOX. En algunas realizaciones, el oxígeno está unido a la proteína H-NOX. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX es una proteína de fusión que incluye un dominio de H-NOX y parte o toda de otra proteína, tal como albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano).

En algunas realizaciones la proteína H-NOX no es H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX de *T. tengcongensis* natural, o 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX no es  $\beta$ 2(1-217) de *R. norvegicus*,  $\beta$ 1(1-194) de *R. norvegicus*,  $\beta$ 1(1-385) de *R. norvegicus* o  $\beta$ 1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX no es H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, o  $\beta$ 1 H-NOX (1-385) I145Y de *H. sapiens*. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX no es H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*,  $\beta$ 1 I140Y de *H. sapiens* o  $\beta$ 1 I145Y de *H. sapiens*. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX no es H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX de *L. pneumophila* natural,  $\beta$ 1 H-NOX I140Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 H-NOX de *H. sapiens* natural, sGC  $\beta$ 1 H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX I145Y de *R. norvegicus*,  $\beta$ 1 H-NOX de *R. norvegicus* natural,  $\beta$ 1 H-NOX de *D. melanogaster* natural, CG14885-PA H-NOX de *D. melanogaster* natural, GCY-35 H-NOX de *C. elegans* natural, H-NOX de *N. punctiforme* natural, H-NOX de *C. crescentus* natural, H-NOX de *S. oneidensis* natural o H-NOX de *C. acetobutylicum* natural. En algunas realizaciones la proteína H-NOX no es H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX de *T. tengcongensis* natural, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 2 H-NOX de *L. pneumophila* natural,  $\beta$ 1 H-NOX I140Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I145Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 H-NOX de *H. sapiens* natural, sGC  $\beta$ 1 H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX I145Y de *R. norvegicus*,  $\beta$ 1 H-NOX de *R. norvegicus* natural,  $\beta$ 1 H-NOX de *D. melanogaster* natural, CG14885-PA H-NOX de *D. melanogaster* natural, GCY-35 H-NOX de *C. elegans* natural, H-NOX de *N. punctiforme* natural, H-NOX de *C. crescentus* natural, H-NOX de *S. oneidensis* natural o H-NOX de *C. acetobutylicum* natural. En algunas realizaciones la proteína H-NOX no es H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX de *T. tengcongensis* natural, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 2 H-NOX de *L. pneumophila* natural,  $\beta$ 1 H-NOX I140Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I145Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 H-NOX de *H. sapiens* natural, sGC  $\beta$ 1 H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX I145Y de *R. norvegicus*,  $\beta$ 1 H-NOX de *R. norvegicus* natural,  $\beta$ 1 H-NOX de *D. melanogaster* natural, CG14885-PA H-NOX de *D. melanogaster* natural, GCY-35 H-NOX de *C. elegans* natural, H-NOX de *N. punctiforme* natural, H-NOX de *C. crescentus* natural, H-NOX de *S. oneidensis* natural o H-NOX de *C. acetobutylicum* natural. En algunas realizaciones la proteína H-NOX no es H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX de *T. tengcongensis* natural, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 2 H-NOX de *L. pneumophila* natural,  $\beta$ 1 H-NOX I140Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I145Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 H-NOX de *H. sapiens* natural, sGC  $\beta$ 1 H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX I145Y de *R. norvegicus*,  $\beta$ 1 H-NOX de *R. norvegicus* natural,  $\beta$ 1 H-NOX de *D. melanogaster* natural, CG14885-PA H-NOX de *D. melanogaster* natural, GCY-35 H-NOX de *C. elegans* natural, H-NOX de *N. punctiforme* natural, H-NOX de *C. crescentus* natural, H-NOX de *S. oneidensis* natural o H-NOX de *C. acetobutylicum* natural. En algunas realizaciones la proteína H-NOX no es ninguna de las siguientes proteínas H-NOX que se enumeran por su nombre de gen, seguido de su abreviatura de especie e identificadores de Genbank (tal como las siguientes secuencias de proteínas disponibles a partir de 21 de mayo de 2006; 22 de mayo de 2006; 21 de mayo de 2007; o 22 de mayo de 2007): Npu5905\_Npu\_23129606, alr2278\_Ana\_17229770, SO2144\_Sone\_24373702, Mdeg1343\_Mde\_23027521, VCA0720\_Vch\_15601476, CC2992\_Ccr\_16127222, Rspb2043\_Rhsp\_22958463 (gi:46192757), Mmc10739\_Mcsp\_22999020, Tar4\_Tte\_20807169, Ddes2822\_Dde\_23475919, CAC3243\_Cac\_15896488, gcy-31\_Ce\_17568389, CG14885\_Dm\_24647455, GUCY1B3\_Hs\_4504215, HpGCS-betal\_Hpul\_14245738, Gycbeta100B\_Dm\_24651577, CG4154\_Dm\_24646993 (gi:NP\_650424.2, gi:62484298), gcy-32\_Ce\_13539160, gcy-36\_Ce\_17568391 (gi:32566352, gi:86564713), gcy-35\_Ce\_17507861 (gi:71990146), gcy-37\_Ce\_17540904 (gi:71985505), GCY1 $\alpha$ 3\_Hs\_20535603, GCY1 $\alpha$ 2-Hs\_899477 o GYC $\alpha$ -99B Dm\_729270 (gi:68067738) (Lakshminarayana et al. (2003). "Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins", BMG Genomics 4:5-13). Las abreviaturas de especies usadas en estos nombres incluyen Ana - *Anabaena Sp*; Ccr - *Caulobacter crescentus*; Cac - *Clostridium acetobutylicum*; Dde - *Desulfovibrio desulfuricans*; Mcsp - *Magnetococcus sp.*; Mde - *Microbulbifer degradans*; Npu - *Nostoc punctiforme*; Rhsp - *Rhodobacter sphaeroides*; Sone - *Shewanella oneidensis*; Tte - *Thermoanaerobacter tengcongensis*; Vch - *Vibrio cholerae*; Ce - *Caenorhabditis elegans*; Dm - *Drosophila melanogaster*; Hpul - *Hemicentrotus pulcherrimus*; Hs - *Homo sapiens*. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX no es ninguna de las siguientes proteínas H-NOX que se enumeran por su nombre de organismo y número de acceso de la base de datos Pfam (tal como las siguientes secuencias de proteínas disponibles a partir de 21 de mayo de 2006; 22 de mayo de 2006; 17 de mayo de 2007; 21 de mayo de 2007; o 22 de mayo de 2007): Q622M5\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61P44\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61R54\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61V90\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61A94\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q60TP4\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q60M10\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, GCY37\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY31\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY36\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY32\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY35\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY34\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY33\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, Q7T040\_ORYCU de *Oryzias curvinotus*, Q75WFO\_ORYCU de *Oryzias curvinotus*, P79998\_ORYLA de *Oryzias latipes*, Q7ZS25\_ORYLA de *Oryzias latipes*, Q4SW38\_TETNG de *Tetraodon nigroviridis*, Q4RZ94\_TETNG de *Tetraodon nigroviridis*, Q4S6K5\_TETNG de *Tetraodon nigroviridis*, Q90VY5\_FUGRU de *Fugu rubripes*, Q6INK9\_XENLA de *Xenopus laevis*, Q5T8J7\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYA2\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYB2\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYB1\_HUMAN de *Homo sapiens*, Q9N193\_9PRIM de *Gorilla*, Q5RAN8\_PONPY de *Pongo pygmaeus*, Q9N192\_PANTR de *Pan troglodytes*, Q9N194\_MACMU de *Macaca mulatta*, Q9N191\_HYLLA de *Hylobates lar*, Q8BXH3\_MOUSE de *Mus musculus*, GCYB1\_MOUSE de *Mus musculus*, Q3UT14\_MOUSE de *Mus musculus*, Q3UH83\_MOUSE de *Mus musculus*, Q6XE41\_MOUSE de *Mus musculus*, Q80YP4\_MOUSE de *Mus musculus*, Q80WX7\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WX8\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q920Q1\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q54A43\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY0\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY4\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q8CH85\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY5\_RAT de *Rattus norvegicus*, GCYB1\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q8CH90\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q91XJ7\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WX9\_RAT de *Rattus norvegicus*, GCYB2\_RAT de *Rattus norvegicus*, GCYA2\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q4ZHR9\_CANFA de *Canis familiaris*, GCYB1\_BOVIN de *Bos taurus*, Q4ZHR7\_PIG de *Sus scrofa*, Q59HN5\_GRYBI de *Gryllus bimaculatus*, O77106\_MANSE de *Manduca sexta*, O76340\_MANSE de *Manduca sexta*, Q5UAFO\_APIME de *Apis mellifera*, Q5FAN0\_APIME de *Apis mellifera*, Q6L5L6\_APIME de *Apis mellifera*, PEST Q7PYK9\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7Q9W6\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7PFY2\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7PS01\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7QF31\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, Q7KQ93\_ANOGA de *Anopheles gambiae*, Q24086\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYH\_DROME de

5 *Drosophila melanogaster*, GCY8E\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYDA\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYDB\_DROME de *Drosophila melanogaster*, Q9VA09\_DROME de *Drosophila melanogaster*, Q29CE1\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q296C7\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q296C8\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q29BU7\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q7YWK7\_APLCA de *Aplysia californica*, Q95NK5\_HEMPU de *Hemicentrotus pulcherrimus*, Q5YLC2\_CHLRE de *Chlamydomonas reinhardtii*, Q8YUQ7\_ANASP de *Anabaena sp*, BBFL7 Q26GR8\_9BACT de *Flavobacteria bacterium*, ATCC 700755 Q1VQE5\_9FLAO de *Psychroflexus torquis*, HTCC2207 Q1YPJ5\_9GAMM de proteobacteria gamma marina, HTCC2207 Q1YTK4\_9GAMM de proteobacteria gamma marina, Q9A451\_CAUCR de *Caulobacter crescentus*, JF-5 Q2DG60\_ACICY de *Acidiphilum cryptum*, Q3JOU9\_RHOS4 de *Rhodobacter sphaeroides*, Q5LPV1\_SILPO de *Silicibacter pomeroyi*, PD1222, Q3PC67\_PARDE de *Paracoccus denitrificans*, TM1040 Q3QNY2\_9RHOB de *Silicibacter sp*, Q28ML8\_JANSC de *Jannaschia sp*, MC-1 Q3XT27\_9PROT de *Magnetococcus sp*, Q5WXPO\_LEGPL de *Legionella pneumophila*, Q5WTZ5\_LEGPL de *Legionella pneumophila*, Q5X268\_LEGPA de *Legionella pneumophila*, Q5X2R2\_LEGPA de *Legionella pneumophila*, Q5ZWM9\_LEGPH de *Legionella pneumophila* subsp *pneumophila*, Q5ZSQ8\_LEGPH de *Legionella pneumophila* subsp *pneumophila*, Q47Y43\_COLP3 de *Colwellia psychrerythraea*, T6c Q3CSZ5\_ALTAT de *Pseudoalteromonas atlantica*, Q8EF49\_SHÉON de *Shewanella oneidensis*, Q21E20\_SACD2 de *Saccharofagus degradans*, Q21ER7\_SACD2 de *Saccharofagus degradans*, S 14 Q1ZWE5\_9VIBR de *Vibrio angustum*, Q8DAE2\_VIBVU de *Vibrio vulnificus*, 12G01 Q1VCP6\_VIBAL de *Vibrio alginolyticus*, DAT722 Q2FA22\_9VIBR de *Vibrio sp*, Q87NJ1\_VIBPA de *Vibrio parahaemolyticus*, Q5E1F5\_VIBF1 de *Vibrio fischeri*, Q7MJS8\_VIBVY de *Vibrio vulnificus*, SKA34 Q2C6Z5\_9GAMM de *Photobacterium sp*, Q2SFY7\_HAHCH de *Hahella chejuensis*, MED92 Q2BKV0\_9GAMM de *Oceanospirillum sp*, RED65 Q1N035\_9GAMM de *Oceanobacter sp*, Q310U7\_DESDG de *Desulfovibrio desulfuricans*, H 168 Q2AIW5\_9FIRM de *Halothermothrix orenii*, Q8RBX6\_THETN de *Thermoanaerobacter tengcongensis*, DSM 8903 Q2ZH17\_CALSA de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, Q97E73\_CLOAB de *Clostridium acetobutylicum*, QYMF Q3C763\_9CLOT de *Alkaliphilus metallireducens*, Q899J9\_CLOTE de *Clostridium tetani* y NCIMB 8052 Q2WVN\_CLOBE de *Clostridium beijerinckii*. En algunas realizaciones de las proteínas H-NOX aisladas, la proteína H-NOX no es sGC β1 H-NOX C78S de *R. norvegicus* o sGC β1 H-NOX C78E de *R. norvegicus*. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX no tiene una mutación en el motivo Y-S-R, que incluye Tyr135, Ser137 y Arg139 de H-NOX humana.

30 En el presente documento también se describe un ácido nucleico recombinante que codifica una cualquiera o más de las proteínas H-NOX mutantes descritas en el presente documento. En particular, el ácido nucleico puede incluir un segmento de o la secuencia de ácidos nucleicos entera de cualquiera de los ácidos nucleicos mostrados en las FIGS. 2-4D o 8A-8DD. El ácido nucleico puede codificar una proteína de fusión que incluye un dominio de H-NOX y parte o toda de otra proteína, tal como albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano). El ácido nucleico puede incluir al menos aproximadamente 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o más nucleótidos contiguos de un ácido nucleico de H-NOX y contiene una o más mutaciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones) en comparación con el ácido nucleico de H-NOX del que se derivó. El ácido nucleico de H-NOX mutante puede contener menos de aproximadamente cualquiera de 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 mutaciones en comparación con el ácido nucleico de H-NOX del que se derivó. También se describen variantes degeneradas de cualquier ácido nucleico que codifica una proteína H-NOX mutante.

40 45 También se describe un vector que incluye uno cualquiera o más de los ácidos nucleicos de H-NOX mutantes descritos en el presente documento. También se describe una célula que incluye uno cualquiera o más de los ácidos nucleicos de H-NOX mutantes descritos en el presente documento. La célula puede incluir cualquier vector descrito en el presente documento.

50 En el presente documento se describe un método de producción de una proteína H-NOX. Este método implica cultivar una célula que tiene un ácido nucleico que codifica una cualquiera o más de las proteínas H-NOX mutantes descritas en el presente documento en condiciones adecuadas para la producción de la proteína H-NOX mutante. También se describe la inclusión de la etapa de purificar la proteína H-NOX mutante.

55 La invención presenta composiciones farmacéuticas que incluyen una o más proteínas H-NOX, tales como cualquiera de las proteínas H-NOX naturales o mutantes descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica incluye una cantidad farmacéuticamente aceptable de una proteína H-NOX descrita en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 1 mM a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 20 nM y aproximadamente 2 μM a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones, la K<sub>dis</sub> para el oxígeno de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 1,0 s<sup>-1</sup> y 16,0 s<sup>-1</sup> a 20 °C. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 20 nM y aproximadamente 2 μM a 20 °C, y la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 20 nM y aproximadamente 2 μM a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones, la K<sub>dis</sub> para el oxígeno de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 1,0 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 16,0 s<sup>-1</sup> a 20 °C, y la velocidad de auto-oxidación del hemo de la

proteína X es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C. En algunas realizaciones, la  $k_{dis}$  para el oxígeno de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 1,0 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 16,0 s<sup>-1</sup> a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C).

- 5 En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que incluye una cantidad farmacéuticamente aceptable de una proteína H-NOX y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina. En algunas realizaciones, la  $k_{dis}$  para el oxígeno de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 200 s<sup>-1</sup> a 20 °C, en la que la reactividad del NO de la proteína H-NOX es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina.
- 10 En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*, tal como una constante de disociación del O<sub>2</sub> entre 0,1 y 10 veces o entre 0,5 y 2 veces la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la reactividad del NO de la proteína H-NOX es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*, tal como al menos 100 veces o 1.000 veces menor que la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX es una proteína natural. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX es una proteína mutante como se describe en el presente documento. En diversas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX tiene al menos una mutación que altera la constante de disociación del O<sub>2</sub>, la  $k_{dis}$  para oxígeno, la velocidad de auto-oxidación del hemo, la reactividad del NO, la estabilidad del NO o cualesquiera dos o más de las anteriores en comparación con la de una proteína natural correspondiente.
- 15 En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX es una seleccionada del grupo que consiste en H-NOX de *T. tengcongensis* natural, H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophilia*, 1 H-NOX de *L. pneumophilia* natural, 2 H-NOX de *L. pneumophilia* natural, 2 F9W-F142Y de *L. pneumophilia*, H-NOX de *D. desulfuricans* natural, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β1 H-NOX de *H. sapiens* natural, β1 I145Y de *H. sapiens*, β1(1-385) de *H. sapiens*, β1(1-385) I145Y de *H. sapiens*, β1(1-385) I145H de *H. sapiens*, β1(1-194) de *H. sapiens*, β1(1-194)I145Y de *H. sapiens*, β1(1-194) L9W-I145Y de *H. sapiens*, β2(1-217) de *H. sapiens*, β2(1-217) I142Y de *H. sapiens*, β1 H-NOX H105G de *H. sapiens*, β1 H-NOX H105F de *H. sapiens*, β1 H-NOX de *R. norvegicus* natural, β1(1-385) de *R. norvegicus*, β1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*, β1(1-385) I145H de *R. norvegicus*, β1(1-194) de *R. norvegicus*, β1(1-194) I145Y de *R. norvegicus*, β1(1-194) L9W-I145Y de *R. norvegicus*, β2(1-217) de *R. norvegicus*, β2(1-217) I142Y de *R. norvegicus*, β1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, β1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, H-NOX(1-175) de *C. botulinum*, H-NOX(1-186) de *C. botulinum*, H-NOX de *C. acetobutylicum* natural, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, GCY-35 H-NOX de *C. elegans* natural, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, β1 H-NOX de *D. melanogaster* natural, CG14885-PA de *D. melanogaster* natural, CG14886 de *D. melanogaster* natural, CG4154 de *D. melanogaster* natural; H-NOX de *N. punctiforme* natural, H-NOX de *C. crescentus* natural, H-NOX de *S. oneidensis* natural, H-NOX de *M. musculus* natural, H-NOX de *C. familiaris* natural, H-NOX de *B. taurus* natural, *R. norvegicus* natural; H-NOX de *X. laevis* natural, H-NOX de *O. latipes* natural, H-NOX de *O. curvinotus* natural, H-NOX de *F. rubripes* natural, H-NOX de *A. gambiae* natural, H-NOX de *M. sexta* natural; gcy-31 de *C. elegans* natural, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 de *C. elegans* natural, gcy-34 de *C. elegans* natural, gcy-35 de *C. elegans* natural, gcy-36 de *C. elegans* natural, gcy-37 de *C. elegans* natural; H-NOX de *V. cholera* natural, H-NOX de *V. fischeri* natural y H-NOX de *N. punctiforme* natural. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la composición farmacéutica incluye uno o más liposomas o nanopartículas que incluyen o encapsulan la proteína H-NOX.
- 55 En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX no es H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX no es H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX de *T. tengcongensis* natural o 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophilia*. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX no es β2(1-217) de *R. norvegicus*, β1(1-194) de *R. norvegicus*, β1(1-385) de *R. norvegicus* o β1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX no es H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis* o β1 H-NOX (1-385) I145Y de *H. sapiens*. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX no es H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, β1 I140Y de *H. sapiens* o β1 I145Y de *H. sapiens*. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX no es H-NOX Y140F

de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX de *L. pneumophila* natural,  $\beta 1$  H-NOX I140Y de *H. sapiens*,  $\beta 1$  H-NOX de *H. sapiens* natural, sGC  $\beta 1$  H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC  $\beta 1$  H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC  $\beta 1$  H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC  $\beta 1$  H-NOX H105F de *R. norvegicus*, sGC  $\beta 1$  H-NOX I145Y de *R. norvegicus*,  $\beta 1$  H-NOX de *R. norvegicus* natural,  $\beta 1$  H-NOX de *D. melanogaster* natural, CG14885-PA H-NOX de *D. melanogaster* natural, GCY-35 H-NOX de *C. elegans* natural, H-NOX de *N. punctiforme* natural, H-NOX de *C. crescentus* natural, H-NOX de *S. oneidensis* natural o H-NOX de *C. acetobutylicum* natural. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX no es H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX de *T. tengcongensis* natural, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 2 H-NOX de *L. pneumophila* natural,  $\beta 1$  H-NOX I140Y de *H. sapiens*, B1 I145Y de *H. sapiens*,  $\beta 1$  H-NOX de *H. sapiens* natural, sGC  $\beta 1$  H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC  $\beta 1$  H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC  $\beta 1$  H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC  $\beta 1$  H-NOX H105F de *R. norvegicus*, sGC  $\beta 1$  H-NOX I145Y de *R. norvegicus*,  $\beta 1$  H-NOX de *R. norvegicus* natural,  $\beta 1$  H-NOX de *D. melanogaster* natural, CG14885-PA H-NOX de *D. melanogaster* natural, GCY-35 H-NOX de *C. elegans* natural, H-NOX de *N. punctiforme* natural, H-NOX de *C. crescentus* natural, H-NOX de *S. oneidensis* natural o H-NOX de *C. acetobutylicum* natural. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX no es ninguna de las siguientes proteínas H-NOX que se enumeran por su nombre de gen, seguido de su abreviatura de especie e identificadores de Genbank (tal como las siguientes secuencias de proteínas disponibles a partir de 21 de mayo de 2006; 22 de mayo de 2006; 21 de mayo de 2007; o 22 de mayo de 2007): Npu5905\_Npu\_23129606, alr2278\_Ana\_17229770, SO2144\_Sone\_24373702, Mdeg1343\_Mde\_23027521, VCA0720\_Vch\_15601476, CC2992\_Ccr\_16127222, Rspb2043\_Rhsp\_22958463 (gi:46192757), Mmc10739\_Mcsp\_22999020, Tar4\_Tte\_20807169, Ddes2822\_Dde\_23475919, CAC3243\_Cac\_15896488, gcy-31\_Ce\_17568389, CG14885\_Dm\_24647455, GUCY1B3\_Hs\_4504215, HpGCS-beta1\_Hpu1\_14245738, Gycbeta100B\_Dm\_24651577, CG4154\_Dm\_24646993 (gi:NP\_650424.2, gi:62484298), gcy-32\_Ce\_13539160, gcy-36\_Ce\_17568391 (gi:32566352, gi:86564713), gcy-35\_Ce-17507861 (gi:71990146), gcy-37\_Ce\_17540904 (gi:71985505), 25 GCY1a3\_Hs\_20535603, GCY1a2-Hs\_899477 o GYC $\alpha$ -99B\_Dm\_729270 (gi:68067738) (Lakshminarayan *et al.* (2003). "Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins", BMG Genomics 4:5-13). Las abreviaturas de especies usadas en estos nombres incluyen Ana - *Anabaena* Sp; Ccr - *Caulobacter crescents*; Cac - *Clostridium acetobutylicum*; Dde - *Desulfovibrio desulfuricans*; Mcsp - *Magnetococcus* sp.; Mde - *Microbulbifer degradans*; Npu - *Nostoc punctiforme*; Rhsp - *Rhodobacter sphaeroides*; Sone - *Shewanella oneidensis*; Tte - *Thermoanaerobacter tengcongensis*; Vch - *Vibrio cholerae*; Ce - *Caenorhabditis elegans*; Dm - *Drosophila melanogaster*; Hpu1 - *Hemicentrotus pulcherrimus*; Hs - *Homo sapiens*. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX no es sGC  $\beta 1$  H-NOX C78S de *R. norvegicus* o sGC  $\beta 1$  H-NOX C78E de *R. norvegicus*. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX no es ninguna de las siguientes proteínas H-NOX que se enumeran por su nombre de organismo y número de acceso de la base de datos Pfam (tal como las siguientes secuencias de proteínas disponibles a partir de 21 de mayo de 2006; 22 de mayo de 2006; 17 de mayo de 2007; 21 de mayo de 2007; o 22 de mayo de 2007): Q622M5\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61P44\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61R54\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61V90\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61A94\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q60TP4\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q60M10\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, GCY37\_CAEEL de 30 Caenorhabditis elegans, GCY31\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY36\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY32\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY35\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY34\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY33\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, Q7T040\_ORYCU de *Oryzias curvinotus*, Q75WF0\_ORYCU de *Oryzias curvinotus*, P79998\_ORYLA de *Oryzias latipes*, Q7ZSZ5\_ORYLA de *Oryzias latipes*, Q4SW38\_TETNG de *Tetraodon nigroviridis*, Q4RZ94\_TETNG de *Tetraodon nigroviridis*, Q4S6K5\_TETNG de 40 Tetraodon nigroviridis, Q90VY5\_FUGRU de *Fugu rubripes*, Q6INK9\_XENLA de *Xenopus laevis*, Q5T8J7\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYA2\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYB2\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYB1\_HUMAN de *Homo sapiens*, Q9N193\_9PRIM de *Gorilla*, Q5RAN8\_PONPY de *Pongo pygmaeus*, Q9N192\_PANTR de *Pan troglodytes*, Q9N194\_MACMU de *Macaca mulatta*, Q9N191\_HYLLA de *Hylobates lar*, Q8BXH3\_MOUSE de *Mus musculus*, GCYB1\_MOUSE de *Mus musculus*, Q3UTI4\_MOUSE de *Mus musculus*, Q3UH83\_MOUSE de *Mus musculus*, Q6XE41\_MOUSE de *Mus musculus*, Q80YP4\_MOUSE de *Mus musculus*, Q80WX7\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WX8\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q920Q1\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q54A43\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY0\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY4\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q8CH85\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY5\_RAT de *Rattus norvegicus*, GCYB1\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q8CH90\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q91XJ7\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WX9\_RAT de *Rattus norvegicus*, GCYB2\_RAT de *Rattus norvegicus*, GCYA2\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q4ZHR9\_CANFA de *Canis familiaris*, GCYB1\_BOVIN de *Bos taurus*, Q4ZHR7\_PI $\tilde{G}$  de *Sus scrofa*, Q59HN5\_GRYBI de *Gryllus bimaculatus*, O77106\_MANSE de *Manduca sexta*, O76340\_MANSE de *Manduca sexta*, Q5UAF0\_APIME de *Apis mellifera*, Q5FANO\_APIME de *Apis mellifera*, Q6L5L6\_APIME de *Apis mellifera*, PEST Q7PYK9\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7Q9W6\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7QF31\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7PS01\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7PFY2\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, Q7KQ93\_ANOGA de *Anopheles gambiae*, Q24086\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYH\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCY8E\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYDA\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYDB\_DROME de *Drosophila melanogaster*, Q9VA09\_DROME de *Drosophila melanogaster*, Q29CE1\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q296C7\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q296C8\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q29BU7\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q7YWK7\_APLCA de *Aplysia californica*, Q95NK5\_HEMPU de *Hemicentrotus*

pulcherrimus, Q5YLC2\_CHLRE de *Chlamydomonas reinhardtii*, Q8YUQ7\_ANASP de *Anabaena sp*, BBFL7 Q26GR8\_9BACT de *Flavobacterium bacterium*, ATCC 700755 Q1VQE5\_9FLAO de *Psychroflexus torquis*, HTCC2207 Q1YPJ5\_9GAMM de proteobacteria gamma marina, HTCC2207 Q1YTK4\_9GAMM de proteobacteria gamma marina, Q9A451\_CAUCR de *Caulobacter crescentus*, JF-5 Q2DG60\_ACICY de *Acidiphilum cryptum*, Q3J0U9\_RHOS4 de *Rhodobacter sphaeroides*, Q5LPV1\_SILPO de *Silicibacter pomeroyi*, PD1222, Q3PC67\_PARDE de *Paracoccus denitrificans*, TM1040 Q3QNY2\_9RHOB de *Silicibacter sp*, Q28ML8\_JANSC de *Jannaschia sp*, MC-1 Q3XT27\_9PROT de *Magnetococcus sp*, Q5WXPO\_LEGPL de *Legionella pneumophila*, Q5WTZ5\_LEGPL de *Legionella pneumophila*, Q5X268\_LEGPA de *Legionella pneumophila* Q5X2R2\_LEGPA, de *Legionella pneumophila*, Q5ZWM9\_LEGPH de *Legionella pneumophila subsp pneumophila*, Q5ZSQ8\_LEGPH de *Legionella pneumophila subsp pneumophila*, Q47Y43\_COLP3 de *Colwellia psychrerythraea*, T6c Q3CSZ5\_ALTAT de *Pseudoalteromonas atlantica*, Q8EF49\_SHEON de *Shewanella oneidensis*, Q21E20\_SACD2 de *Saccharofagus degradans*, Q21ER7\_SACD2 de *Saccharofagus degradans*, S14 Q1ZWE5\_9VIBR de *Vibrio angustum*, Q8DAE2\_VIBVU de *Vibrio vulnificus*, 12G01 Q1VCP6\_VIBAL de *Vibrio alginolyticus*, DAT722 Q2FA22\_9VIBR de *Vibrio sp*, Q87NJ1\_VIBPA de *Vibrio parahaemolyticus*, Q5E1F5\_VIBF1 de *Vibrio fischeri*, Q7MJS8\_VIBVY de *Vibrio vulnificus*, SKA34 Q2C6Z5\_9GAMM de *Photobacterium sp*, Q2SFY7\_HAHCH de *Hahella chejuensis*, MED92 Q2BKV0\_9GAMM de *Oceanospirillum sp*, RED65 Q1N035\_9GAMM de *Oceanobacter sp*, Q310U7\_DESDG de *Desulfovibrio desulfuricans*, H 168 Q2AIW5\_9FIRM de *Halothermothrix orenii*, Q8RBX6\_THETN de *Thermoanaerobacter tengcongensis*, DSM 8903 Q2ZH17\_CALSA de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, Q97E73\_CLOAB de *Clostridium acetobutylicum*, QYMF Q3C763\_9CLOT de *Alkaliphilus metallireducens*, Q899J9\_CLOTE de *Clostridium tetani* y NCIMB 8052 Q2WVN0\_CLÔBE de *Clostridium beijerincki*. En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína H-NOX no tiene una mutación en el motivo Y-S-R, que incluye Tyr135, Ser137 y Arg139 de H-NOX humana.

A menos que se observe o dicte explícitamente de otro modo por el contexto, todas las proteínas H-NOX naturales y mutantes descritas en el presente documento pueden usarse en cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. La proteína H-NOX puede o puede no tener hemo y/u oxígeno unido y puede o puede no unirse covalentemente a otra molécula o fracción, tal como polietilenglicol. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX es una proteína de fusión que incluye un dominio de H-NOX y parte o toda de otra proteína, tal como albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano).

En el presente documento se describen métodos para administrar oxígeno a un individuo (por ejemplo, un mamífero, tal como un primate (por ejemplo, un ser humano, un simio inferior, un gorila, un simio superior, un lémur, etc.), un bovino, un equino, un porcino, un canino o un felino) usando una proteína H-NOX. El individuo puede padecer o está en riesgo de una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, hipoxia tumoral, una pérdida de sangre o una herida. Indicaciones cardiovasculares a modo de ejemplo incluyen infarto de miocardio (por ejemplo, infarto de miocardio por elevación del segmento ST), cardioplejía, anemia de células falciformes, isquemia perioperatoria, oclusión vascular periférica y angioplastia. Indicaciones neurológicas a modo de ejemplo incluyen accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral traumática y lesión de médula espinal. Para el tratamiento de hipoxia tumoral, las proteínas H-NOX pueden usarse, por ejemplo, como un complemento de radioterapia en tumores sólidos (por ejemplo, individuos con malos pronósticos pre-metastásicos) o como un complemento de terapia PDT en tumores superficiales (por ejemplo, cáncer de colon, pulmón o piel, o cáncer en otra superficie o localización accesible). Las aplicaciones de proteínas H-NOX como alternativa a la transfusión de sangre incluyen traumatismo (por ejemplo, campo de batalla, alivio de desastres o accidentes), cirugía (por ejemplo, cirugía de aneurisma abdominal, cirugía ortopédica tal como cirugía de atroplastia de cadera, o cualquier otra cirugía que produce alta pérdida de sangre), hemorragias, choque hemorrágico, hemodilución, y usos de extensión de sangre (por ejemplo, auto-donación suplementante). Ejemplos de aplicaciones de reparación de heridas incluyen cicatrización después de radiación (por ejemplo, efecto de oxígeno hiperbárico), reparación posquirúrgica, reparación de úlceras diabéticas y heridas por quemaduras.

En el presente documento se describe un método para administrar oxígeno a un individuo (por ejemplo, un ser humano) administrando a un individuo en necesidad de las mismas una proteína H-NOX en una cantidad suficiente para administrar una cantidad eficaz de oxígeno al individuo. La constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 1 mM a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina.

En algunas realizaciones de las composiciones, el oxígeno está unido a la proteína H-NOX antes de la administración de la proteína H-NOX al individuo. En algunas realizaciones de las composiciones, el oxígeno no se une a la proteína H-NOX antes de la administración de la proteína H-NOX al individuo y la proteína H-NOX transporta oxígeno de una localización en el individuo a otra localización en el individuo. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX se administra a la sangre del individuo. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX se administra a la sangre, una herida, un tumor, un tejido hipóxico o un órgano hipóxico del individuo. En algunas realizaciones de las composiciones, el individuo padece o está en riesgo de una pérdida de sangre. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX se administra al individuo al

menos dos veces.

En algunas realizaciones de las composiciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*, tal como una constante de disociación del O<sub>2</sub> entre 0,1 y 10 veces o entre 0,5 y 2 veces la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. En algunas realizaciones de las composiciones, la reactividad del NO de la proteína H-NOX es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*, tal como al menos 100 veces o 1.000 veces menor que la de la hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX es una proteína natural.

En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX es una proteína mutante como se describe en el presente documento. En diversas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX tiene al menos una mutación que altera la constante de disociación del O<sub>2</sub>, la k<sub>dis</sub> para el oxígeno, la velocidad de auto-oxidación del hemo, la reactividad del NO, o cualesquiera dos o más de las anteriores en comparación con las de una proteína natural correspondiente. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX es una seleccionada del grupo que consiste en H-NOX de *T. tengcongensis* natural, H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 1 H-NOX de *L. pneumophila* natural, 2 H-NOX de *L. pneumophila* natural, 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX de *D. desulfuricans* natural, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β1 H-NOX de *H. sapiens* natural, β1 I145Y de *H. sapiens*, β1(1-385) de *H. sapiens*, β1(1-385) I145Y de *H. sapiens*, β1(1-385) I145H de *H. sapiens*, β1(1-194) de *H. sapiens*, β1(1-194) I145Y de *H. sapiens*, β1(1-194) L9W-I145Y de *H. sapiens*, β2(1-217) de *H. sapiens*, β2(1-217) I142Y de *H. sapiens*, β1 H-NOX H105G de *H. sapiens*, β1 H-NOX H105F de *H. sapiens*, β1 H-NOX de *R. norvegicus* natural, β1(1-385) de *R. norvegicus*, β1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*, β1(1-385) I145H de *R. norvegicus*, β1(1-194) de *R. norvegicus*, β1(1-194) I145Y de *R. norvegicus*, β1(1-194) L9W-I145Y de *R. norvegicus*, β2(1-217) de *R. norvegicus*, β2(1-217) I142Y de *R. norvegicus*, β1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, β1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, H-NOX(1-175) de *C. botulinum*, H-NOX(1-186) de *C. botulinum*, H-NOX de *C. acetobutylicum* natural, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, GCY-35 H-NOX de *C. elegans* natural, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, β1 H-NOX de *D. melanogaster* natural, CG14885-PA de *D. melanogaster* natural, CG14886 de *D. melanogaster* natural, CG4154 de *D. melanogaster* natural; H-NOX de *N. punctiforme* natural, H-NOX de *C. crescentus* natural, H-NOX de *S. oneidensis* natural, H-NOX de *M. musculus* natural, H-NOX de *C. familiaris* natural, H-NOX de *B. taurus* natural, *R. norvegicus* natural; H-NOX de *X. laevis* natural, H-NOX de *O. latipes* natural, H-NOX de *O. curivatus* natural, H-NOX de *F. rubripes* natural, H-NOX de *A. gambiae* natural, H-NOX de *M. sexta* natural; gcy-31 de *C. elegans* natural, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 de *C. elegans* natural, gcy-34 de *C. elegans* natural, gcy-35 de *C. elegans* natural, gcy-36 de *C. elegans* natural, gcy-37 de *C. elegans* natural; H-NOX de *V. cholera* natural, H-NOX de *V. fischeri* natural y H-NOX de *N. punctiforme* natural. En algunas realizaciones de las composiciones, uno o más liposomas o nanoparticulas incluyen o encapsulan la proteína H-NOX.

En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX no es H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX no es H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX de *T. tengcongensis* natural o 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX no es β2(1-217) de *R. norvegicus*, β1(1-194) de *R. norvegicus*, β1(1-385) de *R. norvegicus* o β1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX no es H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis* o β1 H-NOX (1-385) I145Y de *H. sapiens*. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX no es H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, β1 I140Y de *H. sapiens* o β1 I145Y de *H. sapiens*. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX no es H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX de *L. pneumophila* natural, β1 H-NOX I140Y de *H. sapiens*, β1 H-NOX de *H. sapiens* natural, sGC β1 H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC β1 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC β1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC β1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, sGC β1 H-NOX 1145Y de *R. norvegicus*, β1 H-NOX de *R. norvegicus* natural, β1 H-NOX de *D. melanogaster* natural, CG14885-PA H-NOX de *D. melanogaster* natural, GCY-35 H-NOX de *C. elegans* natural, H-NOX de *N. punctiforme* natural, H-NOX de *C. crescentus* natural, H-NOX de *S. oneidensis* natural o H-NOX de *C. acetobutylicum* natural. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX no es H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX de *T. tengcongensis* natural, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 2 H-NOX de *L. pneumophila* natural, β1 H-NOX I140Y de *H. sapiens*, β1 I145Y de *H. sapiens*, β1 H-NOX de *H. sapiens* natural, sGC β1 H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC β1 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC β1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC β1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, sGC β1 H-NOX 1145Y de *R. norvegicus*, β1 H-NOX de *R. norvegicus* natural, β1 H-NOX de *D. melanogaster* natural, CG14885-PA H-NOX de *D. melanogaster* natural, GCY-35 H-NOX de *C. elegans*

natural, H-NOX de *N. punctiforme* natural, H-NOX de *C. crescentus* natural, H-NOX de *S. oneidensis* natural o H-NOX de *C. acetobutylicum* natural. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX no es ninguna de las siguientes proteínas H-NOX que se enumeran por su nombre de gen, seguido de su abreviatura de especie e identificadores de Genbank (tal como las siguientes secuencias de proteínas disponibles a partir de 21 de mayo de 2006; 22 de mayo de 2006; 21 de mayo de 2007 o 22 de mayo de 2007): Npun.5905\_Npu\_23129606, alr2278\_Ana\_17229770, SO2144\_Sone\_24373702, Mdeg1343\_Mde\_23027521, VCA0720\_Vch\_15601476, CC2992\_Ccr\_16127222, Rspf2043\_Rhsp\_22958463 (gi:46192757), Mmc10739\_Mcsp\_22999020, Tar4\_Tte\_20807169, Ddes2822\_Dde\_23475919, CAC3243\_Cac\_15896488, gcy-31\_Ce\_17568389, CG14885\_Dm\_24647455, GUCY1B3\_Hs\_4504215, HpGCS-beta1\_Hpu1\_14245738, Gycbeta100B\_Dm\_24651577, CG4154\_Dm\_24646993 (gi:NP\_650424.2, gi:62484298), gcy-32\_Ce\_13539160, gcy-36\_Ce\_17568391 (gi:32566352, gi:86564713), gcy-35\_Ce\_17507861 (gi:71990146), gcy-37\_Ce\_17540904 (gi:71985505), GCY1a3\_Hs\_20535603, GCY1a2-Hs\_899477 o GYCa-99B\_Dm\_729270 (gi:68067738) (Lakshminarayan et al. (2003). "Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins", BMG Genomics 4:5-13). Las abreviaturas de especies usadas en estos nombres incluyen Ana - *Anabaena* Sp; Ccr - 5 *Caulobacter crescentus*; Cac - *Clostridium acetobutylicum*; Dde - *Desulfovibrio desulfuricans*; Mcsp - *Magnetococcus* sp.; Mde - *Microbulbifer degradans*; Npu - *Nostoc punctiforme*; Rhsp - *Rhodobacter sphaeroides*; Sone - *Shewanella oneidensis*; Tte - *Thermoanaerobacter tengcongensis*; Vch - *Vibrio cholerae*; Ce - *Caenorhabditis elegans*; Dm - *Drosophila melanogaster*; Hpul - *Hemicentrotus pulcherrimus*; Hs - *Homo sapiens*. En algunas realizaciones de los métodos, la proteína H-NOX no es ninguna de las siguientes proteínas H-NOX que se enumeran por su nombre de 10 organismo y número de acceso de la base de datos Pfam (tal como las siguientes secuencias de proteínas disponibles a partir de 21 de mayo de 2006; 22 de mayo de 2006; 17 de mayo de 2007; 21 de mayo de 2007; o 22 de mayo de 2007): Q622M5\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61P44\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61R54\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61V90\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61A94\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q60TP4\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q60M10\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, GCY37\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY31\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY36\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY32\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY35\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY34\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY33\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, Q7T040\_ORYCU de *Oryzias curvinotus*, Q75WF0\_ORYCU de *Oryzias curvinotus*, P79998\_ORYLA de *Oryzias latipes*, Q7ZS25\_ORYLA de *Oryzias latipes*, Q4SW38\_TETNG de *Tetraodon nigroviridis*, Q4RZ94\_TETNG de *Tetraodon nigroviridis*, 15 Q4S6K5\_TETNG de *Tetraodon nigroviridis*, Q90VY5\_FUGRU de *Fugu rubripes*, Q6INK9\_XENLA de *Xenopus laevis*, Q5T8J7\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYA2\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYB2\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYB1\_HUMAN de *Homo sapiens*, Q9N193\_9PRIM de *Gorilla*, QSRAN8\_PONPY de *Pongo pygmaeus*, Q9N192\_PANTR de *Pan troglodytes*, Q9N194\_MACMU de *Macaca mulatta*, Q9N191\_HYLLA de *Hylobates lar*, Q8BXH3\_MOUSE de *Mus musculus*, GCYB1\_MOUSE de *Mus musculus*, Q3UT14\_MOUSE de *Mus musculus*, 20 Q3UH83\_MOUSE de *Mus musculus*, Q6XE41\_MOUSE de *Mus musculus*, Q80YP4\_MOUSE de *Mus musculus*, Q80WX7\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WX8\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q920Q1\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q54A43\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY0\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY4\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q8CH85\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY5\_RAT de *Rattus norvegicus*, GCYB1\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q8CH90\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q91XJ7\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WX9\_RAT de *Rattus norvegicus*, 25 GCYB2\_RAT de *Rattus norvegicus*, GCYA2\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q4ZHR9\_CANFA de *Canis familiaris*, GCYB1\_BOVIN de *Bos taurus*, Q4ZHR7\_PIG de *Sus scrofa*, Q59HN5\_GRYBI de *Gryllus bimaculatus*, O77106\_MANSE de *Manduca sexta*, 076340\_MANSE de *Manduca sexta*, Q5UAFO\_APIME de *Apis mellifera*, Q5FAN0\_APIME de *Apis mellifera*, Q6L5L6\_APIME de *Apis mellifera*, PEST Q7PYK9\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7Q9W6\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7QF31\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7PS01\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7PFY2\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, Q7KQ93\_ANOGA de *Anopheles gambiae*, Q24086\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYH\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCY8E\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYDA\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYDB\_DROME de *Drosophila melanogaster*, Q9VA09-DROME de *Drosophila melanogaster*, Q29CE1\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q296C7\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q296C8\_DROPS 30 de *Drosophila pseudoobscura*, Q29BU7\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q7YWK7\_APLCA de *Aplysia californica*, Q95NK5\_HEMPU de *Hemicentrotus pulcherrimus*, QSYLC2\_CHLRE de *Chlamydomonas reinhardtii*, Q8YUQ7\_ANASP de *Anabaena* sp, BBFL7 Q26GR8\_9BACT de *Flavobacteria bacterium*, ATCC 700755 Q1VQE5\_9FLAO de *Psychrophlexus torquis*, HTCC2207 Q1YPJ5\_9GAMM de *proteobacteria gamma marina*, HTCC2207 Q1YTK4\_9GAMM de *proteobacteria gamma marina*, Q9A451\_CAUCR de *Caulobacter crescentus*, JF-5 Q2DG60\_ACICY de *Acidiphilum cryptum*, Q3J0U9\_RHOS4 de *Rhodobacter sphaeroides*, Q5LPV1\_SILPO de *Silicibacter pomeroyi*, PD1222, Q3PC67\_PARDE de *Paracoccus denitrificans*, TM1040 Q3QNY2\_9RHOB de *Silicibacter* sp, Q28ML8\_JANSC de *Jannaschia* sp, MC-1 Q3XT27\_9PROT de *Magnetococcus* sp, Q5WXPO\_LEGPO de *Legionella pneumophila*, Q5WTZ5\_LEGPO de *Legionella pneumophila*, Q5X268\_LEGPA de *Legionella pneumophila*, Q5X2R2\_LEGPA de *Legionella pneumophila*, QSZWM9 LEGPH de *Legionella pneumophila* subsp *pneumophila*, Q5ZSQ8\_LEGPH de *Legionella pneumophila* subsp *pneumophila*, Q47Y43\_COLP3 de *Colwellia psychrerythraea*, T6c Q3CSZ5\_ALTAT de *Pseudoalteromonas atlantica*, Q8EF49\_SHEON de *Shewanella oneidensis*, Q21E20\_SACD2 de *Saccharofagus degradans*, Q21ER7\_SACD2 de *Saccharofagus degradans*, S14 Q1ZWE5\_9VIBR de *Vibrio angustum*, Q8DAE2\_VIBVU de *Vibrio vulnificus*, 12G01 Q1VCP6\_VIBAL de *Vibrio alginolyticus*, DAT722 Q2FA22\_9VIBR de *Vibrio* sp, Q87NJ1\_VIBPA de *Vibrio parahaemolyticus*, QSE1F5\_VIBF1 de *Vibrio fischeri*, Q7MJS8\_VIBVY de *Vibrio vulnificus*, SKA34 Q2C6Z5\_9GAMM de *Photobacterium* sp, Q2SFY7\_HAHCH de *Hahella chejuensis*, MED92 Q2BKV0\_9GAMM de *Oceanospirillum* sp, RED65

Q1N035\_9GAMM de *Oceanobacter sp*, Q310U7\_DESDG de *Desulfovibrio desulfuricans*, H 168 Q2AIW5\_9FIRM de *Halothermothrix orenii*, Q8RBX6\_THETN de *Thermoanaerobacter tengcongensis*, DSM 8903 Q2ZH17\_CALSA de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, Q97E73\_CLOAB de *Clostridium acetobutylicum*, QYMF Q3C763\_9CLOT de *Alkaliphilus metallireducens*, Q899J9\_CLOTE de *Clostridium tetani* y NCIMB 8052 Q2WVN0\_CLOBE de *Clostridium beijerinckii*. En algunas realizaciones de los métodos, la proteína H-NOX no es sGC β1 H-NOX C78S de *R. norvegicus* o sGC β1 H-NOX C78E de *R. norvegicus*. En algunas realizaciones de las composiciones, la proteína H-NOX no tiene una mutación en el motivo Y-S-R, que incluye Tyr135, Ser137 y Arg139 de H-NOX humana.

A menos que se observe o dicte explícitamente de otro modo por el contexto, todas las proteínas naturales y mutantes y todas las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse en cualquiera de los métodos de administración de oxígeno descritos en el presente documento. La proteína H-NOX puede o puede no tener hemo y/o oxígeno unido y puede o puede no unirse covalentemente a otra molécula o fracción, tal como polietilenglicol. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX es una proteína de fusión que incluye un dominio de H-NOX y parte o toda de otra proteína, tal como albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano).

En el presente documento también se describen kits que incluyen una o más proteínas H-NOX. En algunas realizaciones, el kit incluye una proteína H-NOX e instrucciones para usar el kit para administrar oxígeno a un individuo. La constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX puede estar entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 1 mM a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C). La constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX puede estar dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 1 mM a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones la proteína H-NOX no es H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*. A menos que se observe o dicte explícitamente de otro modo por el contexto, todas las proteínas naturales y mutantes y todas las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse en cualquiera de los kits descritos en el presente documento. La proteína H-NOX puede o puede no tener hemo y/o oxígeno unido y puede o puede no unirse covalentemente a otra molécula o fracción, tal como polietilenglicol. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX es una proteína de fusión que incluye un dominio de H-NOX y parte o toda de otra proteína, tal como albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano).

También se describe en el presente documento una proteína H-NOX (tal como cualquiera de las proteínas naturales o mutantes descritas en el presente documento) para su uso como un medicamento. La proteína H-NOX puede utilizarse en un método de administración de oxígeno a un individuo. La proteína H-NOX puede usarse para tratar cualquier afección para la que la administración de O<sub>2</sub> sea beneficiosa, tal como una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, hipoxia tumoral, una pérdida de sangre o una herida.

También se describe en el presente documento el uso de una proteína H-NOX (tal como cualquiera de las proteínas naturales o mutantes descritas en el presente documento) para la fabricación de un medicamento, tal como un medicamento para la administración de oxígeno a un individuo.

#### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A es una imagen de la estructura tridimensional de restos del bolsillo distal de proteínas H-NOX de unión a NO y unión a O<sub>2</sub> (arriba hemo). Los restos de coordinación de hemo de las proteínas H-NOX de unión a NO y unión a O<sub>2</sub> también se muestran (debajo de hemo). La FIG. 1A se basa en la estructura tridimensional de H-NOX de *T. tengcongensis* informada por Pellicena, P. et al. (31 de agosto de 2004). "Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", Proc Natl. Acad Sci USA 101(35):12854-12859.

La FIG. 1B es una vista lateral estereoscópica de la estructura tridimensional de HNOX de *T. tengcongensis* que ilustra rasgos estructurales del dominio de H-NOX. El pliegue de la proteína se representa por diagramas de cintas, El hemo, ligando de dioxígeno, y la histidina proximal se muestran como modelos de esferas y varillas.

Las hélices α se marcan A-G según la nomenclatura mostrada en la FIG. 5B. Las cadenas β se marcan 1-4. La FIG. 1B es de Pellicena, P. et al. (31 de agosto de 2004). "Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", Proc Natl. Acad Sci USA 101(35):12854-12859.

Las FIGS. 1C-1H son imágenes de la estructura tridimensional de HNOX de *T. tengcongensis* que ilustran restos del bolsillo distal a modo de ejemplo en HNOX de *T. tengcongensis*. Los siguientes restos representados en las FIGS. 1C-1H son los principales restos que comprenden el bolsillo distal de H-NOX: Thr4, Ile5, Thr8, Trp9, Trp67, Asn74, Ile75, Phe78, Phe82, Tyr104 y Leu144, que están contenidos dentro de las hélices A, D, E y G. Las FIGS. 1C-1H se crearon usando PYMOL (DeLano Scientific, LLP).

La FIG. 2 es un alineamiento de secuencias de las siguientes proteínas H-NOX que se unen o se predice que se unen a O<sub>2</sub> y NO: Majority (SEQ ID NO: 1); gcy-31 de Ce. (SEQ ID NO: 2); gcy-33 de Ce. (SEQ ID NO: 3); gcy-35 de Ce. (SEQ ID NO: 4); CG14885 HNOX de Dm. (SEQ ID NO: 5); CG4154 HNOX de Dm. (SEQ ID NO: 6); HNOX beta3 de Ms. (SEQ ID NO: 7); HNOX de *T.* (SEQ ID NO: 8); y HNOX de Ca (SEQ ID NO: 9). Se predice

que estas proteínas H-NOX se unen a O<sub>2</sub>, además de a NO, debido a que tienen una tirosina en la posición correspondiente a Y140 de H-NOX de *T. tengcongensis*. La numeración de aminoácidos usada en la FIG. 2 empieza con el primer aminoácido en el dominio de H-NOX o proteína de longitud completa como número de resto 1. El alineamiento se generó usando los parámetros por defecto en el programa MegAlign. Las abreviaturas usadas en la FIG. 2 se describen más adelante con respecto a las FIGS. 4A-4D.

5 La FIG. 3A-3D son un alineamiento de secuencias de las siguientes proteínas H-NOX que se unen o se predice que se unen a NO, pero no a O<sub>2</sub>: Majority (SEQ ID NO: 10); proteína sGC beta1 de Dm. (SEQ ID NO: 11); proteína sGC beta1 (SEQ ID NO: 12); proteína sGC beta1 de hs. (SEQ ID NO: 13); proteína beta2 de hs. (SEQ ID NO: 14); proteína sGC beta1 de Ms. (SEQ ID NO: 15); proteína sGC beta1 de Mm. (SEQ ID NO: 16); similar a HD beta1 de Np. (SEQ ID NO: 17); proteína sGC beta1 de Tr. (SEQ ID NO: 18); Anopheles\_gambiae|XP\_310919 (SEQ ID NO: 19); Apis\_mellifera|NP\_001011632 (SEQ ID NO: 20); proteína sGC beta1 de Bt. (SEQ ID NO: 21); Chlamydomonas\_reinhardtii|AAR02 (SEQ ID NO: 22); Oryzias\_curvinotus|BAC98396 (SEQ ID NO: 23); Oryzias\_latipes|BAA76691 (SEQ ID NO: 24); Strongylocentrotus\_purpuratus|X (SEQ ID NO: 25); y Sus scrofa beta1|NP\_001018042+ (SEQ ID NO: 26). El alineamiento se generó usando los parámetros por defecto en el programa MegAlign. Las abreviaturas usadas en las FIGS. 3A-3D se describen a continuación con respecto a la FIG. 4.

10 Las FIGS. 4A-4D son un alineamiento de secuencias de proteínas H-NOX de las FIGS. 2 y 3A-3D: Majority (SEQ ID NO: 27); proteína sGC beta1 de Dm. (SEQ ID NO: 11); proteína sGC beta1 (SEQ ID NO: 12); proteína sGC beta1 de hs. (SEQ ID NO: 13); proteína beta2 de hs. (SEQ ID NO: 14); proteína sGC beta1 de Mm. (SEQ ID NO: 16); similar a HD beta1 de Np. (SEQ ID NO: 17); proteína sGC beta1 de Tr. (SEQ ID NO: 18); Chlamydomonas\_reinhardtii|AAR02 (SEQ ID NO: 22); Oryzias\_curvinotus|BAC98396 (SEQ ID NO: 23); Strongylocentrotus\_purpuratus|X (SEQ ID NO: 25); Sus scrofa beta1|NP\_001018042 (SEQ ID NO: 26); gcy-31a (SEQ ID NO: 2); gcy-33 (SEQ ID NO: 3); HNOX de Ca. (SEQ ID NO: 9); similar a HD beta1 de T. (SEQ ID NO: 8); proteína sGc beta3 de Ms. (SEQ ID NO: 7); CG14885 (SEQ ID NO: 5) y variante corta de sGC de Dm. (SEQ ID NO: 6). El alineamiento se generó usando los parámetros por defecto en el programa MegAlign. Para las FIGS. 2-4D, "proteína Dm. sGC beta1" indica β1 H-NOX de *Drosophila melanogaster*; "proteína sGC beta1" indica β1 H-NOX de *Rattus norvegicus*; "proteína sGC beta1 de hs." indica β1 H-NOX de *Homo sapiens*; "proteína beta2 de hs." indica β2 H-NOX de *Homo sapiens*; "proteína sGC beta1 de Mm." indica β1 H-NOX de *Mus musculus*; "similar a HD beta1 de Np." indica H-NOX de *Nostoc punctiforme*; "proteína sGC beta1 de Tr." indica β1 H-NOX de *Takifugu rubripes*; "Anopheles\_gambiae|XP\_310919" indica β1 H-NOX de *Anopheles gambiae*; "Apis\_mellifera|NP\_001011632" indica β1 H-NOX de *Apis mellifera*; "proteína sGC beta1 de Bt." indica β1 H-NOX de *Bos taurus*; "Chlamydomonas\_reinhardtii|AAR02" indica H-NOX de *Chlamydomonas reinhardtii*; "Oryzias curvinotus|BAC98396" indica β1 H-NOX de *Oryzias curvinotus*; "Oryzias\_latipes|BAA76691" indica β1 H-NOX de *Oryzias latipes*; "Strongylocentrotus\_purpuratus|X" indica β1 H-NOX de *Strongylocentrotus purpuratus*; "beta1 de Sus scrofa |NP\_001018042+" indica β1 H-NOX de *Sus scrofa*; "gcy-31a" indica Gcy-31a H-NOX de *Caenorhabditis elegans*; "gcy-33" indica Gcy-33 H-NOX de *Caenorhabditis elegans*; "gcy-35" indica Gcy-35 H-NOX de *Caenorhabditis elegans*; "HNOX de Ca." indica H-NOX de *Clostridium acetobutylicum*; "similar a HD beta1 de T." indica 1H-NOX de *Thermoanaerobacter tengcongensis*; "proteína sGc beta3 de Ms." indica β3 H-NOX de *Manduca sexta*; "CG14885" indica CG14885 H-NOX de *Drosophila melanogaster*; "variante corta de sGC de Dm." indica Gcy-88-E-S H-NOX de *Drosophila melanogaster*, y "CG4154 HNOX de Dm." indica CG4154 H-NOX de *Drosophila melanogaster*.

15 La FIG. 5A es un alineamiento de secuencias de miembros de la familia H-NOX. La numeración de secuencias es la de H-NOX de *T. tengcongensis*. Los restos invariantes se indican por "V", restos muy altamente conservados se indican por "s". Y140 de H-NOX de *T. tengcongensis* se indica por "H". Los restos de tirosina del bolsillo predichos que pueden estabilizar un complejo de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> en otras proteínas H-NOX son: posición 70 para GCY-35 de *Caenorhabditis elegans*; posición 140 en CG14885-PA de *Drosophila melanogaster*; posición 138 de GCY-35 de *Caenorhabditis elegans*; posición 140 de *Clostridium acetobutylicum*; numerado según *Thermoanaerobacter tengcongensis*. Los números de acceso son: β1 [gi:2746083] de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 28), β1 [gi:27127318] de *Rattus norvegicus* (SEQ ID NO: 29), β1 [gi:861203] de *Drosophila melanogaster* (SEQ ID NO: 30), CG14885-PA [gi:23171476] de *Drosophila melanogaster* (SEQ ID NO: 31), GCY-35 [gi:52782806] de *Caenorhabditis elegans* (SEQ ID NO: 32), [gi:23129606] de *Nostoc punctiforme* (SEQ ID NO: 33), [gi:16127222] de *Caulobacter crescentus* (SEQ ID NO: 34), [gi:24373702] de *Shewanella oneidensis* (SEQ ID NO: 35), (ORF 2) [CUCGC\_272624] de *Legionella pneumophila* (SEQ ID NO: 36), [gi:15896488] de *Clostridium acetobutylicum* (SEQ ID NO: 37) y [gi:20807169] de *Thermoanaerobacter tengcongensis* (SEQ ID NO: 38). Los alineamientos se generaron usando el programa MegAlign, Lasergene, DNA Star, (véase, la malla mundial en "DNAstar.com/products/megalign.php"). Se usaron los parámetros por defecto de Clustal-W.

20 La FIG. 5B es un alineamiento de secuencias de dominios de H-NOX a modo de ejemplo. Las anotaciones de la estructura secundaria y la numeración encima del alineamiento se corresponden con el dominio de H-NOX de *T. tengcongensis*. Las hélices α se representan por espirales, y las cadenas β por flechas. El bolsillo distal se define por las hélices α αA, αD, αE y αG. Los números de acceso de Pubmed/NCBI son del siguiente modo: Ther\_tengcongensis gi | 20807169 | (SEQ ID NO: 39), Clos\_acetobutylicum gi |15896488| (SEQ ID NO: 40), Clos\_tetani GI:75543266 (SEQ ID NO: 41), Desu\_desulfuricans gi | 23475919 | (SEQ ID NO: 42), Vibr\_vulnificus gi |27361734| (SEQ ID NO: 43), Caul\_crescentus gi |116127222 (SEQ ID NO: 44), Micr\_degradans gi | 23027521 | (SEQ ID NO: 45), Vibr\_cholerae gi |115601476| (SEQ ID NO: 46), Shew\_oneidensis gi |24373702| (SEQ ID NO: 47), Rat\_beta1\_sGC gi |27127318| (SEQ ID NO: 48), Rat\_beta2\_sGC gi |21956635| (SEQ ID NO: 49), Nost

punctiforme gi |23129606| (SEQ ID NO: 50) y Nost\_sp. gi |17229770| (SEQ ID NO: 51). La secuencia consenso se muestra en la parte inferior de la FIG. 5B (SEQ ID NO: 52). Los alineamientos se generaron usando el programa MULTALIN (Corpet, F. (1988) NucleicAcidsRes. 16:10881-10890) y la FIG. 5B se preparó usando el programa ESPRIPT (Gouet, P. et al. (1999) Bioinformatics 15: 305-308.).

5 Las FIGS. 6A y 6B son imágenes de la estructura tridimensional del entorno hemo del dominio de H-NOX de *T. tengcongensis*. Las FIGS. 6A y 6B son de Pellicena, P. et al. (31 de agosto de 2004). "Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", Proc Natl. Acad Sci USA 101(35):12854-12859.

10 Las FIGS. 7A-7F son gráficas de la espectroscopia UV-visible de proteínas H-NOX después de la reducción anaerobia (complejos sin ligar de Fe<sup>II</sup>; línea superior en cada gráfica) antes y después de exponerse a aire (complejos de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>; línea inferior en cada gráfica) para *Tt* H-NOX (FIG. 7A), *Tt* Y140L (FIG. 7B), *Tt* W9F-Y140L (FIG. 7C), *Tt* F78Y-Y140L (FIG. 7D), *L2* H-NOX y *L2* F142Y (FIG. 7E), y  $\beta$ 1(1-385) y  $\beta$ 1(1-385) I145Y (FIG. 7F). Además de los complejos de Fe<sup>II</sup> y Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> de *L2* F142Y y  $\beta$ 1(1-385) I145Y se muestran el espectro de *L2* H-NOX y  $\beta$ 1-(1-385) H-NOX natural después de la reducción y exposición al aire en la línea central en la FIG. 15 7E y 7F, respectivamente, para demostrar que estas proteínas no se unen a O<sub>2</sub> antes de la adición de una tirosina del bolsillo distal. Los dos o tres números escritos en la esquina superior izquierda de cada panel representan la longitud de onda para el pico de las líneas en la gráfica. Los números están escritos verticalmente en el orden en el que aparecen las líneas correspondientes verticalmente en la gráfica. Por ejemplo, el valor de 20 430 nm en la FIG. 7A indica el pico de la longitud de onda para la línea superior en la gráfica (que representa un complejo sin ligar de Fe<sup>II</sup>), y el valor de 416 nm en la FIG. 7A indica el pico de la longitud de onda para la línea inferior en la gráfica (que representa un complejo de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>). Un desplazamiento en la longitud de onda en presencia de aire indica que la proteína se une a O<sub>2</sub>. La formación de un doble pico entre 500 y 600 nm en presencia de aire también es indicativa de unión de O<sub>2</sub>. Las FIGS. 7A-7F son de Boon, E. M. et al. (2005).

25 "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", Nature Chem. Biol. 1:53-59.

Las FIGS. 8A-8DD contienen secuencias de polinucleótidos de ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican proteínas H-NOX y las secuencias de aminoácidos de las proteínas H-NOX correspondientes (SEQ ID NO: 53-162).

#### Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que proteínas H-NOX tienen una reactividad del NO mucho menor que la hemoglobina. Esta baja reactividad del NO intrínseca (y alta estabilidad del NO) hace que las proteínas H-NOX naturales y mutantes sean sucedáneos de la sangre deseables debido a la menor probabilidad de inactivación de proteínas H-NOX por NO endógeno y la menor probabilidad de eliminación de

35 NO endógeno por proteínas H-NOX. Y, lo que es más importante, la presencia de una tirosina del bolsillo distal en algunas proteínas H-NOX (Pellicena, P. et al. (31 de agosto de 2004). "Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", Proc Natl. Acad Sci USA 101(35):12854-12859) sugiere alta reactividad del NO no deseable, contraindicando el uso como sucedáneo de la sangre. Por ejemplo, por analogía, una proteína hemoglobina de *Mycobacterium tuberculosis*, con una tirosina del bolsillo distal estructuralmente 40 análoga, reacciona extremadamente rápidamente con NO, y es usada por la *Mycobacterium* para eliminar y evitar eficazmente el NO defensivo producido por un huésped infectado (Ouellet, H. et al. (30 de abril de 2002). "Truncated Hemoglobin HbN Protects Mycobacterium Bovis From Nitric Oxide", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(9):5902-5907). Sin embargo, los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que las proteínas H-NOX tienen en realidad 45 una reactividad del NO mucho menor que la de la hemoglobina, haciendo posible su uso como sucedáneos de la sangre.

Adicionalmente se descubrió sorprendentemente que las proteínas H-NOX que se unen a NO pero no a O<sub>2</sub> pueden convertirse en proteínas H-NOX que se unen tanto a NO como a O<sub>2</sub> por la introducción de una mutación de un único aminoácido. Por tanto, la afinidad de proteínas H-NOX por O<sub>2</sub> y NO y la capacidad de proteínas H-NOX para 50 discriminar entre ligandos de O<sub>2</sub> y de NO puede alterarse por la introducción de una o más mutaciones de aminoácidos, permitiendo que las proteínas H-NOX sean confeccionadas para unirse a O<sub>2</sub> o NO con afinidades deseadas. Pueden introducirse mutaciones adicionales para alterar adicionalmente la afinidad por O<sub>2</sub> y/o NO. Por tanto, la familia de proteínas H-NOX puede manipularse para presentar propiedades cinéticas y termodinámicas 55 mejoradas u óptimas para administración de O<sub>2</sub>. Por ejemplo, se han generado proteínas H-NOX mutantes con constantes de disociación alteradas para la unión a O<sub>2</sub> que mejoran la utilidad de proteínas H-NOX para varias aplicaciones clínicas e industriales. La capacidad para ajustar las proteínas H-NOX para que se unan a y administren O<sub>2</sub> es una vía terapéutica que trata y vence los defectos centrales de los presentes transportadores de O<sub>2</sub>. Por consiguiente, la presente invención proporciona proteínas, composiciones, kits y métodos para la administración de oxígeno.

60 Hay numerosos beneficios de usar proteínas H-NOX para la administración de O<sub>2</sub>. La principal función de la transfusión de sangre tras traumatismo y cirugía es administrar O<sub>2</sub>. Un sucedáneo de la sangre ideal evita los desafíos de la sangre convencional: contaminación vírica, requisitos de tipado, estabilidad en almacén limitada y disponibilidad limitada. Las principales limitaciones de los sucedáneos de la sangre basados en hemoglobina son su alta afinidad por O<sub>2</sub> y su propensión a reaccionar con NO. Como se ha mencionado anteriormente, la destrucción de niveles de NO incluso bajos puede tener graves efectos sobre el estado de reposo tónico de la vasculatura y

órganos y conduce a hipertensión y dolor gastrointestinal. Adicionalmente, en el proceso de reaccionar con NO, la hemoglobina pierde su capacidad para administrar O<sub>2</sub> en un periodo de tiempo clínicamente relevante. Se han hecho numerosos intentos para minimizar la toxicidad de los transportadores de oxígeno basados en hemoglobina de primera generación (HBOC) que incluyen reticulación intra- e inter-molecular ("Blood Substitutes", R. Winslow ed. Academic Press, 2006). Aunque estas modificaciones vencieron algunos de los graves problemas de toxicidad relacionados con la extravasación de hemoglobina, siguió la destrucción de la unión de oxígeno debido a la alta reactividad del NO. Estos HBOC de segunda generación presentan afinidad reducida por el oxígeno, con valores de p50 próximos al valor de p50 de eritrocitos, ya han fracaso en ensayos clínicos. Winslow y colaboradores han propuesto una hipótesis alternativa: un HBOC de p50 baja con una viscosidad y presión oncótica coloidal apropiada es más apropiado para la administración de oxígeno sin células que un HBOC de p50 alta (Tsai, A. G. et al. (2003). "Targeted O<sub>2</sub> Delivery by low-P50 hemoglobin: A New Basis for O<sub>2</sub> Therapeutics," Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 285:H1411-H1419; Winslow (2007). "Red Cell Substitutes", Seminars in Hematology 44:51-59). Queda por ver si la reactividad del NO de un HBOC tal se convierte o no en un problema en ensayos clínicos. La manipulación de proteínas H-NOX para unirse a y administrar O<sub>2</sub> con reactividad del NO mínima proporciona un nuevo transportador de O<sub>2</sub> gaseoso en la sangre para su uso en sucedáneos de la sangre, en donde las proteínas H-NOX administran O<sub>2</sub> sin eliminar NO o son inactivadas como transportadores de O<sub>2</sub> por NO. Estas proteínas H-NOX, composiciones, kits y métodos se describen adicionalmente en el presente documento.

## Proteínas H-NOX

### **Visión general de la familia de proteínas H-\*NOX**

A menos que se indique lo contrario, cualquier proteína H-NOX natural o mutante puede usarse en las composiciones, kits y métodos como se describe en el presente documento. Como se usa en el presente documento, una "proteína H-NOX" significa una proteína que tiene un dominio de H-NOX (llamado dominio de unión al Hemo-Óxido Nítrico y Oxígeno). Una proteína H-NOX puede o puede no contener uno o varios de otros dominios, además del dominio de H-NOX. Las proteínas H-NOX son miembros de una familia bien caracterizada altamente conservada de hemoproteínas (Iyer, L. M. et al. (3 de febrero de 2003). "Ancient Conserved domains Shared by Animal Soluble Guanylyl Cyclases And Bacterial Signaling Proteins", BMC Genomics 4(1):5; Karow, D. S. et al. (10 de agosto de 2004). "Spectroscopic Characterization of the Soluble Guanylate Cyclase-Like Heme Domains From Vibrio Cholerae And Thermoanaerobacter tengcongensis", Biochemistry 43(31):10203-10211; Boon, E. M. et al. (2005). "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", Nature Chem. Biol. 1:53-59; Boon, E. M. et al. (octubre de 2005). "Ligand Discrimination in Soluble Guanylate Cyclase and the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins", Curr. Opin. Chem. Biol. 9(5):441-446; Boon, E. M. et al. (2005). "Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors", J. Inorg. Biochem. 99(4):892-902). Las proteínas H-NOX también se denominan proteínas 07700 o proteínas HNOB de Pfam (Pfam – A database of protein domain family alignments and Hidden Markov Models, Copyright (C) 1996-2006 The Pfam Consortium; GNU LGPL Free Software Foundation, Inc., 59 Temple Place - Suite 330, Boston, MA 02111-1307, EE.UU.). En algunas realizaciones, una proteína H-NOX tiene, o se predice que tiene, una estructura secundaria que incluye seis hélices alfa, seguidas de dos cadenas beta, seguidas de una hélice alfa, seguida de dos cadenas beta. Una proteína H-NOX puede ser una apoproteína que puede unirse a hemo o una holoproteína con hemo unido. Una proteína H-NOX puede unirse covalentemente o no covalentemente a un grupo hemo. Algunas proteínas H-NOX se unen a NO, pero no a O<sub>2</sub>, y otras se unen tanto a NO como a O<sub>2</sub>. Los dominios de H-NOX de aerobios facultativos que han sido aislados se unen a NO, pero no a O<sub>2</sub>. Las proteínas H-NOX de procariotas aerobios obligados, *C. elegans*, y *D. melanogaster*, se unen a NO y O<sub>2</sub>. Los mamíferos tienen dos proteínas H-NOX: β1 y β2. Un alineamiento de secuencias de H-NOX de ratón, rata, vaca y humana muestra que estas especies comparten >99 % de identidad. En algunas realizaciones, el dominio de H-NOX de una proteína H-NOX o la proteína H-NOX entera es al menos aproximadamente cualquiera del 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 o el 99,5 % idéntica al de la región correspondiente de una proteína H-NOX de *Thermoanaerobacter tengcongensis* que se produce naturalmente o una proteína sGC que se produce naturalmente (por ejemplo, una proteína sGC β1 que se produce naturalmente). Como se ha tratado adicionalmente en el presente documento, una proteína H-NOX puede contener opcionalmente una o más mutaciones con respecto a la proteína H-NOX que se produce naturalmente correspondiente. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX incluye uno o más dominios, además del dominio H-NOX. En realizaciones particulares, la proteína H-NOX incluye uno o más dominios o la secuencia entera de otra proteína. Por ejemplo, la proteína H-NOX puede ser una proteína de fusión que incluye un dominio de H-NOX y parte o toda de otra proteína, tal como albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano). En algunas realizaciones, solo el dominio de H-NOX está presente.

Una estructura de cristal de una H-NOX de unión a O<sub>2</sub> procariota de *Thermoanaerobacter tengcongensis* (Nioche, P. et al. (26 de noviembre de 2004). "Femtomolar Sensitivity of a NO Sensor From Clostridium Botulinum", Science 306(5701):1550-1553; Pellicena, P. et al. (31 de agosto de 2004). "Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", Proc Natl. Acad Sci USA 101 (35):12854-12859) muestra que un grupo hidroxilo de la cadena lateral de tirosina hace un enlace de H crítico con la fracción de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>. Esta red de unión a hidrógeno del bolsillo distal, que implica principalmente Y140, estabiliza un complejo de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> (FIG. 6B). Esta tirosina no está presente en proteínas H-NOX que discriminan al O<sub>2</sub> y solo se unen a NO. Por ejemplo, se predice que esta red de enlace de hidrógeno está ausente en las proteínas H-NOX de sGC y procariotas aerobios, sugiriendo esto que un factor molecular clave en la sorprendente selectividad del ligando contra el O<sub>2</sub> mostrado por

estas proteínas hemo. Las FIGS. 7A-7G demuestran claramente que la adición de una tirosina en el bolsillo distal de una proteína H-NOX natural que se une a NO pero no a O<sub>2</sub> puede permitir que la proteína H-NOX mutante se una a O<sub>2</sub>. Por tanto, una tirosina en el bolsillo hemo distal del pliegue hemo de H-NOX actúa de interruptor para activar o desactivar la unión de O<sub>2</sub>.

- 5 Como se ilustra en las FIGS. 6A y 6B, la estructura de la porfirina está altamente distorsionada. Como se ilustra en la FIG. 6A, el motivo Y-S-R conservado hace interacciones enlace de hidrógeno con las de cadenas laterales de ácido propiónico del grupo hemo. FIG. 6B, el H102 conservado es el ligando proximal al hemo (FIG. 6B).
- 10 Como se usa en el presente documento, una “proteína” incluye proteínas y fragmentos de proteínas tanto si se aislan de fuentes naturales, se producen por técnicas recombinantes como si se sintetizan químicamente. Una proteína puede tener una o más modificaciones, tales como una modificación posttraduccional (por ejemplo, glucosilación, etc.) o cualquier otra modificación (por ejemplo, PEGilación, etc.). La proteína puede contener uno o más aminoácidos que no se producen naturalmente (por ejemplo, tales como un aminoácido con una modificación en la cadena lateral). En diversas realizaciones, la proteína H-NOX tiene al menos aproximadamente 50, 100, 150, 181, 200, 250, 300, 350, 400 o más aminoácidos. En algunas realizaciones, las proteínas H-NOX pueden incluir de 15 aproximadamente 50 a aproximadamente 600 aminoácidos, tal como aproximadamente 100 a aproximadamente 500 aminoácidos, aproximadamente 150 a aproximadamente 400 aminoácidos, aproximadamente 150 a aproximadamente 300 aminoácidos, o aproximadamente 175 a aproximadamente 200 aminoácidos.
- 20

#### **Fuentes de proteínas H-NOX**

Pueden usarse en las composiciones, kits y métodos descritos en el presente documento proteínas H-NOX de cualquier género o especie. En diversas realizaciones, la proteína H-NOX es una proteína de un mamífero (por ejemplo, un primate (por ejemplo, ser humano, simio inferior, gorila, simio superior, lémur, etc.), un bovino, un equino, un porcino, un canino o un felino), un insecto, una levadura o una bacteria o se deriva de una proteína tal. Proteínas H-NOX de mamífero a modo de ejemplo incluyen guanilato ciclase soluble humana y de rata natural (tal como la subunidad β1). Ejemplos de proteínas H-NOX incluyen proteínas H-NOX de mamífero naturales, por ejemplo, *H. sapiens*, *M. musculus*, *C. familiaris*, *B. taurus* y *R. norvegicus*; y proteínas H-NOX de vertebrado no mamífero naturales, por ejemplo, *X. laevis*, *O. latipes*, *O. curvinotus* y *F. rubripes*. Ejemplos de proteínas H-NOX de 25 unión a NO naturales de no mamífero incluyen proteínas H-NOX naturales de *D. melanogaster*, *A. gambiae* y *M. sexta*; ejemplos de proteínas H-NOX de unión a O<sub>2</sub> naturales de no mamífero incluyen proteínas H-NOX naturales de 30 gcy-31, gcy-32, gcy-33, gcy-34, gcy-35, gcy-36 y gcy-37 de *C. elegans*; CG14885, CG14886 y CG4154 de *D. melanogaster*; y beta-3 de *M. sexta*; ejemplos de proteínas H-NOX naturales procariotas incluyen *T. tengcongensis*, 35 *V. cholera*, *V. fischeri*, *N. punctiforme*, *D. desulfuricans*, *L. pneumophila* 1, *L. pneumophila* 2 y *C. acetobutylicum*.

Los números de acceso de NCBI para proteínas H-NOX a modo de ejemplo incluyen los siguiente: β1 [gi:2746083] de *Homo sapiens*, β1\*[gi:27127318] de *Rattus norvegicus*, β1 [gi:861203] de *Drosophila melanogaster*, CG14885-PA [gi:23171476] de *Drosophila melanogaster*, GCY-35 [gi:52782806] de *Caenorhabditis elegans*, [gi:23129606] de 40 *Nostoc punctiforme*, [gi:16127222] de *Caulobacter crescentus*, [gi:24373702] de *Shewanella oneidensis*, [CUCGC\_272624] de *Legionella pneumophila* (ORF 2), [gi:15896488] de *Clostridium acetobutylicum* y [gi:20807169] de *Thermoanaerobacter tengcongensis*.

Proteínas H-NOX a modo de ejemplo también incluyen las siguientes proteínas H-NOX que se enumeran por su 45 nombre de gen, seguido de su abreviatura de especie e identificadores de Genbank (tal como las siguientes secuencias de proteínas disponibles a partir de 21 de mayo de 2006; 22 de mayo de 2006; 21 de mayo de 2007 o 22 de mayo de 2007):

50 Npu5905\_Npu\_23129606, alr2278\_Ana\_17229770, SO2144\_Sone\_24373702, Mdeg1343\_Mde\_23027521, VCA0720\_Vch\_15601476, CC2992\_Ccr\_16127222, Rrsp2043\_Rhsp\_22958463 (gi:46192757), Mmc10739\_Mcsp\_22999020, Tar4\_Tte\_20807169, Ddes2822\_Dde\_23475919, CAC3243\_Cac\_15896488, gcy-31\_Ce\_17568389, CG14885\_Dm\_24647455, GUCY1B3\_Hs\_4504215, HpGCS-bctal\_Hpul\_14245738, Gycbeta100B\_Dm\_24651577, CG4154\_Dm\_24646993 (gi:NP\_650424.2, gi:62484298), gcy-32\_Ce\_13539160, gcy-36\_Ce\_17568391 (gi:32566352, gi:86564713), gcy-35\_Ce-17507861 (gi:71990146), gcy-37\_Ce\_17540904 (gi:71985505), GCY1a3\_Hs\_20535603, GCY1a2-Hs\_899477 o GYCa-99B\_Dm\_729270 (gi:68067738) (Lakshminarayan et al. (2003). “Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins”, BMG Genomics 4:5-13). Las abreviaturas de especies usadas en estos nombres incluyen Ana - *Anabaena* sp.; Ccr - *Caulobacter crescentus*; Cac - *Clostridium acetobutylicum*; Dde - *Desulfovibrio desulfuricans*; Mcsp - *Magnetococcus* sp.; Mde - *Microbulbifer degradans*; Npu - *Nostoc punctiforme*; Rhsp - *Rhodobacter sphaeroides*; Sone - *Shewanella oneidensis*; Tte - *Thermoanaerobacter tengcongensis*; Vch - *Vibrio cholerae*; Ce - *Caenorhabditis elegans*; Dm - *Drosophila melanogaster*; Hpul - *Hemicentrotus pulcherrimus*; Hs - *Homo sapiens*.

Otras proteínas H-NOX a modo de ejemplo incluyen las siguientes proteínas H-NOX que se enumeran por su 65 nombre de organismo y número de acceso de la base de datos Pfam (tal como las siguientes secuencias de proteínas disponibles a partir de 21 de mayo de 2006; 22 de mayo de 2006; 17 de mayo de 2007; 21 de mayo de

2007 o 22 de mayo de 2007): Q622M5\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61P44\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61R54\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61V90\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q61A94\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q60TP4\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, Q60M10\_CAEBR de *Caenorhabditis briggsae*, GCY37\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY31\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY36\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY32\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY35\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY34\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, GCY33\_CAEEL de *Caenorhabditis elegans*, Q7T040\_ORYCU de *Oryzias curvinotus*, Q75WF0\_ORYCU de *Oryzias curvinotus*, P79998\_ORYLA de *Oryzias latipes*, Q7ZSZ5\_ORYLA de *Oryzias latipes*, Q4SW38\_TETNG de *Tetraodon nigroviridis*, Q4RZ94\_TETNG de *Tetraodon nigroviridis*, Q4S6K5-TETNG de *Tetraodon nigroviridis*, Q90VY5\_FUGRU de *Fugu rubripes*, Q6INK9\_XENLA de *Xenopus laevis*, Q5T8J7\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYA2\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYB2\_HUMAN de *Homo sapiens*, GCYB1\_HUMAN de *Homo sapiens*, Q9N193\_9PRIM de *Gorilla gorilla*, Q5RAN8\_PONPY de *Pongo pygmaeus*, Q9N192\_PANTR de *Pan troglodytes*, Q9N194\_MACMU de *Macaca mulatta*, Q9N191\_HYLLA de *Hylobates lar*, Q8BXH3\_MOUSE de *Mus musculus*, GCYB1\_MOUSE de *Mus musculus*, Q3UTI4\_MOUSE de *Mus musculus*, Q3UH83\_MOUSE de *Mus musculus*, Q6XE41\_MOUSE de *Mus musculus*, Q80YP4\_MOUSE de *Mus musculus*, Q80WX7\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WX8\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q920Q1\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q54A43\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY0\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY4\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q8CH85\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WY5\_RAT de *Rattus norvegicus*, GCYB1\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q8CH90\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q91XJ7\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q80WX9\_RAT de *Rattus norvegicus*, GCYB2\_RAT de *Rattus norvegicus*, GCYA2\_RAT de *Rattus norvegicus*, Q4ZHR9\_CANFA de *Canis familiaris* GCYB1\_BOVIN, de *Bos taurus*, Q4ZHR7\_PIG de *Sus scrofa*, Q59HN5\_GRYBI de *Gryllus bintaculatus*, O77106\_MANSE de *Manduca sexta*, O76340\_MANSE de *Manduca sexta*, Q5UAFO\_APIME de *Apis mellifera*, Q5FAN0\_APIME de *Apis mellifera*, Q6L5L6\_APIME de *Apis mellifera*, PEST Q7PYK9\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7Q9W6\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7QF31\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7PS01\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, PEST Q7PFY2\_ANOGA de *Anopheles gambiae* str, Q7KQ93\_ANOGA de *Anopheles gambiae*, Q24086\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYH\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYBE\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYDA\_DROME de *Drosophila melanogaster*, GCYDB\_DROME de *Drosophila melanogaster*, Q9VA09\_DROME de *Drosophila melanogaster*, Q29CE1\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q296C7\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q296C8\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q29BU7\_DROPS de *Drosophila pseudoobscura*, Q7YWK7\_APLCA de *Aplysia californica*, Q95NK5\_HEMPU de *Hemicentrotus pulcherrimus*, Q5ILC2\_CHLRE de *Chlamydomonas reinhardtii*, Q8YUQ7\_ANASP de *Anabaena* sp, BBFL7 Q26GR8\_9BACT de *Flavobacteria bacterium*, ATCC 700755 Q1VQE5\_9FLAO de *Psychroflexus torquis*, HTCC2207 Q1YPJ5\_9GAMM de *proteobacteria gamma marina*, HTCC2207 Q1YTK4\_9GAMM de *proteobacteria gamma marina*, Q9A451\_CAUCR de *Caulobacter crescentus*, JF-5 Q2DG60\_ACICY de *Acidiphilum cryptum*, Q3J0U9\_RHOS4 de *Rhodobacter sphaeroides*, Q5LPV1\_SILPO de *Silicibacter pomeroyi*, PD1222 de *Paracoccus denitrificans*, Q3PC67\_PARDE, TM1040 Q3QNY2\_9RHOB de *Silicibacter* sp, Q28ML8\_JANSC de *Jannaschia* sp, MC-1 Q3XT27\_9PROT de *Magnetococcus* sp, Q5WXPO\_LEGPL de *Legionella pneumophila*, Q5WTZ5\_LEGPL de *Legionella pneumophila*, Q5X268\_LEGPA de *Legionella pneumophila*, Q5X2R2\_LEGPA de *Legionella pneumophila*, Q5ZWM9\_LEGPH de *Legionella pneumophila* subsp *pneumophila*, Q5ZSQ8\_LEGPH de *Legionella pneumophila* subsp *pneumophila*, Q47Y43\_COLP3 de *Colwellia psychrerythraea*, T6c Q3CSZ5\_ALTAT de *Pseudoalteromonas atlantica*, Q8EF49\_SHEON de *Shewanella oneidensis*, Q21E20\_SACD2 de *Succharofagus degradans*, Q21ER7\_SACD2 de *Saccharofagus degradans*, S14 Q1ZWE5\_9VIBR de *Vibrio angustum*, Q8DAE2\_VIBVU de *Vibrio vulnificus*, 12G01 Q1VCP6\_VIBAL de *Vibrio alginolyticus*, DAT722 Q2FA22\_9VIBR de *Vibrio* sp, Q87NJ1\_VIBPA de *Vibrio parahaemolyticus*, Q5E1F5\_VIBF1 de *Vibrio fischeri*, Q7MJS8\_VIBVY de *Vibrio vulnificus*, SKA34 Q2C6Z5\_9GAMM de *Photobacterium* sp, Q2SFY7\_HAHCH de *Hahella chejuensis*, MED92 Q2BKV0\_9GAMM de *Oceanospirillum* sp, RED65 Q1N035\_9GAMM de *Oceanobacter* sp, Q310U7\_DESDG de *Desulfovibrio desulfuricans*, H 168 Q2AIW5\_9FIRM de *Halothermothrix orenii*, Q8RBX6\_THETN de *Thermoanaerobacter tengcongensis*, DSM 8903 Q2ZH17\_CALSA de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, Q97E73\_CLOAB de *Clostridium acetobutylicum*, QYMF Q3C763\_9CLOT de *Alkaliphilus metallireducens*, Q899J9\_CLOTE de *Clostridium tetani* y NCIMB 8052 Q2WVN0\_CLOBE de *Clostridium beijerincki*. Se predice que estas secuencias codifican proteínas H-NOX basadas en la identificación de estas proteínas como que pertenecen a la familia de proteínas H-NOX usando la base de datos Pfam como se describe en el presente documento.

Proteínas y ácidos nucleicos H-NOX adicionales, que pueden ser adecuados para su uso en las composiciones farmacéuticas y métodos descritos en el presente documento, pueden identificarse usando métodos convencionales. Por ejemplo, pueden usarse programas de alineamiento de secuencias y/o predicción de estructuras convencionales para identificar proteínas y ácidos nucleicos H-NOX adicionales basándose en la similitud de su estructura de proteína primaria y/o secundaria predicha con la de proteínas y ácidos nucleicos H-NOX conocidos. Por ejemplo, la base de datos Pfam usa algoritmos de alineamiento definidos y modelos de Hidden Markov (tal como Pfam 21.0) para clasificar proteínas en familias tales como la familia de proteínas H-NOX (Pfam - A database of protein domain family alignments and Hidden Markov Models, Copyright (C) 1996-2006 The Pfam Consortium; GNU LGPL Free Software Foundation, Inc., 59 Temple Place - Suite 330, Boston, MA 02111-1307, EE.UU.). También pueden usarse bases de datos convencionales tales como la base de datos swissprot-trembl (malla mundial en “expasy.org”, Swiss Institute of Bioinformatics Swiss-Prot group CMU - 1 rue Michel Servet CH-1211 Geneva 4, Suiza) para identificar miembros de la familia de proteínas H-NOX. La estructura secundaria y/o terciaria de una proteína H-NOX puede predecirse usando los parámetros por defecto de programas de predicción de estructuras convencionales tales

como PredictProtein (630 West, 168 Street, BB217, Nueva York, N.Y. 10032, EE.UU.). Alternativamente, la estructura secundaria y/o terciaria real de una proteína H-NOX puede determinarse usando métodos convencionales.

- 5 En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene el mismo aminoácido en la posición correspondiente que cualquiera de los siguientes restos del bolsillo distal en H-NOX de *T. tengcongensis*: Thr4, Ile5, Thr8, Trp9, Trp67, Asn74, Ile75, Phe78, Phe82, Tyr140, Leu144, o cualquier combinación de dos o más de los anteriores. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene una prolina o una arginina en una posición correspondiente a la de Pro115 o Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis*, respectivamente, basándose en el alineamiento de secuencias de sus secuencias de aminoácidos.
- 10 En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene una histidina que se corresponde con His105 de  $\beta$ 1 H-NOX de *R. norvegicus*. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene o se predice que tiene una estructura secundaria que incluye seis hélices alfa, seguidas de dos cadenas beta, seguidas de una hélice alfa, seguida de dos cadenas beta. Esta estructura secundaria se ha informado para proteínas H-NOX.
- 15 Si se desea, una proteína H-NOX recientemente identificada puede probarse para determinar si se une a hemo usando métodos convencionales. La capacidad de una proteína H-NOX para actuar de transportador de O<sub>2</sub> puede probarse determinando si la proteína H-NOX se une a O<sub>2</sub> usando métodos convencionales tales como aquellos descritos en el presente documento. Si se desea, una o más de las mutaciones descritas en el presente documento pueden introducirse en la proteína H-NOX para optimizar sus características como transportador de O<sub>2</sub>. Por ejemplo, una o más mutaciones pueden introducirse para alterar su constante de disociación del O<sub>2</sub>,  $k_{dis}$  para oxígeno, velocidad de auto-oxidación del hemo, reactividad del NO, estabilidad del NO o cualquier combinación de dos o más de las anteriores. Pueden usarse técnicas convencionales tales como aquellas descritas en el presente documento para medir estos parámetros.
- 20
- 25 Como se ha tratado en el presente documento, las proteínas H-NOX mutantes (por ejemplo, mutantes de clase I y clase II tratados más adelante) pueden derivarse por mutagénesis de estas u otras secuencias de fuentes naturales (por ejemplo, las secuencias enumeradas en la FIG. 2-4D o 8A-8DD o cualquier otra secuencia descrita en el presente documento). Como se usa en el presente documento, "derivado de" se refiere a la fuente de la proteína en la que una o más mutaciones se introducen. Por ejemplo, una proteína que se "deriva de una proteína de mamífero" se refiere a proteína de interés que resulta de introducir una o más mutaciones en la secuencia de una proteína de mamífero natural (es decir, una secuencia que se produce en la naturaleza).
- 30

#### **Proteínas H-NOX mutantes**

- 35 Como se ha tratado adicionalmente en el presente documento, una proteína H-NOX puede contener una o más mutaciones, tales como una mutación que altera la constante de disociación del O<sub>2</sub>, la  $k_{dis}$  para el oxígeno, la velocidad de auto-oxidación del hemo, la reactividad del NO, la estabilidad del NO, o cualquier combinación de dos o más de las anteriores en comparación con las de la proteína natural correspondiente. Pueden generarse paneles de proteínas H-NOX manipuladas por mutagénesis al azar seguido de cribado empírico para constantes de disociación requeridas o deseadas, velocidades de disociación, reactividad del NO, estabilidad, fisiocompatibilidad, o cualquier combinación de dos o más de las anteriores en vista de la enseñanza proporcionada en el presente documento usando técnicas como se describen en el presente documento y, adicionalmente, como son conocidas por el experto. Alternativamente, la mutagénesis puede elegirse selectivamente como diana para regiones o restos particulares tales como restos de bolsillo distales evidentes de la estructura tridimensional experimentalmente determinada o predicha de una proteína H-NOX (FIG. 1A en el presente documento; y véase, por ejemplo, Boon, E. M. et al. (2005). "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", Nature Chemical Biology 1:53-59, particularmente con respecto a las secuencias de proteínas H-NOX naturales y mutantes) o restos evolutivamente conservados identificados a partir de alineamientos de secuencias (FIGS. 2-4 en el presente documento; y véase, por ejemplo, Boon E.M. et al. (2005). "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", Nature Chemical Biology 1:53-59, particularmente con respecto a las secuencias de proteínas H-NOX naturales y mutantes).
- 40
- 45
- 50

Como se usa en el presente documento, una "proteína mutante" significa una proteína con una o más mutaciones en comparación con una proteína que se produce en la naturaleza. En una realización, la proteína mutante tiene una secuencia que se diferencia de la de todas las proteínas que se producen en la naturaleza. En diversas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la proteína mutante es al menos aproximadamente cualquiera del 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 o el 99,5 % idéntica a la de la región correspondiente de una proteína que se produce en la naturaleza. En algunas realizaciones, la proteína mutante es un fragmento de proteína que contiene al menos aproximadamente cualquiera de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 o 400 aminoácidos contiguos de una proteína de longitud completa. La identidad de secuencias puede medirse, por ejemplo, usando software de análisis de secuencias con dichos parámetros por defecto especificados (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Este programa de software iguala secuencias similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, delecciones y otras modificaciones de aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, una "mutación" significa una alteración en una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos de referencia que se produce en la naturaleza. Mutaciones de ácidos nucleicos a modo de ejemplo incluyen una inserción, delección, mutación por desplazamiento del marco, mutación silenciosa, mutación terminadora o mutación de aminoácido. En algunas realizaciones, la mutación de ácido nucleico no es una mutación silenciosa. Mutaciones de proteínas a modo de ejemplo incluyen la inserción de uno o más aminoácidos (por ejemplo, la inserción de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos), la delección de uno o más aminoácidos (por ejemplo, una delección del extremo N, extremo C y/o restos internos tales como la delección de al menos aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 o más aminoácidos o una delección de aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 o 400 aminoácidos), la sustitución de uno o más aminoácidos (por ejemplo, la sustitución de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos), o combinaciones de dos o más de lo anterior. Un truncamiento funcional a modo de ejemplo de una proteína H-NOX incluye los restos 1-385 de la secuencia de  $\beta$ 1. En algunas realizaciones, una proteína mutante tiene al menos una alteración de aminoácidos en comparación con una proteína que se produce en la naturaleza. En algunas realizaciones, una secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica una proteína que tiene al menos una alteración de aminoácidos en comparación con una proteína que se produce en la naturaleza. En algunas realizaciones, el ácido nucleico no es una versión degenerada de un ácido nucleico que se produce en la naturaleza que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos idéntica a una proteína que se produce en la naturaleza. La nomenclatura usada con referencia a una mutación de aminoácido particular identifica primero el aminoácido natural, seguido del número de resto y finalmente el aminoácido sustituto. Por ejemplo, Y140L significa que la tirosina ha sido sustituida con una leucina en el resto número 140.

Una "mutación evolutivamente conservada" es la sustitución de un aminoácido en una proteína con un aminoácido en la posición correspondiente de otra proteína en la misma familia de proteínas. Mutaciones evolutivamente conservadas a modo de ejemplo (también indicadas mutaciones de clase I) se enumeran en la Tabla 1A. En la Tabla 1A, las mutaciones se numeran/anotan según la secuencia de  $\beta$ 1 H-NOX humana, pero son análogas para todas las secuencias de H-NOX. Por tanto, la posición correspondiente en cualquier otra proteína H-NOX puede mutarse al resto indicado. Por ejemplo, Phe4 de  $\beta$ 1 H-NOX humana puede mutarse a una tirosina ya que otras proteínas H-NOX tienen una tirosina en esta posición. El resto de fenilalanina correspondiente puede mutarse a una tirosina en cualquier otra proteína H-NOX. En realizaciones particulares, la una o más mutaciones están confinadas en restos evolutivamente conservados. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones pueden incluir al menos una mutación evolutivamente conservada y al menos una mutación no evolutivamente conservada. Si se desea, estas proteínas H-NOX mutantes se someten a cribado empírico para constantes de disociación de NO/O<sub>2</sub>, reactividad del NO, estabilidad y fisiocompatibilidad en vista de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

**35 Tabla 1A. Mutaciones de H-NOX de clase I a modo de ejemplo que eligen como diana restos evolutivamente conservados**

F4Y	Q30G	I145Y
F4L	E33P	I145H
H7G	N61G	K151E
A8E	C78H	I157F
L9W	A109F	E183F

En algunas realizaciones, la mutación es una mutación del bolsillo distal tal como mutación de un resto en la hélice alfa A, D, E o G (Pellicena, P. et al. (31 de agosto de 2004). "Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", Proc Natl. Acad Sci USA 101(35):12854-12859). Mutaciones del bolsillo distal a modo de ejemplo (también indicadas mutaciones de clase II) se enumeran en la Tabla 1B. En la Tabla 1B, las mutaciones se numeran/anotan según la secuencia de  $\beta$ 1 H-NOX humana, pero son análogas para todas las secuencias de H-NOX. Debido a que varias sustituciones proporcionan mutaciones viables en cada resto citado, el resto en cada posición indicada puede cambiarse a cualquier otro aminoácido que se produzca naturalmente o que no se produzca naturalmente (indicado "X"). Tales mutaciones pueden producir proteínas H-NOX con varias características de afinidad, estabilidad y reactividad deseadas.

**35 Tabla 1B. Mutaciones de H-NOX de clase II a modo de ejemplo que eligen como diana restos del bolsillo distal**

V8X	M73X	I145X
L9X	F77X	I149X
F70X	C78X	

En realizaciones particulares, la mutación es una mutación del bolsillo distal de hemo. Como se describe en el presente documento, un determinante molecular crucial que previene la unión de O<sub>2</sub> en miembros de unión de NO de la familia H-NOX es la falta de un donante de enlace de H en el bolsillo distal del hemo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la mutación altera el enlace de H entre el dominio de H-NOX y el ligando dentro del bolsillo distal. En algunas realizaciones, la mutación interrumpe un donante de enlace de H del bolsillo distal y/o confiere unión al ligando de O<sub>2</sub> reducida con respecto al dominio de H-NOX natural correspondiente. Restos del bolsillo distal a modo de ejemplo incluyen hr4, Ile5, Thr8, Trp9, Trp67, Asn74, Ile75, Phe78, Phe82, Tyr140 y Leu144 de H-NOX de *T. tengcongensis* y los restos correspondientes en cualquier otra proteína H-NOX.

- Los restos que no están en el bolsillo distal también pueden afectar la estructura tridimensional del grupo hemo; esta estructura afecta a su vez la unión de O<sub>2</sub> y NO al hierro en el grupo hemo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene una o más mutaciones fuera del bolsillo distal. Ejemplos de restos que pueden mutarse, pero que no están en el bolsillo distal, incluyen Pro115 y Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis*. En algunas realizaciones, la mutación está en el bolsillo proximal que incluye His105 como resto que se liga con el hierro del hemo.
- En algunas realizaciones, cuando dos o más mutaciones están presentes; al menos una mutación está en el bolsillo distal y al menos una mutación está fuera del bolsillo distal (por ejemplo, una mutación en el bolsillo proximal). En algunas realizaciones, todas las mutaciones están en el bolsillo distal.
- En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la proteína H-NOX no es idéntica a la secuencia de una proteína que se produce por un organismo en la naturaleza. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la proteína H-NOX no es idéntica a una secuencia encontrada en cualquier base de datos el 21 de mayo de 2006 o 22 de mayo de 2006 (tal como todas las secuencias conocidas predichas o conocidas por ser una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos de H-NOX). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la proteína H-NOX no es idéntica a una secuencia encontrada en ninguna base de datos el 21 de mayo de 2007 o 22 de mayo de 2007 (tal como todas las secuencias conocidas predichas o conocidas por ser una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos de H-NOX).
- Para reducir la inmunogenicidad de proteínas H-NOX derivadas de fuentes distintas de seres humanos, los aminoácidos en una proteína H-NOX pueden mutarse a los aminoácidos correspondientes en una H-NOX humana. Por ejemplo, uno o más aminoácidos sobre la superficie de la estructura terciaria de una proteína H-NOX no humana pueden mutarse al aminoácido correspondiente en una proteína H-NOX humana. En algunas variaciones, la mutación de uno o más aminoácidos de superficie puede combinarse con la mutación de dos o más restos del bolsillo distal, mutación de uno o más restos fuera del bolsillo distal (por ejemplo, una mutación en el bolsillo proximal), o combinaciones de dos o más de lo anterior.
- Mutaciones a modo de ejemplo se muestran en la Tabla 2. Además, cualquiera de los restos enumerados en la Tabla 2 puede mutarse a cualquier otro aminoácido. Puede realizarse cualquier combinación de mutación descrita en el presente documento, tal como mutaciones dobles, triples o múltiples superiores. Por ejemplo, combinaciones de cualquiera de las mutaciones descritas en el presente documento pueden hacerse en la misma proteína H-NOX. Obsérvese que mutaciones en posiciones equivalentes en otras proteínas H-NOX de mamífero o de no mamífero también están englobadas por la presente invención. Si se desea también pueden mutarse restos distintos de los mencionados en la Tabla 2. Las proteínas H-NOX mutantes a modo de ejemplo comprenden una o más mutaciones que imparten unión a ligando de O<sub>2</sub> o NO alterada con respecto al dominio de H-NOX natural correspondiente y son operativas como transportador de gas O<sub>2</sub> en sangre de mamífero fisiológicamente compatible.
- En la Tabla 2 y todas las tablas posteriores, el número de resto para una mutación indica la posición en la secuencia de la proteína H-NOX particular que se describe. Por ejemplo, I5A de *T. tengcongensis* se refiere a la sustitución de isoleucina por alanina en la quinta posición en H-NOX de *T. tengcongensis*. La misma isoleucina para la mutación de alanina puede hacerse en el resto correspondiente en cualquier otra proteína H-NOX (este resto puede o puede no ser el quinto resto en la secuencia de otras proteínas H-NOX). Como las secuencias de aminoácidos de dominios de β1 H-NOX de mamífero se diferencian como máximo en dos aminoácidos, también se espera que las mutaciones que producen proteínas H-NOX mutantes deseables cuando se introducen en proteínas β1 H-NOX de rata naturales produzcan proteínas H-NOX mutantes deseables cuando se introducen en proteínas β1 H-NOX naturales de otros mamíferos, tales como seres humanos.

**50 Tabla 2. Mutantes de H-NOX a modo de ejemplo de *T. tengcongensis* (*Tt*), *L. pneumophila* (*Lp*), *D. desulfuricans* (*Dd*), *V. cholera* (*Vc*), *N. punctiforme* (*Np*), *C. botulinum* (*Cb*), *C. acetobutylicum* (*Ca*), rata, ser humano, *C. elegans* (*Ce*).**

<i>Tt</i>	<i>Lp</i>	<i>Dd</i>	Otras bacterias	Rata	Ser humano	Gusano
<i>Tt</i> H-NOX	<i>L2</i> H-NOX	<i>Dd</i> H-NOX(728-899)	<i>Vc</i> H-NOX	β1(1-385)	β1(1-385)	Ce GCY-35(1-252)
<i>Tt</i> H-NOX His6	<i>L2</i> F142Y	<i>Dd</i> Y139L	<i>Np</i> H-NOX	β1(1-385) I145Y	β1(1-385) I145Y	
<i>Tt</i> I5A	<i>L2</i> F9W-F142Y		<i>Cb</i> H-NOX(1-175)	β1(1-385) I145H	β1(1-385) I145H	
<i>Tt</i> I5L	<i>L1</i> H-NOX		<i>Cb</i> H-NOX(1-186)	β1(1-385) C78Y	β1(1-385) C78Y	

<i>Tt</i> I5L- P115A	<i>L1</i> F142Y	Ca H- NOX(1- 197) Ca H-	$\beta 1(1-194)$	$\beta 1(1-194)$
<i>Tt</i> W9F		NOX(1- 183)	$\beta 1$ H105F	$\beta 1$ H105F
<i>Tt</i> W9F-Y140L			$\beta 1$ H105G	$\beta 1$ H105G
<i>Tt</i> W9F- Y140H			$\beta 1(1-194)$ I145Y	$\beta 1(1-194)$ I145Y
<i>Tt</i> W9F- N74A			$\beta 1(1-194)$ L9W-I145Y	$\beta 1(1-194)$ L9W- I145Y
<i>Tt</i> W9Y			$\beta 2(1-217)$	$\beta 2(1-217)$
<i>Tt</i> W9N			$\beta 2(1-217)$ I142Y	$\beta 2(1-217)$ I142Y
<i>Tt</i> W9H				
<i>Tt</i> N74E				
<i>Tt</i> N74A				
<i>Tt</i> N74H				
<i>Tt</i> N74A-				
Y140H				
<i>Tt</i> I75F				
His6				
<i>Tt</i> F78Y-				
Y140L				
<i>Tt</i> F78Y-				
Y140F				
<i>Tt</i> P115A				
<i>Tt</i> R135Q				
His6				
<i>Tt</i> Y140F				
<i>Tt</i> Y140L				
<i>Tt</i> Y140H				
<i>Tt</i> Y140A				
<i>Tt</i> L144F				
His6				

**Modificaciones a proteínas H-NOX**

- Cualquiera de las proteínas H-NOX naturales o mutantes puede modificarse y/o formularse usando métodos convencionales para potenciar aplicaciones terapéuticas o industriales. Por ejemplo, y particularmente como se aplica a proteínas H-NOX manipuladas heterólogas, en la técnica se conoce varios métodos para aislar tales agentes de supervisión inmune que incluyen reticulación, PEGilación, decoloración de hidratos de carbono, etc. (por ejemplo, Rohlf, R. J. et al. (15 de mayo de 1998). "Arterial Blood Pressure Responses to Cell-Free Hemoglobin Solutions And The Reaction With Nitric Oxide", J. Biol. Chem. 273(20):12128-12134; Migita, R. et al. (junio de 1997). "Blood Volume And Cardiac Index in Rats After Exchange Transfusion With Hemoglobin-Based Oxygen Carriers", J. Appl. Physiol. 82(6):1995-2002; Vandegriff, K. D. et al. (15 de agosto de 2004). "Kinetics of NO and O<sub>2</sub> Binding to a Maleimide Poly(ethylene glycol)-Conjugated Human Haemoglobin", Biochem J. 382(Pt 1):183-189, particularmente con respecto a la modificación de proteínas), además de otras técnicas conocidas para el experto. Fusionando una proteína H-NOX con una proteína humana tal como albúmina de suero humano puede aumentarse la semivida en suero, viscosidad y presión oncótica coloidal. En algunas realizaciones, una proteína H-NOX se modifica durante o después de su síntesis para reducir su inmunogenicidad y/o para aumentar su tiempo de retención en plasma. Las proteínas H-NOX también pueden encapsularse (tal como encapsulación dentro de liposomas o nanopartículas).

**Características de proteínas H-NOX naturales y mutantes**

- Como se describe en el presente documento, se ha generado un gran número de diversas proteínas mutantes H-NOX que proporcionan intervalos de constantes de disociación del NO y O<sub>2</sub>, k<sub>dis</sub> de O<sub>2</sub>, reactividad y estabilidad del NO. Para proporcionar transportadores de gas en sangre operativos, las proteínas H-NOX pueden usarse para sustituir o complementar funcionalmente transportadores de O<sub>2</sub> endógenos tales como hemoglobina. Por consiguiente, en algunas realizaciones, una proteína H-NOX tiene una velocidad de asociación del O<sub>2</sub>, velocidad de disociación del O<sub>2</sub>, constante de disociación para la unión de O<sub>2</sub>, estabilidad del NO, reactividad del NO, velocidad de auto-oxidación, tiempo de retención en plasma, o cualquier combinación de dos o más de las anteriores, similar o mejorada en comparación con un transportador de O<sub>2</sub> endógeno, tal como hemoglobina.
- Como se usa en el presente documento, "hemoglobina" significa una proteína o un mutante de la misma de la familia bien caracterizada de hemoglobinas, que son metaloproteínas de transporte de O<sub>2</sub> que contienen hierro en glóbulos rojos. La hemoglobina humana libre de estromas purificada tiene una K<sub>D</sub> cinética para O<sub>2</sub> de aproximadamente 200-500 nM. Este valor es dependiente de la subunidad.
- Como se usa en el presente documento, una "k<sub>dis</sub>" significa una velocidad de disociación, tal como la velocidad de liberación de O<sub>2</sub> o NO de una proteína. Una menor k<sub>dis</sub> numérica indica una velocidad más lenta de disociación. En diversas realizaciones, la k<sub>dis</sub> para O<sub>2</sub> para una proteína H-NOX está entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 200 s<sup>-1</sup> a 20 °C, tal como aproximadamente 0,1 y aproximadamente 200 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 0,1 y 100 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 1,0 y aproximadamente 16,0 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 1,35 y aproximadamente 23,4 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 1,34 y aproximadamente 18 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 1,35 y aproximadamente 14,5 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 0,21 y aproximadamente 23,4 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 1,35 y aproximadamente 2,9 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 2 y aproximadamente 3 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 5 y aproximadamente 15 s<sup>-1</sup>, o aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1 s<sup>-1</sup>. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene una k<sub>dis</sub> para el oxígeno que es inferior a o igual a aproximadamente 0,65 s<sup>-1</sup> a 20 °C (tal como entre aproximadamente 0,21 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 0,65 s<sup>-1</sup> a 20 °C).
- Por una "k<sub>as</sub>" se indica una velocidad de asociación, tal como la velocidad de unión de O<sub>2</sub> o NO a una proteína. Una menor k<sub>as</sub> numérica indica una velocidad más lenta de asociación. En diversas realizaciones, la k<sub>as</sub> para O<sub>2</sub> para una proteína H-NOX está entre aproximadamente 0,14 y aproximadamente 60 μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> a 20 °C, tal como aproximadamente 6 y aproximadamente 60 μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, aproximadamente 6 y 12 μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, aproximadamente 15 y aproximadamente 60 μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, aproximadamente 5 y aproximadamente 18 μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, o aproximadamente 6 y aproximadamente 15 μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.
- Por "constante de disociación" se indica una "constante de disociación cinética" o una "constante de disociación calculada". Una "constante de disociación cinética" o "K<sub>D</sub>" significa una relación de velocidad de disociación cinética (k<sub>dis</sub>) con respecto a velocidad de asociación cinética (k<sub>as</sub>), tal como un valor de K<sub>D</sub> determinado como un valor absoluto usando métodos convencionales (por ejemplo, métodos espectroscópicos convencionales, de flujo interrumpido o fotólisis de destello) que incluyen métodos conocidos para el experto y/o descritos en el presente documento. "Constante de disociación calculada" o "K<sub>D</sub> calculada" se refiere a una aproximación de la constante de disociación cinética basándose en una t<sub>dis</sub> medida. Un valor para la k<sub>as</sub> se deriva mediante la correlación entre K<sub>D</sub> y k<sub>dis</sub> cinética como se describe en el presente documento.
- En diversas realizaciones, la K<sub>D</sub> cinética o calculada para la unión de O<sub>2</sub> por una proteína H-NOX está entre aproximadamente 1 nM y 1 mM, tal como aproximadamente 2 nM y aproximadamente 2 μM, aproximadamente 2 μM y aproximadamente 1 mM, aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1 μM, aproximadamente 9 μM y aproximadamente 50 μM, aproximadamente 100 μM y aproximadamente 1 mM, aproximadamente 50 nM y aproximadamente 10 μM, aproximadamente 2 nM y aproximadamente 50 μM, aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1,9 μM, aproximadamente 150 nM y aproximadamente 1 μM, o aproximadamente 100 nM y aproximadamente 255 nM, aproximadamente 20 nM y aproximadamente 2 μM, 20 nM y aproximadamente 75 nM, aproximadamente 1 μM y aproximadamente 2 μM, aproximadamente 2 μM y aproximadamente 10 μM, aproximadamente 2 μM y aproximadamente 9 μM, o aproximadamente 100 nM y 500 nM a 20 °C. En algunas realizaciones, la K<sub>D</sub> cinética o calculada para la unión de O<sub>2</sub> es inferior a aproximadamente cualquiera de 100 nM, 80 nM, 50 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM o 10 nM a 20 °C.
- En diversas realizaciones, la K<sub>D</sub> cinética o calculada para la unión de O<sub>2</sub> por una proteína H-NOX está dentro de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 veces la de la hemoglobina bajo las mismas condiciones (tal como a 20 °C), tal como entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 veces o entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2 veces la de la hemoglobina bajo las mismas condiciones (tal como a 20 °C). En diversas realizaciones, la K<sub>D</sub> cinética o calculada para la unión de NO por una proteína H-NOX está dentro de aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 veces la de la hemoglobina bajo las mismas condiciones (tal como a 20 °C), tal como entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 veces o entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2 veces la de la hemoglobina bajo las mismas condiciones (tal como a 20 °C).
- Como se usa en el presente documento, "afinidad del oxígeno" es un término cualitativo que se refiere a la intensidad de la unión del oxígeno la fracción hemo de una proteína. Esta afinidad está afectada por tanto la k<sub>dis</sub> como la k<sub>as</sub> para el oxígeno. Un valor de K<sub>D</sub> del oxígeno numéricamente menor significa una mayor afinidad.

"Afinidad de NO" es un término cualitativo que se refiere a la intensidad de la unión del NO a una proteína (tal como unión a un grupo hemo o a un oxígeno unido a un grupo hemo asociado a una proteína). Esta afinidad está afectada por tanto la  $k_{dis}$  como la  $k_{as}$  para el NO. Un valor de  $K_D$  del NO numéricamente menor significa una mayor afinidad.

- 5 Como se usa en el presente documento, "estabilidad del NO" se refiere a la estabilidad o resistencia de una proteína a la oxidación por NO en presencia de oxígeno. Por ejemplo, la capacidad de la proteína para no oxidarse cuando se une a NO en presencia de oxígeno es indicativa de la estabilidad del NO de la proteína. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente cualquiera del 50, 40, 30, 10 o el 5 % de una proteína H-NOX se oxida después de incubación durante aproximadamente cualquiera de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 o 20 horas a 20 °C.
- 10 Como se usa en el presente documento, "reactividad del NO" se refiere a la velocidad a la que el hierro en el hemo de una proteína de unión a hemo se oxida por NO en presencia de oxígeno a una concentración de proteína 2  $\mu\text{M}$ . Un menor valor numérico para la reactividad del NO en unidades de  $\text{s}^{-1}$  indica una menor reactividad del NO. En diversas realizaciones, la reactividad del NO de una proteína H-NOX es inferior a aproximadamente  $700 \text{ s}^{-1}$  a 20 °C, tal como inferior a aproximadamente  $600 \text{ s}^{-1}$ ,  $500 \text{ s}^{-1}$ ,  $400 \text{ s}^{-1}$ ,  $300 \text{ s}^{-1}$ ,  $200 \text{ s}^{-1}$ ,  $100 \text{ s}^{-1}$ ,  $75 \text{ s}^{-1}$ ,  $50 \text{ s}^{-1}$ ,  $25 \text{ s}^{-1}$ ,  $20 \text{ s}^{-1}$ ,  $10 \text{ s}^{-1}$ ,  $50 \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,8 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,5 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,2 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ s}^{-1}$ ,  $0,8 \text{ s}^{-1}$ ,  $0,7 \text{ s}^{-1}$  o  $0,6 \text{ s}^{-1}$  a 20 °C. En diversas realizaciones, la reactividad del NO de una proteína H-NOX está entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente  $600 \text{ s}^{-1}$  a 20 °C, tal como entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente  $400 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente 0,5 y aproximadamente  $100 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente 0,5 y aproximadamente  $50 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente 0,5 y aproximadamente  $10 \text{ s}^{-1}$ , aproximadamente 1 y aproximadamente  $5 \text{ s}^{-1}$ , o aproximadamente 0,5 y aproximadamente  $2,1 \text{ s}^{-1}$  a 20 °C. En diversas realizaciones, la reactividad de una proteína H-NOX es al menos aproximadamente 10, 100, 1.000 o 10.000 veces inferior a la de la hemoglobina bajo las mismas condiciones, tal como a 20 °C.
- 15 Como se usa en el presente documento, una "velocidad de auto-oxidación" se refiere a la velocidad a la que el hierro en el hemo de una proteína de unión a hemo se auto-oxida. Una menor velocidad de auto-oxidación numérica en unidades de  $\text{s}^{-1}$  indica una menor velocidad de auto-oxidación. En diversas realizaciones, la velocidad de auto-oxidación del hemo de una proteína H-NOX es inferior a aproximadamente  $1,0 \text{ h}^{-1}$  a 37 °C, tal como inferior a aproximadamente cualquiera de  $0,9 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,8 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,7 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,6 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,4 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,3 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,2 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ h}^{-1}$  o  $0,05 \text{ h}^{-1}$  a 37 °C. En diversas realizaciones, la velocidad de auto-oxidación del hemo de una proteína H-NOX está entre aproximadamente 0,006 y aproximadamente  $5,0 \text{ h}^{-1}$  a 37 °C, tal como aproximadamente 0,006 y aproximadamente 1,0  $\text{h}^{-1}$ , 0,006 y aproximadamente 0,9  $\text{h}^{-1}$ , o aproximadamente 0,06 y aproximadamente  $0,5 \text{ h}^{-1}$  a 37 °C.
- 20 Como se usa en el presente documento, una proteína H-NOX mutante tiene (a) una constante de disociación del O<sub>2</sub> o NO, velocidad de asociación ( $k_{as}$  para O<sub>2</sub> o NO) o velocidad de disociación ( $k_{dis}$  para O<sub>2</sub> o NO) dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina, (b) tiene una afinidad del NO más débil (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 veces, 100 veces o 1000 veces más débil) que la de sGC β1, respectivamente, (c) una reactividad del NO con O<sub>2</sub> unido al menos 1000 veces inferior a hemoglobina, (d) un tiempo de retención en plasma *in vivo* de al menos 2, 10, 100 o 1000 veces superior al de la hemoglobina, o (e) cualquier combinación de dos o más de las anteriores.
- 25 Transportadores de O<sub>2</sub> adecuados a modo de ejemplo proporcionan constantes de disociación dentro de dos órdenes de magnitud de la de la hemoglobina, es decir, entre aproximadamente 0,01 y 100 veces, tal como entre aproximadamente 0,1 y 10 veces, o entre aproximadamente 0,5 y 2 veces la de la hemoglobina. Puede usarse varias técnicas establecidas para cuantificar constantes de disociación, tales como las técnicas descritas en el presente documento (Boon, E. M. *et al.* (2005). "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", Nature Chem. Biol. 1:53-59; Boon, E. M. *et al.* (octubre de 2005). "Ligand Discrimination in Soluble Guanylate Cyclase and the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins", Curr. Opin. Chem. Biol. 9(5):441-446; Boon, E. M. *et al.* (2005). "Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors", J. Inorg. Biochem. 99(4):892-902), Vandegriff, K. D. *et al.* (15 de agosto de 2004). "Kinetics of NO and O<sub>2</sub> Binding to a Maleimide Poly/ethylene glycol)-Conjugated Human Haemoglobin", Biochem J. 382(Pt 1):183-189, particularmente con respecto a la medición de constantes de disociación), además de aquellas conocidas para el experto. Transportadores de O<sub>2</sub> a modo de ejemplo proporcionan reactividad del NO baja o minimizada de la proteína H-NOX con O<sub>2</sub> unido, tal como una reactividad del NO inferior a la de la hemoglobina. En algunas realizaciones, la reactividad del NO es mucho menor, tal como al menos aproximadamente 10, 100, 1.000 o 10.000 veces menor que la de la hemoglobina. Puede usarse varias técnicas establecidas para cuantificar la reactividad del NO (Boon, E. M. *et al.* (2005). "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", Nature Chem. Biol. 1:53-59; Boon, E. M. *et al.* (octubre de 2005). "Ligand Discrimination in Soluble Guanylate Cyclase and the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins", Curr. Opin. Chem. Biol. 9(5):441-446; Boon, E. M. *et al.* (2005). "Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors", J. Inorg. Biochem. 99(4):892-902), Vandegriff, K. D. *et al.* (15 de agosto de 2004). "Kinetics of NO and O<sub>2</sub> Binding to a Maleimide Poly/ethylene glycol)-Conjugated Human Haemoglobin", Biochem J. 382(Pt 1):183-189, (particularmente con respecto a la medición de la reactividad del NO), además de aquellas conocidas para el experto. Debido a que la H-NOX de *T. tengcongensis* natural tiene una reactividad del NO tan baja, otras proteínas H-NOX naturales y proteínas H-NOX mutantes pueden tener una reactividad del NO baja similar. Por ejemplo, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis* tiene una reactividad del NO similar a la de H-NOX de *T. tengcongensis* natural.
- 30 Ademá, transportadores de O<sub>2</sub> adecuados proporcionan alta estabilidad o maximizada, particularmente estabilidad *in vivo*. Puede usarse varias métricas de estabilidad, tal como estabilidad oxidativa (por ejemplo, estabilidad a la

auto-oxidación u oxidación por NO), estabilidad a la temperatura y estabilidad *in vivo*. Puede usarse varias técnicas establecidas para cuantificar la estabilidad, tal como las técnicas descritas en el presente documento (Boon, E. M. et al. (2005). "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chem. Biol.* 1:53-59; Boon, E. M. et al. (octubre de 2005). "Ligand Discrimination in Soluble Guanylate Cyclase and the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins", *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9(5):441-446; Boon, E. M. et al. (2005). "Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors", *J. Inorg. Biochem.* 99(4):892-902), además de aquellas conocidas para el experto. Para la estabilidad *in vivo* en plasma, sangre o tejido, métricas de estabilidad a modo de ejemplo incluyen tiempo de retención, velocidad de eliminación y semivida. Se espera que las proteínas H-NOX de organismos termófilos sean estables a altas temperaturas. En diversas realizaciones, los tiempos de retención en plasma son al menos aproximadamente 2, 10, 100 o 1000 veces mayores que los de la hemoglobina (por ejemplo, Bobofchak, K. M. et al. (agosto de 2003). "A Recombinant Polymeric Hemoglobin With Conformational, Functional, And Physiological characteristics of an *in vivo* O<sub>2</sub> transporter", *Am. J. Physiol. Heart Circ-c. Physiol.* 285(2):H549-H561). Como será apreciado por el experto, los sucedáneos de la sangre basados en hemoglobina están limitados por la rápida eliminación de la hemoglobina sin células del plasma debido a la presencia de receptores para la hemoglobina que eliminan la hemoglobina sin células del plasma. Como no hay receptores para proteínas H-NOX en el plasma, se espera que las proteínas H-NOX naturales y mutantes tengan un tiempo de retención en el plasma más largo que el de la hemoglobina. Si se desea, el tiempo de retención en el plasma puede aumentarse PEGilando o reticulando una proteína H-NOX o fusionando una proteína H-NOX con otra proteína usando métodos convencionales (tales como aquellos descritos en el presente documento y aquellos conocidos para el experto).

En diversas realizaciones, la proteína H-NOX tiene una constante de disociación del O<sub>2</sub> entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 1 mM a 20 °C y una reactividad del NO de al menos aproximadamente 10 veces menor a la de la hemoglobina en las misma condiciones, tales como a 20 °C. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene una constante de disociación entre aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 mM a 20 °C y la reactividad del NO es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene una constante de disociación del O<sub>2</sub> dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina y una reactividad del NO al menos aproximadamente 10 veces menor que la de la hemoglobina bajo las mismas condiciones, tal como a 20 °C. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene una k<sub>dis</sub> para el oxígeno entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 200 s<sup>-1</sup> a 20 °C y una reactividad del NO al menos aproximadamente 10 veces menor que la de la hemoglobina bajo las mismas condiciones, tal como a 20 °C. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX tiene una k<sub>dis</sub> para el oxígeno que es inferior a aproximadamente 0,65 s<sup>-1</sup> a 20 °C (tal como entre aproximadamente 0,21 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 0,64 s<sup>-1</sup> a 20 °C) y una reactividad del NO al menos aproximadamente 10 veces menor que la de la hemoglobina bajo las mismas condiciones, tal como a 20 °C. En realizaciones particulares, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 2 nM y aproximadamente 50 μM, aproximadamente 50 nM y aproximadamente 10 μM, aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1,9 μM, aproximadamente 150 nM y aproximadamente 1 μM, o aproximadamente 100 nM y aproximadamente 255 nM a 20 °C. En diversas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 80 nM a 20 °C, tal como entre aproximadamente 20 nM y aproximadamente 75 nM a 20 °C. En algunas realizaciones, la reactividad del NO de la proteína H-NOX es al menos aproximadamente 100 veces inferior o aproximadamente 1.000 veces inferior a la de la hemoglobina bajo las mismas condiciones, tal como a 20 °C. En algunas realizaciones, la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C, tal como inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 400 s<sup>-1</sup>, 300 s<sup>-1</sup>, 200 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 75 s<sup>-1</sup>, 50 s<sup>-1</sup>, 25 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup>, 10 s<sup>-1</sup>, 50 s<sup>-1</sup>, 3 s<sup>-1</sup>, 2 s<sup>-1</sup>, 1,8 s<sup>-1</sup>, 1,5 s<sup>-1</sup>, 1,2 s<sup>-1</sup>, 1,0 s<sup>-1</sup>, 0,8 s<sup>-1</sup>, 0,7 s<sup>-1</sup> o 0,6 s<sup>-1</sup> a 20 °C. En algunas realizaciones, la k<sub>dis</sub> para el oxígeno de la proteína H-NOX está entre 0,01 y 200 s<sup>-1</sup> a 20 °C, tal como aproximadamente 0,1 y aproximadamente 200 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 0,1 y 100 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 1,35 y aproximadamente 23,4 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 1,34 y aproximadamente 18 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 1,35 y aproximadamente 14,5 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 0,21 y aproximadamente 23, 4 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 2 y aproximadamente 3 s<sup>-1</sup>, aproximadamente 5 y aproximadamente 15 s<sup>-1</sup>, o aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1 s<sup>-1</sup>. En algunas realizaciones, la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1,9 μM a 20 °C, y la k<sub>dis</sub> para el oxígeno de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 1,35 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 14,5 s<sup>-1</sup> a 20 °C. En algunas realizaciones, la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C, tal como inferior a aproximadamente cualquiera de 0,9 h<sup>-1</sup>, 0,8 h<sup>-1</sup>, 0,7 h<sup>-1</sup>, 0,6 h<sup>-1</sup>, 0,5 h<sup>-1</sup>, 0,4 h<sup>-1</sup>, 0,3 h<sup>-1</sup>, 0,2 h<sup>-1</sup> o 0,1 1 h<sup>-1</sup>. En algunas realizaciones, la k<sub>dis</sub> para el oxígeno de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 1,35 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 14,5 s<sup>-1</sup> a 20 °C, y la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C. En algunas realizaciones, la k<sub>dis</sub> para el oxígeno de la proteína H-NOX está entre aproximadamente 1,35 s<sup>-1</sup> y aproximadamente 14,5 s<sup>-1</sup> a 20 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C). En algunas realizaciones, la velocidad de auto-oxidación del hemo de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 1 h<sup>-1</sup> a 37 °C, y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a aproximadamente 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C (por ejemplo, inferior a aproximadamente 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> o 1,8 s<sup>-1</sup> a 20 °C).

En algunas realizaciones, la viscosidad de la solución de proteína H-NOX está entre 1 y 4 centipoise (cP). En algunas realizaciones, la presión oncótica coloidal de la solución de proteína H-NOX está entre 20 y 50 mm de Hg.

La Tabla 3 enumera tamaños, afinidades del oxígeno, estabilidades de auto-oxidación, velocidades de reactividad del NO y modificaciones para proteínas H-NOX naturales y mutantes a modo de ejemplo. En la Tabla 3, el tamaño del transportador se refiere al peso molecular de una proteína H-NOX modificada (por ejemplo, PEGilada) o sin modificar.

5

**Tabla 3: Realizaciones a modo de ejemplo para proteínas H-NOX**

Tamaño del transportador	Afinidad del oxígeno	Estabilidad (auto-oxidación)	Reactividad del NO ( $s^{-1}$ )	Decoración de la partícula
>1 MD	<1 nM	1 hora	0,01 a 0,1	Reticulación
0,5 kD a 1 MD	1 nM a 100 nM	1 h a 12 h	0,1 a 1	PEGilación
0,1 kD a 0,5 kD	100 nM a 1 uM	12 h a 48 h	1 a 10	Encapsulación
0,01 kD a 0,1 kD	1 uM a 10 uM	48 h a 2 semanas	10 a 100	

Datos a modo de ejemplo para mutantes particulares se informan en las Tablas 4-12. En la Tablas 4-12,  $\beta 1$  y  $\beta 2$  se refieren a proteínas derivadas de proteínas H-NOX de rata. Como las secuencias de aminoácidos de dominios de  $\beta 1$  H-NOX de mamífero se diferencian como mucho por dos aminoácidos, se esperan resultados similares para las

10 mutaciones correspondientes en otras proteínas  $\beta 1$  H-NOX de mamífero, tales como  $\beta 1$  humana. Como se muestra en la Tabla 4, la introducción de una o más mutaciones en proteínas H-NOX naturales permite alterar la velocidad de auto-oxidación y velocidad de disociación del O<sub>2</sub>. Si se desea, la velocidad de auto-oxidación o velocidad de disociación del O<sub>2</sub> puede alterarse adicionalmente combinando cualquiera de las mutaciones individuales o dobles enumeradas en la Tabla 4 o introduciendo una o más mutaciones adicionales en una proteína H-NOX, como se

15 describe en el presente documento.

**Tabla 4. Se enumeran estabilidad a la auto-oxidación, propiedades de unión del O<sub>2</sub> (tales como velocidad de disociación del O<sub>2</sub>) y restos de enlace de H del bolsillo distal para proteínas H-NOX naturales y mutantes de la clase II**

Proteína	Estabilidad	Actividad de unión de O <sub>2</sub> <sup>b</sup>	Restos del bolsillo distal
<i>Tt</i> H-NOX, una H-NOX procariota y un ligador de O <sub>2</sub> fuerte			
<i>Tt</i> H-NOX	$k_{ox} \sim 0^c$	$k_{dis} = 1,22$	Trp9, Phe78, Tyr140
<i>Tt</i> Y140F	$k_{ox} = 0,05$	$k_{dis} = 15,7^d$	Trp9, Phe78, Phe 140
<i>Tt</i> Y140L	$k_{ox} = 0,19$	$k_{dis} = 20.^d$	Trp9, Phe78, Leu 140
<i>Tt</i> Y140H	$k_{ox} = 0,87$	$k_{dis} = 5,03$	Trp9, Phe78, His140
<i>Tt</i> Y140A	Estable <sup>a</sup>	Complejo parcial <sup>d,e</sup>	Trp9, Phe78, Ala140
<i>Tt</i> W9F	$k_{ox} \sim 0^c$	$k_{dis} = 1,84$	Phe9, Phe78, Tyr140
<i>Tt</i> W9F-Y140L	$k_{ox} = 0,12$	No se forma complejo	Phe9, Phe78, Leu140
<i>Tt</i> W9F-Y140H	$k_{ox} = 0,11$	$k_{dis} = 23,4$	Phe9, Phe78, His140
<i>Tt</i> F78Y-Y140L	$k_{ox} \sim 0^c$	$k_{dis} = 0,83$	Trp9, Tyr78, Leu140
<i>Tt</i> F78Y-Y140F	$k_{ox} \sim 0^c$	$k_{dis} = 1,48$	Trp9, Tyr78, Phe140
Proteínas H-NOX procariotas para las que la proteína natural no se une a O <sub>2</sub>			
<i>L2</i> H-NOX	Estable <sup>a</sup>	No se forma complejo	Phe9, Phe78, Phe142
<i>L2</i> F142Y	Estable <sup>f</sup>	$k_{dis} = 3,68$	Phe9, Phe78, Tyr142
<i>L2</i> F9W-F142Y	Estable <sup>f</sup>	Se une a O <sub>2</sub> <sup>e</sup>	Trp9, Phe78, Tyr142
<i>L1</i> H-NOX	$k_{ox} = 0,31$	No se forma complejo	Leu9, Leu78, Phe142
<i>L1</i> F142Y	$k_{ox} = 1,8$	$k_{dis} = 1,73^d$	Leu9, Leu78, Tyr142
H-NOX eucariotas para las que la proteína natural no se une a O <sub>2</sub>			
$\beta 2(1-217)$	$k_{ox} = 0,18$	No se forma complejo	Leu9, Cys76, He142
$\beta 2(1-217)$ I142Y		g	Leu9, Cys76, Tyr142
$\beta 1(1-194)$	$k_{ox} = 4,3$	No se forma complejo	Leu9, Cys78, Ile145
$\beta 1(1-194)$ I145Y	$k_{ox} = 2,8$	g	Leu9, Cys78, Tyr145
$\beta 1(1-194)$ L9W-I145Y	$k_{ox} \sim 10$	g	Trp9, Cys78, Tyr145
$\beta 1(1-385)$	Estable <sup>e</sup>	No se encuentra complejo	Leu9, Cys78, Ile145
$\beta 1(1-385)$ I145Y	$k_{ox} = 0,72$	$k_{dis} = 2,69$	Leu9, Cys78, Tyr145

$\beta 1(1-385)$ I145H			Leu9, Cys78, His145
$\beta 1(1-385)$ C78Y			Leu9, Tyr78, Ile145
Otras H-NOX predichas que se unen a O <sub>2</sub> como construcción natural			
<i>Dd</i> H-NOX(728-899)	$k_{ox} = 0,98$	$k_{dis} = 5,80$	Phe9, Phe75, Tyr139
<i>Dd</i> Y139L			Phe9, Phe75, Leu139
<i>Cb</i> H-NOX(1-175)	Construcción no estable <sup>h</sup>	g	Trp9, Phe78, Tyr140
<i>Cb</i> H-NOX(1-186)	Ligeramente más estable <sup>i</sup>	g	Trp9, Phe78, Tyr140
<i>Ca</i> H-NOX(1-197)	Construcción no estable <sup>h</sup>	g	Trp9, Phe78, Tyr140
<i>Ca</i> H-NOX(1-183)	Ligeramente más estable <sup>i</sup>	g	Trp9, Phe78, Tyr140
<i>Ce</i> GCY-35(1-252)	Estable	Se une a O <sub>2</sub> <sup>e</sup>	Phe9, Thr78, Tyr144

<sup>a</sup>La construcción es estable a la oxidación (evaluada por la velocidad de auto-oxidación,  $k_{ox}$  [h<sup>-1</sup>] a 37 °C) y/o pérdida de hemo. <sup>b</sup>La actividad de unión de O<sub>2</sub> se evaluó por la velocidad de disociación del O<sub>2</sub> del hemo a 20 °C (s<sup>-1</sup>). <sup>c</sup>Después de 24 horas a 37 °C, todavía no hay indicación de auto-oxidación. <sup>d</sup>Solo una pequeña porción de la proteína forma un complejo con O<sub>2</sub>, la velocidad informada representa la cinética para esta población. <sup>e</sup>La proteína se une a O<sub>2</sub>, pero la  $k_{dis}$  no se determinó. <sup>f</sup>Aunque relativamente estable, esta proteína precipitó a medida que se oxidó, dificultando medir la  $k_{ox}$ . <sup>g</sup>No aplicable debido a la inestabilidad o rápida oxidación. <sup>h</sup>"Construcción no estable" significa que la proteína se oxida inmediatamente en las condiciones probadas. <sup>i</sup>"Ligeramente más estable" significa que la proteína se oxida durante un periodo de minutos a horas, pero no sigue siendo estable más allá de 24 horas en las condiciones probadas.

La Tabla 5 ilustra la alteración de la velocidad de asociación del O<sub>2</sub> ( $k_{as}$ ), velocidad de disociación del O<sub>2</sub> ( $k_{dis}$ ), constante de disociación del O<sub>2</sub> ( $K_D$ ) y velocidad de auto-oxidación ( $k_{ox}$ ) en proteínas H-NOX por la introducción de una o más mutaciones. En algunas realizaciones, cualquiera de las mutaciones individuales o dobles enumeradas

5 en la Tabla 5 se combinan con otra mutación (tal como otra mutación en la Tabla 5 o cualquier otra mutación descrita en el presente documento) para alterar adicionalmente la velocidad de asociación del O<sub>2</sub>, velocidad de disociación del O<sub>2</sub>, constante de disociación del O<sub>2</sub>, velocidad de auto-oxidación, o combinaciones de dos o más de las anteriores.

10

Tabla 5. Constantes cinéticas de unión de O<sub>2</sub> para proteínas hemo de Fe<sup>II</sup> ligado a histidilo

Proteína	$K_D^a$	$k_{as}^b$	$k_{dis}^c$	$k_{ox}^d$	Ref.
<i>Tt</i> H-NOX	$89,7 \pm 6,2$	$13,6 \pm 1,0$	$1,22 \pm 0,09$	e	i
<i>Tt</i> P115A	$21,2 \pm 2,1$	$10,4 \pm 1,1$	$0,22 \pm 0,01$	e	j
<i>Tt</i> I5A	~80		$0,82 \pm 0,03$	0,7	j
<i>Tt</i> I5L	~1000		$9,50 \pm 0,64$	0,6	j
<i>Tt</i> I5L-P115A	~30		$0,28 \pm 0,01$	0,6	j
<i>Tt</i> W9F	$305 \pm 31$	$6,02 \pm 0,62$	$1,84 \pm 0,17$	e	i
<i>Tt</i> Y140F	f	$15,7 \pm 1,4$	$15,7 \pm 9,8$	0,05	j
<i>Tt</i> Y140L	~2000	Seminal	$20,1 \pm 2,0$	0,19	i
<i>Tt</i> Y140H	~500		$5,03 \pm 0,69$	0,87	j
<i>Tt</i> W9F-Y140H	~2500		$23,4 \pm 3,7$	0,11	j
<i>Tt</i> W9F-Y140L	No se observa complejo con O <sub>2</sub>			0,12	i
<i>Tt</i> F78Y-Y140F	~150		$1,48 \pm 0,33$	e	j
<i>Tt</i> F78Y-Y140L	~80		$0,83 \pm 0,17$	e	i
<i>Tt</i> W9F-N74A	Milimolar	muy lenta			j
<i>Dd</i> H-NOX	Milimolar	muy lenta	$7,13 \pm 0,45$	0,14	j
<i>Dd</i> Y139L	No se observa complejo con O <sub>2</sub>				j
$\beta 1(1-385)$ I145Y	70.000,00	0,00004	$2,69 \pm 0,61$	0,72	i
<i>L2</i> F 142Y	$9200 \pm 3000$	$0,40 \pm 0,14$	$3,68 \pm 0,71$		i
<i>Hs</i> Hb beta	267	60	16		n
<i>Hs</i> Hb alfa	560	50	28		k
<i>Sw</i> Mb	880	17	15	0,006	k
<i>Bj</i> FixL	140.000	0,14	20	2,7	i

HemAT-B	720	32	23	0,06	M
<sup>a</sup> constante de disociación a 20 °C (nM); <sup>b</sup> velocidad de asociación del O <sub>2</sub> al hemo a 20 °C (μLM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ); <sup>c</sup> velocidad de disociación del O <sub>2</sub> del hemo a 20 °C (s <sup>-1</sup> ); <sup>d</sup> velocidad de auto-oxidación					

del hemo (h<sup>-1</sup>) a 37 °C; <sup>e</sup>después de 24 horas a 37 °C, todavía no hay indicación de auto-oxidación; <sup>f</sup>solo una pequeña porción de la proteína forma un complejo con O<sub>2</sub>, aunque la cinética para esta población pudo medirse; <sup>g</sup>Boon, E.M. et al. (junio de 2005). "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chemical Biology* 1(1):53-59, <sup>h</sup>datos sin publicar; <sup>i</sup>Springer, B. A. et al. (1994) "Family Physicians Key Partners in Preventing Suicide Among Youth", *Chem. Rev.* 94:699-714; <sup>j</sup>Gilles-Gonzalez et al. (1994) "Heme-Based Sensors, Exemplified for the Kinase FixL, are a New Class of Heme Protein with Distinctive Ligand Binding and Autoxidation", *Biochemistry* 33:8067-8073. <sup>m</sup>Aono, S. et al. (2002) "Resonance Raman and Ligand Binding Studies of the Oxygen-Sensing Signal Transducer Protein HemAT from *Bacillus Subtilis*", *J. Biol. Chem.* 277:13528-13538. <sup>n</sup>Antonini, E. et al. (1971). "Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands", North-Holland Publ., Ámsterdam.

La Tabla 6 ilustra que la velocidad de asociación del O<sub>2</sub>, velocidad de disociación del O<sub>2</sub>, velocidad de auto-oxidación del O<sub>2</sub>, reactividad del NO y estabilidad de complejos Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> en proteínas H-NOX puede alterarse por la introducción de una o más mutaciones. En algunas realizaciones, cualquiera de las mutaciones individuales o dobles

- 5 enumeradas en la Tabla 6 se combinan con otra mutación (tal como otra mutación en la Tabla 6 o cualquier otra mutación descrita en el presente documento) para alterar adicionalmente la velocidad de asociación del O<sub>2</sub>, velocidad de disociación del O<sub>2</sub>, velocidad de auto-oxidación del O<sub>2</sub>, reactividad del NO o estabilidad de complejos Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> en una proteína H-NOX. Como será apreciado por el experto, la introducción de una o más mutaciones adicionales, tales como aquellas descritas en el presente documento, puede usarse para alterar adicionalmente 10 estos valores.

**Tabla 6. Velocidad de asociación del O<sub>2</sub>, velocidad de disociación del O<sub>2</sub>, velocidad de auto-oxidación del O<sub>2</sub>, reactividad del NO y estabilidad de complejos Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> en proteínas H-NOX.**

Proteína	<i>k</i> <sub>as</sub> <sup>a</sup>	<i>k</i> <sub>dis</sub> <sup>b</sup>	<i>k</i> <sub>ox</sub> <sup>c</sup>	Reactividad del NO <sup>d</sup>	Estabilidad del complejo Fe <sup>II</sup> -O <sub>2</sub>
<i>Hs Hb</i>	23	11	0,006	<0,001 s (~ 7.000 s <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	se oxida durante la noche en aire a TA, estable a 4 °C en aire, estable anaeróbica
<i>Tt H-NOX</i>	13,6	1,22	Muy lenta	0,54 ± 0,07 s <sup>-1</sup>	siempre estable
<i>Tt Y140H</i>	~10	5,03	0,87	1,7 ± 0,4 s <sup>-1</sup>	se oxida durante la noche en aire a TA, estable a 4 °C en aire, estable anaeróbica
β1(1-385) I145Y	~105	2,69	0,72	lenta a Fe <sup>III</sup> -NO	se oxida durante la noche en aire a TA, estable a 4 °C en aire, estable anaeróbica

<sup>a</sup>velocidad de asociación del O<sub>2</sub> al hemo a 20 °C (μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>); <sup>b</sup>velocidad de disociación del O<sub>2</sub> del hemo a 20 °C (s<sup>-1</sup>); <sup>c</sup>velocidad de auto-oxidación del hemo (h<sup>-1</sup>) a 37 °C; <sup>d</sup>Para la determinación de reactividades del NO: proteínas purificadas (*Tt* WT (sigla del inglés *wild-type*: natural) HNOX, *Tt* Y140H HNOX, hemoglobina de *Homo sapiens* (*Hs Hb*) se prepararon a 2 M en tampón A y se preparó óxido nítrico (NO) a 200 M en tampón A (tampón A: Hepes 50 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM) a 20°C. Usando espectroscopía de flujo interrumpido, la proteína se mezcló rápidamente con NO en una relación 1:1 con un tiempo de integración de 0,00125 segundos. Las longitudes de onda del cambio máximo se ajustaron a una exponencial simple, midiendo esencialmente la etapa limitante de la velocidad de la oxidación por NO. Los productos finales de la reacción fueron NO férrico para las proteínas H-NOX y acuo férrico para *Hs Hb*. <sup>e</sup>Para *Hs Hb*, la reacción de la proteína con NO fue tan rápida que la reacción se completó en el plazo del tiempo muerto del experimento (0,001 segundos). La reactividad del NO por la hemoglobina es aproximadamente 7.000 s<sup>-1</sup> a 20 °C basado en Eich, R. F. et al. (1996) "Mechanism of NO-Induced Oxidation of Myoglobin and Hemoglobin", *Biochemistry* 35:6976-6983.

- 15 La Tabla 7 demuestra que la constante de disociación para la unión de O<sub>2</sub> puede cambiarse significativamente 20 mutando uno o más restos en proteínas H-NOX. Los valores de K<sub>D</sub> cinética para estas proteínas H-NOX a modo de ejemplo oscilan de 21,20 nM a 1000000,00 nM a 20 °C. Si se desea, la constante de disociación para la unión de O<sub>2</sub> puede alterarse adicionalmente combinando cualquiera de las mutaciones individuales o dobles enumeradas en la Tabla 7 o introduciendo una o más mutaciones adicionales en una proteína H-NOX, como se describe en el presente documento.

**Tabla 7. Proteínas H-NOX naturales y mutantes y proteínas de referencia dispuestas por el valor de la constante de disociación para la unión de O<sub>2</sub>**

Proteína	K <sub>D</sub> cinética (nM)	±	K <sub>D</sub> calculada (nM)
<i>Tt P115A</i>	21,2	2,1	

<i>Tt</i> N74H			27
<i>Tt</i> I5L-P115A			30
<i>Tt</i> N74A			32
<i>Tt</i> I5A			80
<i>Tt</i> F78Y-Y140L			80
<i>Tt</i> H-NOX His6			89
<i>Tt</i> H-NOX	89,7	6,2	
<i>Tt</i> wt (sigla del inglés <i>wild-type</i> : natural)			90
<i>Tt</i> F78Y-Y140F			150
<i>Tt</i> W9Y			218
<i>Tt</i> R135Q His6			252
<i>Hs</i> Hb beta			267
<i>Tt</i> W9F	305	31	
<i>Tt</i> W9H			456
<i>Tt</i> Y140H			500
<i>Hs</i> Hb alfa			560
<i>Tt</i> W9N			573
<i>Tt</i> I75F-His6			713-773
HemAT-B			720
<i>Sw</i> Mb			880
<i>Tt</i> I5L			1000
<i>Tt</i> L144F-His6			1092-1185
<i>Tt</i> Y140L			2000
<i>Tt</i> W9F-Y140H			2500
<i>L2</i> F142Y	9200	3000	
<i>Bj</i> FixL			140000
<i>Tt</i> W9F-N74A			1000000
<i>Dd</i> H-NOX			1000000
$\beta$ 1(1-385) I145Y			1000000

La Tabla 8 demuestra que las velocidades de disociación para la unión de O<sub>2</sub> pueden cambiarse significativamente mutando uno o más restos en proteínas H-NOX. Las velocidades de disociación para estas proteínas H-NOX a modo de ejemplo oscilan de 0,21 s<sup>-1</sup> a 23,4 s<sup>-1</sup> a 20 °C. Si se desea, la velocidad de disociación para la unión de O<sub>2</sub>

5 puede alterarse adicionalmente combinando cualquiera de las mutaciones individuales o dobles enumeradas en la Tabla 8 o introduciendo una o más mutaciones adicionales en una proteína H-NOX, como se describe en el presente documento.

**Tabla 8. Proteínas H-NOX naturales y mutantes y proteínas de referencia dispuestas por el valor de la velocidad de disociación para la unión de O<sub>2</sub>**

Proteína	K <sub>dis</sub> (s <sup>-1</sup> )	±
<i>Tt</i> N74A	0,21	0,004
<i>Tt</i> P115A	0,22	0,01
<i>Tt</i> I5L-P115A	0,28	0,03
<i>Tt</i> N74E	0,38	0,01
<i>Tt</i> N74H	0,44	0,01
<i>Tt</i> I5A	0,82	0,03
<i>Tt</i> F78Y-Y140L	0,83	0,17
<i>Tt</i> H-NOX His6	1,2	0,02

<i>Tt</i> H-NOX	1,22	0,09
<i>Tt</i> F78Y-Y140F	1,48	0,33
<i>L1</i> F142Y	1,73	
<i>Tt</i> W9F	1,84	0,17
$\beta$ 1(1-385) I145Y	2,69	0,61
<i>Tt</i> W9Y	3,07	0,1
<i>Tt</i> R135Q His6	3,56	0,08
<i>L2</i> F 142Y	3,68	0,71
<i>Tt</i> Y140H	5,03	0,69
<i>Tt</i> W9H	6,42	0,11
<i>Dd</i> H-NOX	7,13	0,45
<i>Tt</i> W9N	8,09	0,14
<i>Tt</i> I5L	9,5	0,64
<i>Tt</i> I75F-His6	10,48	0,12
<i>Sw</i> Mb	15	
<i>Tt</i> Y140F	15,7	9,8
<i>Hs</i> Hb beta	16	
<i>Tt</i> L144F-His6	16,06	0,21
<i>Bj</i> FixL	20	
<i>Tt</i> Y140L	20,1	2
<i>HemAT</i> -B	23	
<i>Tt</i> W9F-Y140H	23,4	3,7
<i>Hs</i> Hb alfa	28	

La Tabla 9 demuestra que las velocidades de asociación para la unión de O<sub>2</sub> pueden cambiarse significativamente mutando uno o más restos en proteínas H-NOX. Las velocidades de asociación para estas proteínas H-NOX a modo de ejemplo oscilan de 60  $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a 0,14  $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a 20 °C. Si se desea, la velocidad de asociación para la unión de O<sub>2</sub>

5 puede alterarse adicionalmente combinando cualquiera de las mutaciones individuales o dobles enumeradas en la Tabla 9 o introduciendo una o más mutaciones adicionales en una proteína H-NOX, como se describe en el presente documento.

10 **Tabla 9. Proteínas H-NOX naturales y mutantes y proteínas de referencia dispuestas por el valor de la velocidad de asociación para la unión de O<sub>2</sub>**

Proteína	<i>k</i> <sub>as</sub> ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	±
<i>Hs</i> Hb beta	60	
<i>Hs</i> Hb alfa	50	
<i>HemAT</i> -B	32	
<i>Sw</i> Mb	17	
<i>Tt</i> Y140F	15,7	1,4
<i>Tt</i> H-NOX	13,6	1
<i>Tt</i> P115A	10,4	1,1
<i>Tt</i> W9F	6,02	0,62
<i>L2</i> F142Y	0,4	0,14
<i>Bj</i> FixL	0,14	
<i>Tt</i> W9F-N74A	muy lenta <sup>a</sup>	
<i>Dd</i> H-NOX	muy lenta <sup>a</sup>	
$\beta$ 1(1-385) I145Y	muy lenta <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>Por "muy lenta" se indica más lenta que la hemoglobina, tal como aproximadamente uno a dos órdenes de magnitud más lenta que la hemoglobina.

La Tabla 10 ilustra el efecto de mutaciones de H-NOX a modo de ejemplo en la unión de O<sub>2</sub> y NO. Cada número enumerado en la Tabla 10 para las formas no ligadas a Fe es para un único pico (que está enumerado entre las columnas β y α). Si se une O<sub>2</sub> o NO, este único pico se fracciona en dos picos β y α (que están enumerados bajo las columnas β y α, respectivamente). Si se desea, la unión de O<sub>2</sub> o NO puede alterarse adicionalmente combinando cualquiera de las mutaciones individuales o dobles enumeradas en la Tabla 10 o introduciendo una o más mutaciones adicionales en una proteína H-NOX, como se describe en el presente documento.

**Tabla 10: Posiciones de picos de UV-visible<sup>a</sup> para algunos complejos de proteína hemo de Fe<sup>II</sup> ligado a histidilo**

Proteína	Soret	β	α
<b>Complejo no ligado de Fe<sup>II</sup></b>			
sGC	431		555
β1(1-385) I145Y	429		549
Tt H-NOX	431		565
Tt W9F-Y140L	430		560
Vc H-NOX	429		568
Np H-NOX	430		555
L2 H-NOX	428		557
L2 F142Y	428		557
Tt I75F-His6	431		569
Tt L144F-His6	433		564
Hb	430		555
<b>Complejo de Fe<sup>II</sup>-NO</b>			
sGC	398	537	572
β1(1-385)I145Y	399/416	542	574
Tt H-NOX	420	547	575
Tt W9F-Y140L	423	540	573
Vc H-NOX	398	540	573
Np H-NOX	416/400	543	576
L2 H-NOX	399/416	544	575
L2 F142Y	417	544	578
Tt 175F-His6	418	545	574
Tt L144F-His6	416	544	574
Hb	418	545	575
<b>Complejo de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub></b>			
sGC	No se observa complejo		
β1(1-385) I145Y	416	541	575
Tt H-NOX	416	556	591
Tt W9F-Y 140L	No se observa complejo		
Vc H-NOX	No se observa complejo		
Np H-NOX	No se observa complejo		
L2 H-NOX	No se observa complejo		
L2 F142Y	417	542	577

<i>Tt</i> I75F-His6	416	552	589
<i>Tt</i> L144F-His6	416	544	574
Hb	415	541	577

<sup>a</sup>nm (a 20°C)

La Tabla 11 contiene posiciones de picos de UV-visible para algunos complejos de Fe (II), Fe (III), Fe(II)-NO y Fe(II)-O<sub>2</sub>. Si una hemoglobina o proteína H-NOX es anaerobia, tiene un pico de Soret a ~431 nm, y está en un estado no ligado. Si la proteína H-NOX no se une a O<sub>2</sub>, entonces el pico de Soret no cambiará cuando se añada O<sub>2</sub>. Si la proteína H-NOX se une a O<sub>2</sub>, entonces su pico de Soret se desplazará a entre 414 nm y 418 nm cuando se añada O<sub>2</sub>, que es el mismo desplazamiento que se produce en hemoglobina, indicativo de O<sub>2</sub> unido al hemo.

Los picos de Soret para H-NOX oxidada (Fe(III)) o H-NOX unida a NO en un estado hexacoordinado pueden ser relevantes para el estado de la proteína H-NOX después del almacenamiento o uso. Si la proteína H-NOX no se une a NO, entonces el pico de Soret no cambiará cuando se añada NO. Si la proteína H-NOX se une a NO y forma un complejo de nitrosilo ferroso hexacoordinado, entonces su pico de Soret se desplazará a entre 420 nm y 424 nm cuando se añada NO. Si la proteína H-NOX se une a NO y forma un complejo de nitrosilo ferroso pentacoordinado, el pico de Soret se desplazará a ~399 nm. Si se desea, la unión de O<sub>2</sub> o NO puede alterarse adicionalmente combinando cualquiera de las mutaciones individuales o dobles enumeradas en la Tabla 11 o introduciendo una o más mutaciones adicionales en una proteína H-NOX, como se describe en el presente documento.

15

**Tabla 11. Posiciones de picos de UV-visible para algunos complejos de Fe (II), Fe (III), Fe(II)-NO y Fe(II)-O<sub>2</sub>.**

Complejo	Proteína	Soret	β	α
Fe (II)	<i>Tt</i> wt	430	563	
	<i>Tt</i> W9Y	430	569	
	<i>Tt</i> N74A	433	558	
	<i>Tt</i> N74H	431	561	
	<i>Tt</i> N74A-Y140H	430	567	
	<i>Tt</i> W9H	431	563	
	<i>Tt</i> N74E	433	559	
	<i>Tt</i> W9N	431	569	
	<i>Tt</i> wt His <sub>6</sub>	430	565	
Complejo	Proteína	Soret	β <sup>a</sup>	α
Fe (III)	<i>Tt</i> wt	413	550	585
	<i>Tt</i> W9Y	409	N.A.	
	<i>Tt</i> N74A	416	554	586
	<i>Tt</i> N74H	408	N.A.	
	<i>Tt</i> N74A-Y140H	407	N.A.	
	<i>Tt</i> W9H	407	N.A.	
	<i>Tt</i> N74E	408	N.A.	
	<i>Tt</i> W9N	408	N.A.	
	<i>Tt</i> wt His <sub>6</sub>	413	550	586

<sup>a</sup>"N.A." indica bandas α y β no asignables debido a baja señal a longitudes de onda más largas.

Complejo	Proteína	Soret	β	α
Fe(II)-NO	<i>Tt</i> wt	420	550	578
	<i>Tt</i> W9Y	420	552	576
	<i>Tt</i> N74A	421	572	
	<i>Tt</i> N74H	424	562	
	<i>Tt</i> N74A-Y140H	421	549	576
	<i>Tt</i> W9H	420	548	575
	<i>Tt</i> N74E	422	544	571

	<i>Tt W9N</i>	421	541	576
	<i>Tt wt His<sub>6</sub></i>	420	547	576
Fe(II)-O <sub>2</sub>	<i>Tt wt</i>	416	556	591
	<i>Tt W9Y</i>	416	555	590
	<i>Tt N74A</i>	418	553	589
	<i>Tt N74H</i>	418	553	589
	<i>Tt N74A-Y140H</i>	414	555	584
	<i>Tt W9H</i>	418	556	589
	<i>Tt N74E</i>	417	555	587
	<i>Tt W9N</i>	416	588	553
	<i>Tt wt His<sub>6</sub></i>	416	556	591

La Tabla 12 contiene velocidades de auto-oxidación para proteínas H-NOX de *T. tengcongensis* a modo de ejemplo. Si se desea, la velocidad de auto-oxidación puede alterarse adicionalmente combinando cualquiera de las mutaciones enumeradas en la Tabla 12 o introduciendo una o más mutaciones individuales en una proteína H-NOX,

- 5 como se describe en el presente documento. La media de valores de 2 nm y 3 nm en la Tabla 12 se refieren a un desplazamiento en el pico de Soret de UV-Vis de 2 a 3 nm durante el periodo de tiempo de la observación; este cambio extremadamente pequeño puede ser debido a auto-oxidación.

**Tabla 12. Velocidades de auto-oxidación para proteínas H-NOX de *T. tengcongensis* (*Tt*)**

Proteína	Velocidad de auto-oxidación (25 °C, h <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
<i>Tt wt</i>	Estable
<i>Tt W9Y</i>	Estable
<i>Tt N74A</i>	Estable
<i>Tt N74H</i>	estable a 4 °C, muy lenta a TA (2 nm)
<i>Tt W9H</i>	Estable
<i>Tt N74E</i>	muy lenta a 4 °C (2 nm), lenta a TA
<i>Tt W9N</i>	estable a 4 °C, muy lenta a TA (3 nm)
<i>Tt wt His<sub>6</sub></i>	Estable
<i>Tt I75F-His<sub>6</sub></i>	Estable
<i>Tt L144F-His<sub>6</sub></i>	Estable

<sup>a</sup>"Estable" indica falta de oxidación del hemo después de al menos 24 horas.  
"TA" indica temperatura ambiente.

10

## Ácidos nucleicos de H-NOX

- Se describen ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las proteínas H-NOX mutantes descritas en el presente documento. Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico" se refiere a dos o más desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos en forma tanto mono como bicatenaria y, a menos que se limite de otro modo, engloba análogos conocidos de nucleótidos que se producen naturalmente que se hibridan con ácidos nucleicos de un modo similar a nucleótidos que se producen en la naturaleza. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un ácido nucleico recombinante. "Ácido nucleico recombinante" significa un ácido nucleico de interés que está libre de uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, genes) que, en el genoma que se produce en la naturaleza del organismo del que se deriva el ácido nucleico de interés, flanquean el ácido nucleico de interés. En algunas realizaciones, un ácido nucleico de H-NOX puede estar ligado operativamente a otro ácido nucleico que codifica toda o una parte de otra proteína de forma que el ácido nucleico recombinante codifique una proteína de fusión que incluye una proteína H-NOX (por ejemplo, un dominio de H-NOX con o sin otro dominio de una proteína H-NOX) y toda o parte de otra proteína, tal como albúmina de suero humano. Por tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus autónomamente replicante, o en el ADN

genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc, un fragmento de ADN genómico o un fragmento de ADNc producido por PCR o digestión con endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias.

- 5 En el presente documento también se describen vectores con uno o más ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las proteínas H-NOX mutantes que se describen en el presente documento. Como se usa en el presente documento, un "vector" significa una construcción que puede administrar, y opcionalmente expresar, uno o más ácidos nucleicos de interés en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vectores víricos, vectores de expresión de ADN o ARN, císmidos y vectores de fago. En algunas realizaciones, el 10 vector contiene un ácido nucleico bajo el control de una secuencia de control de la expresión. Una "secuencia de control de la expresión" significa una secuencia de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico de interés. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La secuencia de control de la expresión está ligada operativamente al segmento de ácido nucleico a transcribir.
- 15 En realizaciones particulares, el ácido nucleico incluye un segmento de o la secuencia de ácidos nucleicos entera de cualquiera de los ácidos nucleicos mostrados en FIGS. 2-4D o 8A-8DD. En algunas realizaciones, el ácido nucleico incluye al menos aproximadamente 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o más nucleótidos contiguos de un ácido nucleico de H-NOX y contiene una o más mutaciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones) 20 en comparación con el ácido nucleico de H-NOX del que se derivó. En diversas realizaciones, un ácido nucleico de H-NOX mutante contiene menos de aproximadamente 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 mutaciones en comparación con el ácido nucleico de H-NOX del que se derivó. También pueden utilizarse variantes degeneradas 25 de cualquier ácido nucleico que codifique una proteína H-NOX mutante.
- 25 En el presente documento también se describen una célula o población de células que contienen al menos un ácido nucleico que codifica una proteína H-NOX mutante descrita en el presente documento. Células a modo de ejemplo incluyen células de insecto, planta, levadura, bacterianas y de mamífero. Estas células son útiles para la producción 30 de proteínas H-NOX mutantes usando métodos convencionales, tales como aquellos descritos en el presente documento.

### **30 Formulaciones de proteínas H-NOX**

- Cualquier proteína H-NOX natural o mutante descrita en el presente documento puede usarse para la formulación de 35 composiciones farmacéuticas o no farmacéuticas. Como se ha tratado adicionalmente más adelante, estas formulaciones son útiles en varias aplicaciones terapéuticas e industriales.
- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica incluye una o más proteínas H-NOX naturales o mutantes (tal 40 como cualquiera de las proteínas naturales o mutantes H-NOX descritas en el presente documento) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En diversas realizaciones, la proteína H-NOX es una proteína aislada o purificada. Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se indica cualquier material que, cuando se combina con un principio 45 activo, permite que el componente retenga la actividad biológica y no provoque una respuesta inmunitaria inaceptable (por ejemplo, una alergia grave o choque anafiláctico) basándose en el conocimiento de un médico experto. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Diluyentes a modo de ejemplo para administración de aerosol o parenteral son 50 solución salina tamponada con fosfato o solución salina normal (0,9 %). Las composiciones que comprenden tales vehículos se formulan por métodos convencionales muy conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> ed. Mack Publishing, 2000, particularmente con respecto a formulaciones).
- Aunque puede emplearse cualquier vehículo adecuado conocido para aquellos expertos en la materia en las 55 composiciones farmacéuticas de la presente invención, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración. Las composiciones pueden formularse para cualquier modo apropiado de administración que incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intra-arterial, intravesicular, inhalación, intraperitoneal, intrapulmonar, intramuscular, subcutánea, intra-traqueal, transmucosa, intraocular, intratecal o transdérmica. Para administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo puede incluir, por ejemplo, agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración por vía oral puede emplearse cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa o carbonato de magnesio. También pueden usarse microesferas 60 biodegradables (por ejemplo, polilactato, poliglicolato) como vehículos.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas o no farmacéuticas incluyen un tampón (por ejemplo, solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato, etc.), un hidrato de carbono (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa, dextrano, etc.), un antioxidante, un agente quelante (por ejemplo, EDTA, glutatión, etc.), un conservante, otro compuesto útil para unir y/o transportar oxígeno, un principio inactivo (por ejemplo, un estabilizador, carga, etc.), o combinaciones de dos o más de los anteriores. En algunas realizaciones, la composición se formula como un liofilizado. Las proteínas H-NOX también pueden encapsularse dentro de liposomas o nanopartículas usando tecnología muy conocida. Otras formulaciones a modo de ejemplo que pueden usarse para proteínas H-NOX se describen, por ejemplo, por las patentes de EE.UU. n.º 6.974.795 y 6.432.918, particularmente con respecto a formulaciones de proteínas.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse como parte de una formulación de liberación sostenida (por ejemplo, una formulación tal como una cápsula o esponja que produce una lenta liberación del compuesto tras la administración). Tales formulaciones pueden prepararse generalmente usando tecnología muy conocida y administrarse, por ejemplo, por implantación oral, rectal o subcutánea, o por implantación en el sitio diana deseado. Las formulaciones de liberación sostenida pueden contener una proteína H-NOX dispersada en una matriz de vehículo y/o contenida dentro de un depósito rodeado por una membrana controladora de la velocidad. Los vehículos para su uso dentro de tales formulaciones son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables. En algunas realizaciones, la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación de proteína H-NOX. La cantidad de proteína H-NOX contenida dentro de una formulación de liberación sostenida depende del sitio de implantación, la velocidad y duración esperada de la liberación, y la naturaleza de la afección que va a tratarse o prevenirse.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica contiene una cantidad eficaz de una proteína H-NOX natural o mutante. El término "cantidad eficaz" se refiere a tal cantidad de una o más proteínas descritas en el presente documento que en combinación con sus parámetros de eficacia y toxicidad deben ser eficaces en una forma terapéutica dada basándose en el conocimiento del especialista practicante. Como se entiende en la materia, una cantidad eficaz puede estar en una o más dosis. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de una composición farmacéutica puede o puede no lograrse conjuntamente con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, una cantidad eficaz puede considerarse en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos, y un único agente puede considerarse que se administra en una cantidad eficaz si, conjuntamente con uno o varios de otros agentes, puede ser o se logra un resultado deseable o beneficioso.

Una dosis a modo de ejemplo de hemoglobina como sucedáneo de la sangre es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 5 gramos o más de hemoglobina extracelular por kilogramo de peso corporal del paciente. Por tanto, en algunas realizaciones, una cantidad eficaz de una proteína H-NOX para administración a un ser humano está entre algunos gramos y más de aproximadamente 350 gramos. Otras dosis a modo de ejemplo de una proteína H-NOX incluyen aproximadamente cualquiera de 4,4, 5, 10 o 13 G/DL (en la que G/DL es la concentración de la solución de proteína H-NOX antes de infusión en la infusión) a una velocidad de infusión apropiada tal como aproximadamente 0,5 ml/min (véase, por ejemplo, Winslow, R. Capítulo 12 en Blood Substitutes). Se apreciará que el contenido unitario de principios activos contenidos en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita constituir por sí misma una cantidad eficaz ya que la cantidad eficaz necesaria podría alcanzarse por el efecto combinado de una pluralidad de administraciones. La selección de la cantidad de una proteína H-NOX para incluir en una composición farmacéutica depende de la forma de dosificación utilizada, la afección que está tratándose y el fin particular a lograr según la determinación del experto en la materia en el campo.

Composiciones a modo de ejemplo incluyen proteínas H-NOX recombinantes genéticamente manipuladas que pueden aislarse o purificarse, que comprenden una o más mutaciones que confieren en conjunto unión de ligando de O<sub>2</sub> o NO alterada con respecto a la proteína H-NOX natural correspondiente, y operativas como un transportador de gas en sangre de mamífero fisiológicamente compatible. Por ejemplo, proteínas H-NOX mutantes como se describen en el presente documento.

En el presente documento también se describen sucedáneos de la sangre que comprenden o consisten esencialmente en una o más proteínas H-NOX naturales o mutantes. En la técnica se conocen tampones adecuados y otros componentes para formular sucedáneos de la sangre.

Para reducir o prevenir una respuesta inmunitaria en sujetos humanos a los que se administra una composición farmacéutica pueden usarse proteínas H-NOX humanas (tanto proteínas humanas naturales como proteínas humanas en las que se han introducido una o más mutaciones) u otras proteínas H-NOX no antigenicas (por ejemplo, proteínas H-NOX de mamífero). Para reducir o eliminar la inmunogenicidad de proteínas H-NOX derivadas de fuentes distintas de seres humanos, los aminoácidos en una proteína H-NOX pueden mutarse a los aminoácidos correspondientes en una H-NOX humana. Por ejemplo, uno o más aminoácidos sobre la superficie de la estructura terciaria de una proteína H-NOX no humana pueden mutarse al aminoácido correspondiente en una proteína H-NOX humana.

### Aplicaciones terapéuticas de proteínas H-NOX

Cualquiera de las proteínas H-NOX naturales o mutantes (por ejemplo, proteínas H-NOX aisladas o purificadas) o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede usarse en aplicaciones terapéuticas.

- 5 Pueden seleccionarse proteínas H-NOX particulares para tales aplicaciones basándose en la velocidad de asociación del O<sub>2</sub> deseada, velocidad de disociación del O<sub>2</sub>, constante de disociación para la unión de O<sub>2</sub>, estabilidad del NO, reactividad del NO, velocidad de auto-oxidación, tiempo de retención en plasma, o cualquier combinación de dos o más de los anteriores para la indicación particular que está tratándose. Las proteínas H-NOX pueden usarse para tratar enfermedad cardiovascular, enfermedad neurológica, hipoxia tumoral, pérdida de sangre o heridas. Por ejemplo, una proteína H-NOX de unión de O<sub>2</sub> puede usarse en la mayoría de las situaciones en las que actualmente se utilizan glóbulos rojos o expansores del plasma. Específicamente, la proteína H-NOX puede usarse como sucedáneos de glóbulos rojos para el tratamiento de traumatismo (por ejemplo, campo de batalla, alivio de desastres o accidentes), hemorragias, choque hemorrágico, cirugía (por ejemplo, cirugía de aneurisma abdominal, cirugía ortopédica tal como cirugía de atroplastia de cadera, o cualquier otra cirugía que produce alta pérdida de sangre), hemodilución, usos de extensión de sangre (por ejemplo, auto-donación suplementante), y cualquier otra situación en la que se pierde volumen de sangre o se reduce la capacidad de llevar O<sub>2</sub>. Ejemplos de aplicaciones de reparación de heridas incluyen cicatrización después de radiación (por ejemplo, efecto de oxígeno hiperbárico), reparación posquirúrgica, reparación de úlceras diabéticas y heridas por quemaduras.
- 10
- 15
- 20 También puede usarse una H-NOX de unión de oxígeno para aumentar temporalmente la administración de O<sub>2</sub> durante o después de la pre-donación de sangre autóloga antes de la devolución de la sangre autóloga al individuo (tal como una sustitución de sangre que se extrae durante procedimientos quirúrgicos en los que la sangre del individuo se extrae y se guarda para reinfusión al final de la cirugía o durante la recuperación). En algunas realizaciones, las proteínas H-NOX también actúan de simples expansores del volumen que proporcionan presión oncótica debido a la presencia de la gran molécula de proteína H-NOX.
- 25

Debido a que la distribución en la vasculatura de proteínas H-NOX extracelulares no está limitada por el tamaño de los glóbulos rojos, las proteínas H-NOX de la presente invención pueden usarse para administrar O<sub>2</sub> a áreas en las que no pueden penetrar los glóbulos rojos. Estas áreas pueden incluir cualquier área de tejido que se localice aguas abajo de obstrucciones al flujo de glóbulos rojos tales como áreas aguas abajo de uno o más trombos, oclusiones de células falciformes, oclusiones arteriales, oclusiones vasculares periféricas, globos de angioplastia, instrumentos quirúrgicos, tejidos que padecen privación de oxígeno o son hipóticos, y similares. Adicionalmente, todos los tipos de isquemia de tejido pueden tratarse usando proteínas H-NOX. Tales isquemias de tejido incluyen, por ejemplo, isquemia perioperativa, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular emergente, ataques isquémicos transitorios, aturdimiento miocárdico e hibernación, angina aguda o inestable, angina emergente e infarto de miocardio (por ejemplo, infarto de miocardio por elevación del segmento ST). Otras indicaciones cardiovasculares a modo de ejemplo que pueden tratarse usando proteínas H-NOX incluyen cardioplejia y anemia de células falciformes. Indicaciones diana a modo de ejemplo incluyen afecciones de deficiencia de hemoglobina funcional tales como en las que se indica un sucedáneo de la sangre o transportador de O<sub>2</sub>, que incluyen pérdida de sangre, hipoxia, etc.

Las proteínas H-NOX también pueden usarse como complemento con radiación o quimioterapia para el tratamiento de cáncer. En algunas realizaciones, una proteína H-NOX se usa como complemento de radioterapia en tumores sólidos (por ejemplo, individuos con malos pronósticos pre-metastásicos) o como complemento de terapia PDT en tumores superficiales (por ejemplo, cáncer de colon, pulmón o de piel, o cáncer en otra superficie o localización accesible). Las proteínas H-NOX pueden usarse para tratar anemia, proporcionándose capacidad portadora de oxígeno adicional en un paciente que padece anemia. Indicaciones neurológicas a modo de ejemplo incluyen accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral traumática y lesión de médula espinal. Los métodos y composiciones son aplicables tanto a situaciones agudas (que proporcionan el oxígeno rápido a tejidos o un sitio específico, por ejemplo, infarto agudo de miocardio, oxigenación de tejidos local o sistémica aguda, o transfusión de sangre) y crónicas (por ejemplo, recuperación pos-aguda de infarto cardíaco).

En diversas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas para administrar O<sub>2</sub> a un individuo (por ejemplo, un mamífero, tal como un primate (por ejemplo, un ser humano, un simio inferior, un gorila, un simio superior, un lémur, etc.), un bovino, un equino, un porcino, un canino o un felino) administrando a un individuo en necesidad del mismo una proteína H-NOX natural o mutante en una cantidad suficiente para administrar O<sub>2</sub> al individuo. En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones para llevar o administrar gas en sangre a un individuo tal como un mamífero, que comprende la etapa de administrar (por ejemplo, transfundir, etc.) a la sangre del individuo (por ejemplo, un mamífero) una o más de composiciones de H-NOX. Los métodos para administrar transportadores de O<sub>2</sub> a sangre o tejidos (por ejemplo, sangre o tejidos de mamífero) se conocen en la técnica. En diversas realizaciones, la proteína H-NOX es una apoproteína que puede unirse a hemo o es una holoproteína con hemo unido. La proteína H-NOX puede o puede no tener hemo unido antes de la administración de la proteína H-NOX al individuo. En algunas realizaciones, el O<sub>2</sub> está unido a la proteína H-NOX antes de que se administre al individuo. En otras realizaciones, el O<sub>2</sub> no está unido a la proteína H-NOX antes de la administración de la proteína al individuo y la proteína H-NOX transporta O<sub>2</sub> de una localización en el individuo a otra localización en el individuo.

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar cualquier individuo. Para su uso en el presente documento, a menos que se indique claramente de otro modo, "un individuo" como se usa en el presente documento se refiere a un mamífero que incluye, pero no se limita a, un primate (por ejemplo, un ser humano, simio inferior, gorila, simio superior, lémur, etc.), un bovino, un equino, un porcino, un canino y un felino. Por tanto, las composiciones se usan tanto en el contexto de medicina humana con de veterinaria, que incluye uso en animales agrícolas y mascotas domésticas. El individuo puede haber sido diagnosticado con, ser sospechoso de tener o estar en riesgo de desarrollar una indicación, tal como una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, hipoxia (por ejemplo, hipoxia tumoral), una pérdida de sangre o una herida. El individuo puede presentar uno o más síntomas asociados a la indicación. El individuo puede estar genéticamente o de otro modo predisposto a desarrollar una afección tal.

Como se usa en el presente documento, "en necesidad del mismo" incluye individuos que tienen una afección o enfermedad (tal como una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, hipoxia tal como hipoxia tumoral, una pérdida de sangre o una herida) o están "en riesgo" de la afección o enfermedad. Como se usa en el presente documento, un individuo "en riesgo" es un individuo que está en riesgo de desarrollo de una afección, tal como una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, hipoxia (por ejemplo, hipoxia tumoral), una pérdida de sangre o una herida. Un individuo "en riesgo" puede o puede no tener una enfermedad o afección detectable, y puede o puede no tener enfermedad detectable mostrada antes de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. "En riesgo" indica que un individuo tiene uno o más de los llamados factores de riesgo, que son parámetros medibles que establecen una correlación con el desarrollo de una enfermedad o afección y se conocen en la técnica. Un individuo que tiene uno o más de estos factores de riesgo tiene una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad o afección que un individuo sin este (estos) factor(es) de riesgo. Estos factores de riesgo incluyen, pero no se limitan a, edad, sexo, raza, dieta, historia de enfermedad previa, presencia de enfermedad precursora, consideraciones genéticas (es decir, hereditarias) y exposición medioambiental. La cirugía, presencia en o próxima a zona militar o de guerra, o condiciones que predisponen a un individuo a pérdida de sangre (tal como hemofilia) son factores de riesgo a modo de ejemplo para la pérdida de sangre.

Estos métodos pueden usarse para tratar o retrasar cualquier afección para la que la administración de O<sub>2</sub> es beneficiosa. Por "tratamiento" o "tratar" se indica un enfoque para obtener un resultado beneficioso o deseado, que incluye resultados clínicos. Para los fines de la presente invención, resultados beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas asociados a una afección (tal como, pero no se limita a, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, hipoxia tal como hipoxia tumoral, una pérdida de sangre o una herida), reducción del grado de los síntomas asociados a una afección, o prevención de un empeoramiento de los síntomas asociados a una afección. En algunas realizaciones, el tratamiento con una o más proteínas divulgadas en el presente documento va acompañado por ninguno o menos efectos secundarios que están asociados a las terapias actualmente disponibles.

Como se usa en el presente documento, "retrasar" el desarrollo de una enfermedad o afección significa aplazar, impedir, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad o afección, tal como una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, hipoxia (por ejemplo, hipoxia tumoral), una pérdida de sangre o una herida. Este retraso puede ser de duraciones de tiempo variables, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o individuo que está tratándose. Como es evidente para un experto en la materia, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, englobar prevención, en el que el individuo no desarrolla la enfermedad o afección. Por ejemplo, el método puede reducir la probabilidad de desarrollo de enfermedad en un periodo de tiempo dado y/o reducir el grado de la enfermedad en un periodo de tiempo dado, cuando se compara con no usar el método. En algunas realizaciones, tales comparaciones se basan en estudios clínicos usando un número estadísticamente significativo de sujetos. El desarrollo de enfermedad puede ser detectable usando técnicas clínicas convencionales. El desarrollo también puede referirse a progresión de la enfermedad que puede ser inicialmente indetectable e incluye manifestación, reaparición y aparición.

Se espera que las proteínas H-NOX naturales y mutantes con una K<sub>D</sub> relativamente baja para O<sub>2</sub> (tal como inferior a aproximadamente 80 nM o inferior a aproximadamente 50 nM) sean particularmente útiles para tratar tejidos con baja tensión del oxígeno (tal como tumores, algunas heridas u otras áreas en las que la tensión del oxígeno es muy baja, tal como una p50 inferior a 1 mm de Hg). La alta afinidad de tales proteínas H-NOX por O<sub>2</sub> puede aumentar la duración de tiempo que el O<sub>2</sub> permanece unido a la proteína H-NOX, reduciéndose así la cantidad de O<sub>2</sub> que es liberada antes de que la proteína H-NOX alcance el tejido que va a tratarse.

Aunque no se pretende quedar ligado a teoría alguna particular, la utilidad de un sucedáneo de glóbulos rojos sin células como líquido de reanimación se cree que está influido por la p50 del transportador de O<sub>2</sub>. Por ejemplo, un transportador de O<sub>2</sub> basado en hemoglobina PEGilada llamado MP4 parece administrar O<sub>2</sub> más eficazmente a la microvasculatura que algunos transportadores de O<sub>2</sub> basados en hemoglobina de menor afinidad. Se informa que MP4 tiene una p50 de ~ 5 mm de Hg, (quizás K<sub>D</sub> 100 a 200 nm), y la p50 de la hemoglobina sin estroma es 14 mm de Hg (K<sub>D</sub> ~400 nm). Como MP4 puede administrar oxígeno en tejidos (PO<sub>2</sub> ~ 5 a 10 mm de Hg), es probable que la afinidad de O<sub>2</sub> apropiada por transportadores para administrar O<sub>2</sub> a tejido hipódicos sea inferior a aproximadamente 5 mm de Hg, y quizás inferior a aproximadamente 2 mm de Hg, que se corresponde aproximadamente con una K<sub>D</sub> inferior a aproximadamente 80 nm. Estos valores indican que MP4 ha sido manipulado con una mayor afinidad de O<sub>2</sub>

(inferior a p50) que la hemoglobina nativa. Desde una perspectiva del equilibrio, esto sugiere que las proteínas de unión de O<sub>2</sub> de alta afinidad pueden ser más satisfactorias en la administración de O<sub>2</sub> a áreas de baja tensión de O<sub>2</sub>, tales como la vasculatura periférica.

- 5 En algunas realizaciones para la administración directa de una proteína H-NOX con O<sub>2</sub> unido a un sitio particular en el cuerpo (tal como un tejido, órgano, herida o tumor), la k<sub>dis</sub> para O<sub>2</sub> es más importante que el valor de k<sub>D</sub> debido a que el O<sub>2</sub> ya está unido a la proteína (haciendo que la k<sub>as</sub> sea menos importante) y se necesite liberar oxígeno en o próximo a un sitio particular en el cuerpo (a una velocidad influida por la k<sub>dis</sub>). En algunas realizaciones, la k<sub>dis</sub> también puede ser importante cuando las proteínas H-NOX están en presencia de glóbulos rojos en la circulación, 10 en la que facilitan la difusión de O<sub>2</sub> de glóbulos rojos, y quizás prolonguen la capacidad de glóbulos rojos diluidos de transportar O<sub>2</sub> a otros puntos en la vasculatura.

En algunas realizaciones para la administración de una proteína H-NOX que circula en la circulación sanguínea de un individuo, la proteína H-NOX se une a O<sub>2</sub> en los pulmones y libera O<sub>2</sub> en uno o varios de otros sitios en el cuerpo. 15 Para algunas de estas aplicaciones, el valor de k<sub>D</sub> es más importante que la k<sub>dis</sub> ya que la unión de O<sub>2</sub> está en o próxima al equilibrio. En algunas realizaciones para hemodilución extrema, la k<sub>D</sub> es más importante que la k<sub>dis</sub> cuando la proteína H-NOX es el transportador de O<sub>2</sub> primario debido a que la proteína H-NOX se unirá y liberará O<sub>2</sub> continuamente a medida que se desplaza a través de la circulación. Como la hemoglobina tiene una p50 de 14 mm de Hg, los glóbulos rojos (que actúan de capacitores) tienen una p50 de ~30 mm de Hg, y los HBOC se han desarrollado con intervalos entre 5 mm de Hg y 90 mm de Hg, el intervalo de K<sub>D</sub> óptimo para proteínas H-NOX 20 puede estar por tanto entre ~2 mm de Hg y ~100 mm de Hg para algunas aplicaciones.

También puede usarse proteínas H-NOX para la obtención de imágenes. En particular, la obtención de imágenes de luz (por ejemplo, tomografía de coherencia óptica; véase, por ejemplo, Villard, J. W. (2002). "Use of a Blood Substitute to Determine Instantaneous Murine Right Ventricular Thickening with Optical Coherence Tomography", Circulation 105:1843-1849, particularmente con respecto a tomografía de coherencia óptica) es complicada por los eritrocitos. La perfusión con una solución de H-NOX permite imágenes más claras de la circulación y paredes de vasos debido a que la proteína H-NOX es mucho más pequeña que los eritrocitos. 25

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a un individuo por cualquier medio convencional tal como por administración oral, tópica, intraocular, intratecal, intrapulmonar, intra-traqueal o aerosol; por adsorción de membrana transdérmica o mucosa; o mediante inyección (por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intra-arterial, intravesicular o intramuscular). Las proteínas H-NOX también pueden incluirse en soluciones parenterales de gran volumen para su uso como sucedáneos de la sangre. En realizaciones a modo de ejemplo, la proteína H-NOX se administra a la sangre (por ejemplo, administración a un vaso sanguíneo tal como una vena, arteria o capilar), una herida, un tumor, un tejido hipódico o un órgano hipódico del individuo. 35

40 En algunas realizaciones se usa una formulación de liberación continua sostenida de la composición. La administración de una proteína H-NOX puede producirse, por ejemplo, durante un periodo de segundos a horas dependiendo del fin de la administración. Por ejemplo, como vehículo de administración a la sangre, un transcurso de tiempo de administración a modo de ejemplo es tan rápido como sea posible. Otros transcurcos de tiempo a modo de ejemplo incluyen aproximadamente cualquiera de 10, 20, 30, 40, 60, 90 o 120 minutos. Velocidades de infusión a modo de ejemplo para soluciones de H-NOX como sustitución de sangre son de aproximadamente 30 ml/hora a aproximadamente 13.260 ml/hora, tal como aproximadamente 100 ml/hora a aproximadamente 3.000 ml/hora. Una dosis total a modo de ejemplo de proteína H-NOX es aproximadamente 900 mg/kg administrada 45 durante 20 minutos a 13.260 ml/hora. Una dosis total a modo de ejemplo de proteína H-NOX para un cerdo es aproximadamente 18,9 gramos.

50 Frecuencias de dosificación a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 veces (es decir, diariamente) a la semana. En algunas realizaciones, una proteína H-NOX se administra al menos 2, 3, 4 o 6 veces al día. La proteína H-NOX puede administrarse, por ejemplo, durante un periodo de algunos días o semanas. En algunas realizaciones, la proteína H-NOX se administra durante un periodo prolongado, tal como algunos meses o años. La frecuencia de dosificación de la composición puede ajustarse durante el transcurso del tratamiento basándose en la opinión del médico que administra. 55

Como se observa anteriormente, la selección de cantidades de dosificación para proteínas H-NOX depende de la forma de dosificación utilizada, la frecuencia y número de administraciones, la afección que está tratándose y el fin particular a lograr según la determinación del experto en la materia en el campo. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de una proteína H-NOX para administración a ser humano está entre algunos gramos a más de 350 gramos. 60

En algunas realizaciones, dos o más proteínas H-NOX diferentes se administran simultáneamente, secuencialmente o concurrentemente. En algunas realizaciones, otro compuesto o terapia útil para la administración de O<sub>2</sub> se administra simultáneamente, secuencialmente o concurrentemente con la administración de una o más proteínas H-NOX. 65

Otras aplicaciones terapéuticas a modo de ejemplo para las que pueden usarse proteínas H-NOX se describen, por ejemplo, por las patentes de EE.UU. n.º 6.974.795 y 6.432.918, particularmente con respecto a aplicaciones terapéuticas para transportadores de O<sub>2</sub>.

## 5 Aplicaciones industriales de las proteínas H-NOX

Las proteínas H-NOX y la composición descritas en el presente documento también pueden utilizarse para varias aplicaciones *in vitro* o industriales (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.455.676, en particular con respecto a aplicaciones *in vitro* o industriales). Las proteínas H-NOX particulares pueden seleccionarse para tales aplicaciones a base de la velocidad de asociación del O<sub>2</sub> deseada, la velocidad de disociación del O<sub>2</sub>, la constante de disociación para la unión del O<sub>2</sub>, la estabilidad del NO, la reactividad del NO, la velocidad de auto-oxidación, la semivida o cualquier combinación de dos o más de las aplicaciones particulares anteriores. En diversas realizaciones de las aplicaciones industriales, la proteína H-NOX es una apoproteína que tiene la capacidad de unirse al hemo o es una holoproteína con el hemo unido.

10 Las proteínas H-NOX pueden usarse, por ejemplo, como patrones de referencia para instrumentación analítica que precise de tales patrones de referencia. La administración de O<sub>2</sub> mediante las proteínas H-NOX puede utilizarse para la potenciación del crecimiento celular en un cultivo celular manteniendo o disminuyendo los niveles de O<sub>2</sub> *in vitro*. Para estas aplicaciones, las proteínas H-NOX pueden añadirse a un medio de cultivo celular para administrar O<sub>2</sub> al medio (y a las células en el medio). En algunas realizaciones, el O<sub>2</sub> está unido a la proteína H-NOX antes de añadirla al medio de cultivo celular. En otras realizaciones, el O<sub>2</sub> no está unido a la proteína H-NOX antes de su adición al medio de cultivo celular, y la proteína H-NOX transporta O<sub>2</sub> desde un emplazamiento en el medio a otro emplazamiento en el medio.

15 20 Como alternativa, las células se pueden modificar de forma genética para codificar una proteína H-NOX para aumentar la cantidad de O<sub>2</sub> obtenido por las células. Por ejemplo, las células que expresan un compuesto de interés (tal como una molécula pequeña o proteína útil en aplicaciones farmacéuticas) se pueden modificar de forma genética para producir también una proteína H-NOX que facilite el crecimiento de las células, en especial en condiciones de bajo O<sub>2</sub> (Sullivan *et al.* (2006). "Targeted Oxygen Delivery within Hepatic Hollow Fiber Bioreactors via 25 30 Supplementation of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers," *Biotechnol. Prog.* 22: 374-87; Frey *et al.* (2001). "Dissection of Central Carbon Metabolism of Hemoglobin-Expressing Escherichia Coli by <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Flux Distribution Analysis in Microaerobic Bioprocesses," *Applied and Environmental Biology* 67(2): 680-687). Además, las proteínas H-NOX pueden utilizarse para eliminar O<sub>2</sub> de soluciones que necesitan la eliminación de O<sub>2</sub>.

35

## Kits con proteínas H-NOX

También se describen en el presente documento artículos de fabricación y kits que incluyen cualquiera de las proteínas H-NOX descritas en el presente documento y un embalaje adecuado. En algunas realizaciones, un kit incluye (i) una proteína H-NOX (tal como una proteína H-NOX natural o mutante descrita en el presente documento o formulaciones de la misma, como se describe en el presente documento) y (ii) instrucciones para el uso del kit para administrar O<sub>2</sub> a un individuo. En diversas realizaciones, el kit presenta (i) una proteína H-NOX (tal como una proteína H-NOX natural o mutante descrita en el presente documento o formulaciones de la misma, como se describe en el presente documento) y (ii) instrucciones para el uso del kit para cualquiera de los usos industriales descritos en el presente documento (por ejemplo, el uso de una proteína H-NOX como un patrón de referencia para instrumentación analítica que precise tal patrón de referencia, la potenciación del crecimiento celular en un cultivo celular manteniendo o aumentando los niveles de O<sub>2</sub> *in vitro*, la adición de O<sub>2</sub> a una solución o la eliminación de O<sub>2</sub> de una solución).

40 45 50 55 60 Se conoce en la técnica el embalaje adecuado para las composiciones descritas en el presente documento, e incluyen, por ejemplo, viales (por ejemplo, viales sellados), recipientes, ampollas, botellas, tarros, embalajes flexibles (por ejemplo, Mylar sellado o bolsas de plástico), y similares. Estos artículos de fabricación pueden adicionalmente esterilizarse y/o sellarse. También se proporcionan formas de dosificación unitarias que comprenden las composiciones descritas en el presente documento. Estas formas de dosificación unitarias pueden almacenarse en un embalaje adecuado en dosificaciones unitarias individuales o múltiples, y también pueden adicionalmente esterilizarse y sellarse. Normalmente, las instrucciones suministradas en los kits son instrucciones escritas sobre una etiqueta o prospecto de envase (por ejemplo, un folio de papel incluido en el kit), pero también son aceptables instrucciones leíbles mediante una máquina (por ejemplo, instrucciones portadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico). En general, las instrucciones con referencia al uso de las proteínas H-NOX incluyen información como la dosificación, el programa de dosificación y la vía de administración para el tratamiento o uso industrial pretendido. Adicionalmente, el kit puede comprender una descripción de la selección de un individuo adecuado o tratamiento.

65 Los envases pueden ser dosis unitarias, embalajes a granel (por ejemplo, embalajes de multidosis) o dosis subunitarias. Por ejemplo, también pueden proporcionarse kits que contengan dosificaciones suficientes de las proteínas H-NOX divulgadas en el presente documento para proporcionar tratamiento eficaz para un individuo

durante un período prolongado, tal como aproximadamente cualquiera de una semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses o más. Además, los kits pueden contener dosis unitarias múltiples de las proteínas H-NOX e instrucciones para su uso, embaladas en cantidades suficientes para el almacenamiento y el uso en farmacias, por ejemplo, farmacias de

5 hospitales y farmacias de preparación de compuestos. En algunas realizaciones, el kit incluye una composición seca (por ejemplo, liofilizada) que puede reconstituirse, resuspenderse o rehidratarse para formar una suspensión en general acuosa estable de la proteína H-NOX.

#### Métodos a modo de ejemplo para la producción de proteínas H-NOX

10 En el presente documento también se describen métodos para la producción de cualquiera de las proteínas H-NOX mutantes descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el método implica cultivar una célula que tiene un ácido nucleico que codifica una proteína H-NOX mutante en condiciones adecuadas para la producción de la proteína H-NOX mutante. En diversas realizaciones, la H-NOX mutante también se purifica (tal como purificación 15 de la proteína H-NOX de las células o el medio de cultivo).

Como se observa anteriormente, las secuencias de varias proteínas H-NOX naturales y ácidos nucleicos son 20 conocidas y pueden usarse para generar proteínas H-NOX mutantes y ácidos nucleicos. Técnicas para la mutación, expresión y purificación de proteínas H-NOX recombinantes se han descrito por, por ejemplo, Boon, E.M. et al. (2005). "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", Nature Chemical Biology 1:53-59, y Karow, D. S. et al. (10 de agosto de 2004). "Spectroscopic Characterization of The Soluble Guanylate Cyclase-Like Heme Domains From Vibrio Cholerae And Thermoanaerobacter Tengcongensis", Biochemistry 43(31):10203-10211, particularmente con respecto a la mutación, expresión y purificación de proteínas H-NOX recombinantes. Estas 25 técnicas u otras técnicas convencionales pueden usarse para generar cualquier proteína H-NOX mutante.

En particular, las proteínas H-NOX mutantes descritas en el presente documento pueden generarse por varios 30 métodos que se conocen en la técnica. La mutación puede producirse en tanto al nivel de aminoácidos por modificación química de un aminoácido como al nivel de codones por alteración de la secuencia de nucleótidos que codifica un aminoácido dado. La sustitución de un aminoácido en cualquier posición dada en una proteína puede 35 lograrse alterando el codón que codifica ese aminoácido. Esto puede llevarse a cabo por mutagénesis dirigida a sitio usando, por ejemplo: (i) la técnica de Amersham (kit de mutagénesis de Amersham, Amersham, Inc., Cleveland, Ohio) basado en los métodos de Taylor, J.W. et al. (20 de diciembre de 1985). "The Use of Phosphorothioate-Modified DNA in Restriction Enzyme Reactions to Prepare Nicked DNA", Nucleic Acids Res. 13(24):8749-8764; Taylor, J.W. et al. (20 de diciembre de 1985). "The Rapid Generation of Oligonucleotide-Directed Mutations at High 40 Frequency Using Phosphorothioate-Modified DNA", Nucleic Acids Res. 13(24):8765-8785; Nakamaye, K. L. et al. (22 de diciembre de 1986). "Inhibition of Restriction Endonuclease Nci I Cleavage by Phosphorothioate Groups and its Application to Oligonucleotide-Directed Mutagenesis", Nucleic Acids Res. 14(24):9679-9698; y Dente et al. (1985). En DNA Cloning, Glover, Ed., IRL Press, páginas 791-802, (ii) el kit de Promega (Promega Inc., Madison, Wis.), o (iii) el kit de Biorad (Biorad Inc., Richmond, Calif.), basado en los métodos de Kunkel, T. A. (enero de 1985). "Rapid And Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(2):488-492; Kunkel, T. A. (1987). "Rapid And Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection", Methods Enzymol. 154:367-382; Kunkel, patente de EE.UU. n.º 4.873.192, particularmente con respecto a la mutagénesis de proteínas. La mutagénesis también puede llevarse a cabo por otros medios comercialmente disponibles o no comerciales, tales como aquellos que utilizan mutagénesis dirigida a sitio con oligonucleótidos mutantes.

45 La mutagénesis dirigida a sitio también puede llevarse a cabo usando mutagénesis basada en PCR tal como la descrita en Zhengbin et al. (1992), páginas 205-207, en PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York; Jones, D. H. et al. (febrero de 1990). "A Rapid Method For Site-Specific Mutagenesis And Directional Subcloning by Using the Polymerase Chain Reaction to Generate Recombinant Circles", Biotechniques 8(2):178-183; Jones, D. H. et al. (enero de 1991). "A Rapid Method For Recombination And-Site-Specific Mutagenesis by Placing Homologous Ends on DNA Using Polymerase Chain Reaction", Biotechniques 10(1):62-66, particularmente con respecto a la mutagénesis de proteínas. La mutagénesis dirigida a sitio también 50 puede llevarse a cabo usando mutagénesis en casete con técnicas que son conocidas para aquellos expertos en la materia.

55 Un ácido nucleico de H-NOX mutante puede incorporarse en un vector, tal como un vector de expresión, usando técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden usarse enzimas de restricción para escindir el ácido nucleico de H-NOX mutante y el vector. Luego pueden ligarse los extremos compatibles del ácido nucleico de H-NOX mutante escindido y el vector escindido. El vector resultante puede insertarse en una célula (por ejemplo, una célula de insecto, una célula de planta, una célula de levadura o una célula bacteriana) usando técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación) para la expresión de la proteína H-NOX codificada.

60 En particular, proteínas heterólogas se han expresado en varios sistemas de expresión biológicos tales como células de insecto, células vegetales, células de levadura y células bacterianas. Por tanto, puede utilizarse cualquier sistema de expresión de proteínas biológicas adecuadas para producir grandes cantidades de proteína H-NOX recombinante. En algunas realizaciones la proteína H-NOX (por ejemplo, una proteína H-NOX mutante o natural) es

una proteína aislada. Como se usa en el presente documento, una "proteína aislada" significa una proteína separada de uno o más componentes con los que la proteína está naturalmente asociada en la naturaleza que incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos, lípidos y otras proteínas. Una proteína aislada tampoco se produce en una biblioteca de proteínas, tal como una biblioteca de 2, 5, 10, 20, 50 o más proteínas diferentes. Una proteína aislada puede obtenerse, por ejemplo, por expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica la proteína o por síntesis química de la proteína.

Si se desea, las proteínas H-NOX pueden purificarse usando técnicas convencionales. Como se usa en el presente documento, una "proteína purificada" significa una proteína (por ejemplo, una proteína H-NOX mutante o natural) que ha sido separada de uno o más componentes que están presentes cuando la proteína se produce. En algunas realizaciones, la proteína está al menos aproximadamente el 60 %, en peso, libre de otros componentes que están presentes cuando la proteína se produce. En diversas realizaciones, la proteína está al menos aproximadamente el 75 %, 90 % o el 99 % en peso puro. Una proteína purificada puede obtenerse, por ejemplo, por purificación (por ejemplo, extracción) de una fuente natural, un sistema de expresión recombinante o una mezcla de reacción para síntesis química. Métodos de purificación a modo de ejemplo incluyen inmunoprecipitación, cromatografía en columna tal como cromatografía de inmunoafinidad, purificación por inmunoafinidad de perlas magnéticas e inmunopurificación con un anticuerpo unido a placa, además de otras técnicas conocidas para el experto. La pureza puede ensayarse por cualquier método apropiado, por ejemplo, por cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis de HPLC. En algunas realizaciones, la proteína purificada se incorpora en una composición farmacéutica de la invención o se usa en un método descrito en el presente documento. La composición farmacéutica de la invención puede tener aditivos, transportadores u otros componentes, además de la proteína purificada.

#### Ejemplos

También describen ejemplos, que pretenden ser puramente a modo de ejemplo de la invención y, por tanto, no deben considerarse que limitan la invención de ningún modo, y detallan aspectos y realizaciones de la invención tratados anteriormente. Los ejemplos no pretenden representar que los experimentos más adelante sean todos o los únicos experimentos realizados. A menos que se indique lo contrario, la temperatura es en grados centígrados y la presión es atmosférica o próxima a atmosférica.

#### Ejemplo 1: Producción de proteínas H-NOX naturales y mutantes

Se produjeron, expresaron y purificaron proteínas H-NOX naturales y mutantes usando métodos convencionales, esencialmente como se describe por Boon, E.M. et al. (2005). "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", Nature Chemical Biology 1:53-59 y Karow, D. S. et al. (10 de agosto de 2004). "Spectroscopic Characterization of The Soluble Guanylate Cyclase-Like Heme Domains From Vibrio Cholerae And Thermoanaerobacter Tengcongensis", Biochemistry 43(31):10203-10211, particularmente con respecto a la mutagénesis, expresión y purificación de proteínas H-NOX. La mutagénesis se realizó usando el protocolo QuickChange® de Strategene (La Jolla, CA). La expresión de las proteínas en cultivo celular y posterior purificación de las proteínas se realizó como se describe por Karow, D. S. et al. (10 de agosto de 2004). "Spectroscopic Characterization of The Soluble Guanylate Cyclase-Like Heme Domains From Vibrio Cholerae And Thermoanaerobacter Tengcongensis", Biochemistry 43(31):10203-10211.

#### Ejemplo 2: Caracterización de proteínas H-NOX mutantes como vehículos de administración de oxígeno

##### K<sub>D</sub> cinética: Relación de k<sub>dis</sub> con respecto a k<sub>as</sub>

El valor de K<sub>D</sub> cinética se determinó para proteínas H-NOX naturales y mutantes esencialmente como se describe por Boon, E.M. et al. (2005). "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", Nature Chemical Biology 1:53-59, particularmente con respecto a la medición de las velocidades de asociación del O<sub>2</sub>, velocidades de disociación del O<sub>2</sub>, constantes de disociación para la unión de O<sub>2</sub>, velocidades de auto-oxidación y velocidades de disociación del NO.

##### k<sub>as</sub> (velocidad de asociación del O<sub>2</sub>)

La asociación de O<sub>2</sub> al hemo se midió usando fotólisis de destello a 20 °C. No fue posible evaporar el complejo de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> como resultado de la muy rápida cinética de recombinación geminada; por tanto, el complejo de Fe<sup>II</sup>-CO se sometió a fotólisis de destello con luz de láser a 560 nm (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), produciendo el producto intermedio de Fe<sup>II</sup> pentacoordinado, a lo que le siguió la unión de O<sub>2</sub> molecular a diversas longitudes de onda. Se prepararon muestras de proteína por reducción anaerobia con ditionito 10 mM, seguido de desalación sobre una columna PD-10 (Millipore, Inc., Billerica, MA). Entonces, las muestras se diluyeron a hemo 20 μM en TEA 50 mM, NaCl 50 mM, tampón a pH 7,5, en una cubeta de cuarzo de atmósfera controlada, con un tamaño de 100 μl a 1 ml y una longitud de trayectoria de 1 cm. El gas CO se circuló sobre el espacio de cabeza de esta cubeta durante 10 minutos para formar el complejo de Fe<sup>II</sup>-CO, formación que se verificó por espectroscopía UV-visible (máximo de Soret 423 nm). Entonces, esta muestra se usó tanto para medir la cinética de re-enlace de CO después de la

fotólisis de destello mientras que estaba bajo 1 atmósfera de gas CO, como se abrió y se agitó en aire durante 30 minutos para oxigenar completamente el tampón antes de que la fotólisis de destello observara eventos de re-enlace de CO. La asociación del O<sub>2</sub> al hemo se monitorizó a múltiples longitudes de onda frente al tiempo. Estas trazas se ajustaron con una exponencial simple usando el software Igor Pro (Wavemetrics, Inc., Oswego, OR; última versión de 2005). Esta velocidad fue independiente de la longitud de onda de observación, pero dependiente de la concentración de O<sub>2</sub>. Durante todo el transcurso se usó espectroscopía de UV-visible para confirmar todos los complejos y productos intermedios (Cary 3K, Varian, Inc. Palo Alto, CA). Los datos de absorción transitoria se recogieron usando instrumentos descritos en Dmochowski, I. J. et al. (31 de agosto de 2000). "Enantiomeric Discrimination of Ru-Substrates by Cytochrome P450cam", J Inorg Biochem. 81(3):221-228, particularmente con respecto a la instrumentación. El instrumento tiene un tiempo de respuesta de 20 ns, y los datos se digitalizan a 200 megamuestras s<sup>-1</sup>.

#### *k<sub>dis</sub>* (velocidad de disociación del O<sub>2</sub>)

Para medir la k<sub>dis</sub>, los complejos de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> de proteína (hemo 5 μM), diluidos en TEA 50 mM anaerobio, NaCl 50 mM, tampón a pH 7,5, se mezclaron rápidamente con un volumen igual del mismo tampón (anaerobio) que contenía diversas concentraciones de ditionito y/o gas CO saturante. Los datos se adquirieron en un espectrofotómetro de flujo interrumpido HI-TECH Scientific SF-61 con un baño de temperatura constante Neslab RTE-100 fijado a 20 °C (TGK Scientific LTD., Bradford On Avon, Reino Unido). La disociación del O<sub>2</sub> del hemo se monitorizó como un aumento en la absorbancia a 437 nm, un máximo en el espectro de diferencia de Fe<sup>II</sup> - Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>, o 425 nm, un máximo en el espectro de diferencia de Fe<sup>II</sup> - Fe<sup>II</sup>-CO. Las trazas finales se ajustaron a una exponencial simple usando el software que es parte del instrumento. Cada experimento se hizo un mínimo de seis veces, y las velocidades resultantes se promediaron. Las velocidades de disociación medidas son independientes de la concentración de ditionito (se probaron ditionito 100, 50, 25, 10, 5 y 2,5 mM) e independiente de CO saturante como trampa para las especies reducidas, tanto con como sin ditionito 10 mM presente.

#### K<sub>D</sub> cinética

La K<sub>D</sub> cinética se determina calculando la relación de k<sub>dis</sub> con respecto a k<sub>as</sub> usando las mediciones de k<sub>dis</sub> y k<sub>as</sub> descritas anteriormente.

#### K<sub>D</sub> calculada

Para medir la K<sub>D</sub> calculada se representaron los valores para la k<sub>dis</sub> y la K<sub>D</sub> cinética que se obtuvieron como se ha descrito anteriormente. Se definió una relación lineal entre k<sub>dis</sub> y K<sub>D</sub> cinética por la ecuación (y=mx+b). Entonces, los valores de k<sub>dis</sub> se interpolaron a lo largo de la línea para derivar la K<sub>D</sub> calculada usando Excel: MAC 2004 (Microsoft, Redmond, WA). En ausencia de una k<sub>as</sub> medida, esta interpolación proporciona una forma para relacionar k<sub>dis</sub> con K<sub>D</sub>.

#### 40 Velocidad de auto-oxidación

Para medir la velocidad de auto-oxidación, las muestras de proteína se redujeron anaerobiamente, luego se diluyeron a hemo 5 μM en TEA 50 mM aerobio, NaCl 50 mM, tampón a pH 7,5. Estas muestras se incubaron luego en un espectrofotómetro Cary 3E equipado con un baño de temperatura constante Neslab RTE-100 fijado a 37 °C y se barrieron periódicamente (Cary 3E, Varian, Inc., Palo Alto, CA). La velocidad de auto-oxidación se determinó a partir de la diferencia entre el máximo y el mínimo en el espectro de diferencia de Fe<sup>III</sup> - Fe<sup>II</sup> representado frente al tiempo y se ajustó con una exponencial simple usando Excel: MAC 2004 (Microsoft, Redmond, WA).

#### 50 Velocidad de reacción con NO

La reactividad del NO se midió usando proteínas purificadas (*Tt* WT HNOX, *Tt* Y140H HNOX y hemoglobina de *Homo sapiens* (Hs Hb)) preparada a 2 μM en tampón A y NO preparado a 200 μM en tampón A. (Tampón A: Hepes 50 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM). Los datos se adquirieron en un espectrofotómetro de flujo interrumpido HI-TECH Scientific SF-61 equipado con un baño de temperatura constante Neslab RTE-100 fijado a 20 °C (TGK Scientific LTD., Bradford On Avon, Reino Unido). La proteína se mezcló rápidamente con NO en una relación 1:1 con un tiempo de integración de 0,00125 s. Las longitudes de onda del cambio máximo se ajustaron a una exponencial simple usando el software que es parte del espectrómetro, esencialmente midiendo la etapa limitante de la velocidad de la oxidación por NO. Los productos finales de la reacción fueron NO férrico para las proteínas H-NOX y acuo férrico para Hs Hb.

#### 60 Mediciones de p50

Si se desea, el valor de p50 para las proteínas H-NOX mutantes o naturales puede medirse como se describe por Guarone, R. et al. (septiembre/octubre de 1995). "Performance Characteristics of Hemox-Analyzer For Assessment of The Hemoglobin Dissociation Curve", Haematologica 80(5):426-430, particularmente con respecto a la medición de valores de p50. El valor de p50 valor se determina usando un analizador HemOx. La cámara de medición

empieza al 0 % de oxígeno y se eleva lentamente, incrementalmente, hacia el 100 % de oxígeno. Una sonda de oxígeno en la cámara mide el % de saturación de oxígeno. Una segunda sonda (luz UV-Vis) mide dos longitudes de onda de absorción, ajustadas a los picos alfa y beta de los espectros de UV-Vis de la hemoproteína (por ejemplo, una proteína tal como H-NOX complejada con hemo). Estos picos de absorción aumentan linealmente a medida que

5 la hemoproteína se une oxígeno. Entonces se representa el cambio en porcentaje de sin unir al 100 % unido contra los valores de % de oxígeno para generar una curva. La p50 es el punto en la curva en el que el 50 % de la hemoproteína está unida a oxígeno.

Específicamente, el analizador Hemox (TCS Scientific Corporation, New Hope, PA) determina la curva de 10 disociación de oxihemoproteína (ODC) exponiendo 50  $\mu$ l de sangre o hemoproteína a una presión parcial creciente de oxígeno y desoxigenándola con gas nitrógeno. Un electrodo de oxígeno Clark detecta el cambio en la tensión del oxígeno, que se registra en el eje x de un registrador x-y. El aumento resultante en la fracción de oxihemoproteína 15 se monitoriza simultáneamente por espectrofotometría de longitud de onda dual a 560 nm y 576 nm y se muestra sobre el eje y. Se toman muestras de sangre de la vena antemedia, se anticoagula con heparina y se mantiene a 4 °C sobre hielo húmedo hasta el ensayo. Cincuenta  $\mu$ l de sangre completa se diluyen en 5  $\mu$ l de solución Hemox, 20 un tampón proporcionado por el fabricante que mantiene el pH de la solución a un valor de  $7,4 \pm 0,01$ . El tampón de muestra se extrae en una cubeta que es parte del analizador Hemox y la temperatura de la mezcla se equilibra y se lleva a 37 °C; entonces la muestra se oxigena al 100 % con aire. Después de ajustar el valor de  $pO_2$ , la muestra se desoxigena con nitrógeno; durante el procedimiento de desoxigenación la curva se registra en un papel cuadriculado. El valor de p50 se extrapola en el eje x como el punto al que la saturación de  $O_2$  es el 50 % usando el software que es parte del analizador Hemox. El tiempo requerido para un registro completo es aproximadamente 30 minutos.

25 Los valores de p50 para cualquiera de las proteínas H-NOX pueden compararse con los de la hemoglobina como indicación de la afinidad relativa de la proteína H-NOX por el  $O_2$  en comparación con la de la hemoglobina. La Tabla 13 enumera previamente valores de p50 informados para hemoglobina.

**Tabla 13. Variantes de hemoglobina y sus afinidades de oxígeno informadas**

Nombre	Modificación	$K_D$ (nM)	p50 (mm de Hg)	Referencia/fabricante
Hemoglobina (sin estromas)		~400	14	
Hemoglobina (de RBC)			27	
Hemopure (HBOC-201)	Bovina polimerizada		36	Biopure
Oxiglobina (HBOC-301)	Bovina polimerizada		54	Biopure
Hemospan (MP4)	Maleimida-PEG		5	Sangart
Polyheme	Piridoxal		28-30	Northfield Labs
Hemolink	O-rafinosa		40	Hemosol
Hemassist	Diaspirina		32	Baxter

### 30 Mediciones de la viscosidad

Si se desea, la viscosidad de las soluciones de H-NOX puede medirse usando un reómetro de cono/plato (modelo DV-III, Brookfield; Middleboro, MA) con el husillo del cono CPE-40 a una velocidad de cizallamiento de 200/s. Soluciones con viscosidades entre 1 y 4 centipoise (cP) administradas en experimentos de administración de oxígeno por hemodilución se informan como seguras (Winslow, R. M. et al. (octubre de 2004). "Comparison of PEG-Modified Albumin And Hemoglobin in Extreme Hemodilution in the Rat", J Appl Physiol. 97(4):1527-1534, las patentes de EE.UU. n.º 6.974.795 y 6.432.918, particularmente con respecto a la medición de viscosidad). Por consiguiente, en algunas realizaciones, la viscosidad de la solución de proteína H-NOX está entre 1 y 4 cP.

### 40 Mediciones de la presión oncótica coloide

Si se desea, la presión oncótica coloide puede medirse usando un osmómetro coloide según las instrucciones del fabricante (modelo 4420, Wescor; Logan, UT). Métodos a modo de ejemplo para medir la presión oncótica coloide se describen en Vandegriff, K. D. et al. (noviembre de 1997). "Colloid Osmotic Properties of modified Hemoglobins: 45 Chemically Cross-Linked Versus Polyethylene Glycol Surface-Conjugated", Biophys. Chem. 69(1):23-30, en la malla mundial en "anaesthesia.com/FluidBook/f12\_4.php"; las patentes de EE.UU. n.º 6.974.795 y 6.432.918, particularmente con respecto a medir la presión oncótica coloide. Soluciones con la presión oncótica coloide entre 20 y 50 mm de Hg administradas en experimentos de administración de oxígeno por hemodilución se informan como seguras (Winslow, R. M. et al. (octubre de 2004). "Comparison of PEG-Modified Albumin And Hemoglobin in Extreme 50 Hemodilution in the Rat", J Appl Physiol. 97(4):1527-1534). Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presión oncótica coloide de la solución de proteína H-NOX está entre 20 y 50 mm de Hg.

### Ejemplo 3: Modelo de cirugía para mutantes de H-NOX de transportadores de $O_2$ : Comparación de un panel

**de mutantes de H-NOX de transportadores de O<sub>2</sub> y H-NOX en hemodilución extrema en la rata.**

Para evaluar la capacidad de mutantes de H-NOX para transportar O<sub>2</sub> en un modelo de cirugía puede realizarse una adaptación de un protocolo establecido (Winslow, R. M. et al. (octubre de 2004). "Comparison of PEG-Modified

5 Albumin And Hemoglobin in Extreme Hemodilution in the Rat", J Appl Physiol. 97(4):1527-1534, particularmente con respecto a modelos de cirugía) usando transfusión de intercambio continuo en la rata.

Ratas Sprague-Dawley macho aclimatadas se anestesian por inyección intramuscular de una mezcla para roedor que contiene una mezcla de ketamina (40 mg/kg), acepromazina (0,75 mg/kg) y xilazina (3 mg/kg). Catéteres hechos de tubo de polietileno (PE-50 y PE-10 de Clay Adams) se implantan en ambas arterias femorales y una vena femoral. Los catéteres se externalizan en la base de la cola y se cubren por una vaina para la cola para protección y futuro acceso. Después del cierre de las heridas quirúrgicas, los animales se devuelven a sus jaulas y se deja que se despierten y se recuperen durante 24 h antes del inicio del experimento. A los animales se les da libre acceso a alimento y agua durante la recuperación. Para las medidas hemodinámicas, el catéter de la arteria femoral se conecta mediante una llave de paso y una aguja de calibre 23 a un transductor de presión, y la tensión arterial se muestrea continuamente a 100 Hz.

10 El pH arterial, PCO<sub>2</sub> y PO<sub>2</sub> se miden en un analizar de gas en sangre modelo 248 de Bayer usando muestras de sangre heparinizadas de 100 µl. Se mide ácido láctico en sangre de la arteria femoral usando un analizador de lactato de YSI (Yellow Springs Institute, Yellow Springs, OH). El CO<sub>2</sub> total, bicarbonato convencional (HCO) y exceso de base (EB) se calculan a partir de PCO<sub>2</sub>, pH y la concentración de Hb.

15 Animales completamente conscientes (n = 5 para cada grupo de tratamiento) se colocan en jaulas de Plexiglas. Las cánulas arteriales y venosas se lavan con 200 y 100 µl, respectivamente, de solución salina heparinizada (100 U/ml). Los catéteres arteriales y venosos se conectan a una bomba de infusión (Labconco modelo 4262000, Kansas City, MO), y la transfusión por intercambio se lleva a cabo a una velocidad de 0,5 ml/min durante 100 minutos. Por tanto, el volumen total de solución intercambiada es 50 ml o 2,5 volúmenes de sangre. La bomba peristáltica se opera de forma que la sangre se extraiga a exactamente la misma velocidad a la que se infunde el material de prueba. Las soluciones de prueba se calientan a 37 °C en un baño de agua antes de la infusión y se mantienen calientes durante 30 la infusión por una almohadilla calentadora. Al final del periodo de intercambio de 100 minutos, los animales que sobreviven se monitorizan durante 70 minutos adicionales antes de la eutanasia. Se toman muestras de sangre (0,3 ml) cada 10 minutos para análisis hematológicos y de gas en sangre.

20 Los grupos de tratamiento incluyen animales a los que se administran una o más proteínas H-NOX que han sido previamente probadas para constantes de disociación del NO u O<sub>2</sub>, reactividad del NO, estabilidad, fisiocompatibilidad, o combinaciones de dos o más de las anteriores. Los grupos tratados con H-NOX de glóbulos rojos y penta-almidón proporcionan controles positivos y negativos, respectivamente.

25 Los criterios de valoración objetivos incluyen supervivencia y la aparición de metabolismo anaerobio, señalizado por el desequilibrio ácido-base y la acumulación de ácido láctico. Las proteínas H-NOX que aumentan la velocidad de supervivencia (tal como produciendo un aumento estadísticamente significativo en la velocidad de supervivencia) en comparación con las del grupo de control son útiles para oxigenar tejidos en hemodilución extrema. Se espera que tales proteínas H-NOX también sean útiles para tratar otras indicaciones para las que es beneficiosa la administración de O<sub>2</sub>.

30 Ejemplo 4: **Modelo de traumatismo para mutantes de H-NOX de transportadores de O<sub>2</sub>: Comparación de los efectos de mutantes de H-NOX de transportadores de O<sub>2</sub> y soluciones de hemoglobina recombinantes sobre la tensión arterial, circulación sanguínea intestinal y oxigenación del intestino en un modelo de rata de choque hemorrágico.**

35 Para evaluar la capacidad de proteínas H-NOX para transportar O<sub>2</sub> en un modelo de traumatismo puede realizarse una adaptación de un protocolo establecido (Raat, N. J. et al. (enero de 2005). "Effects of Recombinant-Hemoglobin Solutions rHb2.0 and rhb1.1 on Blood Pressure, Intestinal Blood Flow, And Gut Oxygenation in a Rat Model of Hemorrhagic Shock", J Lab Clin Med. 145(1):21-32, particularmente con respecto a modelos animales de traumatismo) en un modelo de rata de presión fijada (40 mm de Hg) de choque hemorrágico y reanimación.

40 Se anestesian ratas Wistar con una inyección intraperitoneal de una mezcla de 90 mg/kg de ketamina, 0,5 mg/kg de medetomidina y 0,005 mg/kg de sulfato de atropina. La temperatura corporal de cada rata se mantiene entre 36,5 °C y 37,5 °C usando una almohadilla calefactora termocontrolada por una sonda de temperatura dispuesta en el recto de la rata. Además, la pérdida de calor se compensa usando una lámpara de calentamiento cerámica posicionada 40 a 50 cm por encima de la rata. Para la ventilación mecánica se realiza una traqueotomía y una longitud de 3,5 cm de tubo de poli(cloruro de vinilo) 6F se dispone 0,5 cm en la tráquea y se asegura con una sutura. Se usa un ventilador para bebés modificado para ventilar al animal. Para minimizar la pérdida de líquido ventilatorio, un filtro de humedad se coloca antes del tubo de ventilación. Se usa un puerto lateral de este filtro para monitorizar el CO<sub>2</sub> al final de la respiración usando un capnógrafo. Los parámetros de ventilación tales como la fase inspiratoria (0,25 - 0,35) y la velocidad de respiración (50-75 respiraciones/min) se ajustan para mantener los valores de la PCO<sub>2</sub>

arterial entre 35 y 45 mm de Hg durante la cirugía como se comprueba tomando una muestra de sangre de referencia. No se hacen más ajustes hasta el final del experimento.

- 5 Se canulan vasos usando catéter de vena de polietileno de 0,5 x 0,9 mm. Los catéteres se llenan de 0,9 % de solución de NaCl con 25 UI de heparina. El catéter de la arteria carótida derecha se acorta a 20 cm y se ajusta a un transductor de presión para la monitorización continua de la tensión arterial media (MAP) y la frecuencia cardíaca. La MAP se calcula usando esta fórmula:

$$(tensión arterial sistólica - tensión arterial diastólica)/3 + tensión arterial diastólica.$$

- 10 15 Además, la vena yugular se canula para el soporte de líquido con 15 ml/kg/h de lactato de Ringer y 5 ml/kg/h de anestesia de mantenimiento (ketamina 50 mg/kg/h en lactato de Ringer). La arteria femoral se canula para la extracción de sangre y el muestreo de gas en sangre arterial. La vena femoral se canula para la infusión de los líquidos de reanimación y el muestreo de gas en sangre venosa.

- 15 20 25 Se realiza una laparotomía en la línea media en cada rata: el abdomen se cubre con envoltura de Saran para prevenir la evaporación de fluidos corporales. Se perfora un pequeño orificio en la envoltura de Saran para permitir el acceso de la fibra óptica para mediciones de PO<sub>2</sub> microcirculatoria. También se canula una vena ileocecal con un catéter de polietileno de 0,8 mm para el muestreo de sangre venosa mesentérica.

- 20 25 La PO<sub>2</sub> microvascular intestinal se mide usando la técnica previamente descrita de extinción dependiente del oxígeno de fosforescencia de paladio-porfirina. Después de 2,5 a 3 horas de cirugía, meso-tetra(4-carboxifenil)porfina de paladio (II) acoplada a solución de HSA (50 mg en 10 ml de 4 % de solución de albúmina, 4 mmol/l de solución de paladio-porfirina, pH ajustado a 7,4 con HCl) se infunde a una dosis de 12 mg/kg de peso corporal a una velocidad de 9,6 ml/kg/h durante 15 minutos.

- 30 35 La excitación del paladio-porfirina con un pulso de luz produce emisión de fosforescencia con un decaimiento en el tiempo que se relaciona cuantitativamente con la concentración de oxígeno (Vanderkooi, J. M. et al. (25 de abril de 1987). "An Optical Method for Measurement of Dioxygen Concentration Based Upon Quenching of Phosphorescence", J. Biol. Chem. 262(12):5476-5482). Se hacen mediciones de PO<sub>2</sub> microvascular con una fibra óptica posicionada por encima de la parte proximal del íleon. La lámpara de destello se registra antes de infundir el paladio-porfirina y se usa un algoritmo de desconvolución para calcular las concentraciones de oxígeno. Después de la infusión de la solución de paladio-porfirina y 45 minutos de estabilización se toman muestras de sangre de referencia (0,2 ml/muestra) de la arteria femoral, vena femoral y vena mesentérica para la determinación del gas en sangre. Las muestras de sangre se analizan en un analizador de gas en sangre y un hemoxímetro.

- 40 45 50 Se induce choque hemorrágico extrayendo sangre de la arteria femoral en jeringuillas de 3 ml con heparina (25 UI/ml de sangre) a una velocidad de aproximadamente 1 ml/min durante varios minutos hasta que la MAP es aproximadamente 40 mm de Hg. La MAP se mantiene a este nivel usando más extracciones de sangre o infusiones de sangre durante 45 minutos. Justo antes de la reanimación se extraen muestras de sangre (0,2 ml/muestra) de la arteria femoral, vena femoral y vena mesentérica para la determinación de gas en sangre, y se reinfunde una cantidad similar de sangre de rata (recogida durante el choque hemorrágico). Después de este periodo de choque, los animales se asignan aleatoriamente a 1 de 8 grupos de reanimación diferentes. La reanimación se lleva a cabo con proteínas H-NOX naturales o mutantes o con otro transportador de O<sub>2</sub>, tal como solución de hemoglobina recombinante rHb1.1 (Baxter), rHb2.0 (Baxter), hemoglobina sin suero (solución patrón), MP4 (Sangart), Hemopure (Biopure) o Polyheme (Northfield Labs) (Raat, N. J. et al. (enero de 2005). J Lab Clin Med. 145(1):21-32; concentración de reserva 100 mg/ml), todas a una dosis de 20 ml/kg (2 g/kg) infundida a una velocidad de 60 ml/kg/h. Se usa HSA (13,4 % de solución de albúmina) infundida a la misma dosificación (20 ml/kg) y velocidad como control para el efecto del volumen sobre la presión y flujo durante la reanimación. Cuando se completa la reanimación se toman muestras de sangre de 0,2 ml de la arteria femoral, vena femoral y vena mesentérica después de 30, 60, 90 y 120 minutos, y cada vez se devuelve una cantidad similar de sangre de rata.

- 55 H-NOX que producen la misma vasoconstricción sistémica o menos (tal como sustancialmente o significativamente menos), el mismo aumento de MAP o menos, o el mismo aumento en la resistencia vascular mesentérica (MVR) o menos después de la reanimación en comparación con la que se produce por otro transportador de O<sub>2</sub> (tal como rHb1.1, rHb2.0, hemoglobina sin suero, MP4, Hemospan, o Polyheme) o por HAS oncóticamente igual son útiles para tratar choque hemorrágico. Se espera que tales proteínas H-NOX también sean útiles para tratar otras indicaciones para las que es beneficiosa la administración de O<sub>2</sub>.

- 60 A menos que se defina de otro modo, los significados de todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento son aquellos comúnmente entendidos por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Un experto en la materia también apreciará que cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento también puede usarse para poner en práctica o probar la invención.

- 65 Para su uso en el presente documento, a menos que se indique claramente de otro modo, el uso de los términos

"un", "una" y similares se refiere a uno o más.

Referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren al valor o parámetro por sí mismo. Por ejemplo, descripción con referencia a "aproximadamente X" incluye descripción de "X".

Se entiende que el aspecto y realizaciones de la invención descritos en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste" y "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Regents of the University of California Cary, Stephen P.L. Boon, Elizabeth M. Weinert, Emily Winger, Jonathan A. Marletta, Michael A.

15 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE OXÍGENO

<130> 627042000140

<140> PCT/US2007/012184

20 <141> 21-05-2007

<150> US 60/921.505

<151> 22-05-2006

25 <160> 162

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

30 <211> 190

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Majority

<220>

<221> VARIANTE

<222> 33

40 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 1

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

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 190

5

&lt;212&gt; PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

&lt;400&gt; 2

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

10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 190

15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

## ES 2 611 157 T3

&lt;400&gt; 3

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

5 <210> 4  
 <211> 190  
 <212> PRT  
 <213> *Caenorhabditis elegans*

10 &lt;400&gt; 4

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

&lt;210&gt; 5

## ES 2 611 157 T3

<211> 190  
<212> PRT  
<213> *Drosophila melanogaster*

5 <400> 5

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

10 <210> 6  
<211> 190  
<212> PRT  
<213> *Drosophila melanogaster*

15 <400> 6

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

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 190

5

&lt;212&gt; PRT

<213> *Manduca sexta*

&lt;400&gt; 7

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

10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 190

15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 8

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

5 &lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 190

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Clostridium acetobutylicum

10 &lt;400&gt; 9

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

15 &lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 189

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

5 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Majority

&lt;400&gt; 10

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

10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 186

&lt;212&gt; PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

15

&lt;400&gt; 11

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

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 189

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 12

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

10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 188

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Homo sapiens*

## ES 2 611 157 T3

&lt;400&gt; 13

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

5

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 190

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

10

&lt;400&gt; 14

Met	Tyr	Gly	Phe	Ile	Asn	Thr	Cys	Leu	Gln	Ser	Leu	Val	Thr	Glu	Lys
1															15
Phe	Gly	Glu	Glu	Thr	Trp	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Pro	Ala	Glu	Val	Gln
															20
															25
Asp	Val	Phe	Met	Thr	Tyr	Thr	Val	Tyr	Asp	Asp	Ile	Ile	Thr	Ile	Lys
															35
															40
Leu	Ile	Gln	Glu	Ala	Cys	Lys	Val	Leu	Asp	Val	Ser	Met	Glu	Ala	Ile
															50
															55
Leu	Lys	Leu	Phe	Gly	Glu	Tyr	Phe	Phe	Lys	Phe	Cys	Lys	Met	Ser	Gly
															65
															70
Tyr	Asp	Arg	Met	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Gly	Asn	Leu	Thr	Glu	Phe	Ile
															85
															90
Glu	Asn	Leu	Asp	Ala	Leu	Asn	Ser	Tyr	Leu	Ala	Leu	Ser	Tyr	Gln	Glu
															100
															105
Met	Asn	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Met
															115
															120
Leu	Leu	His	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Arg	His	Gly	Leu	Cys	His	Ile	Val	Pro
															130
															135
Gly	Ile	Ile	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Asp	Phe	Phe	Asp	Thr	Asp	Val	Ala
															145
															150
Met	Ser	Ile	Leu	Asp	Met	Asn	Glu	Glu	Val	Glu	Arg	Thr	Gly	Lys	Lys
															165
															170
Glu	His	Val	Val	Phe	Leu	Val	Val	Gln	Lys	Ala	His	Arg	Gln		180
															185
															190

15

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 188

<212> PRT  
 <213> *Manduca sexta*

<400> 15

5

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

<210> 16

<211> 189

10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 16

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

15

## ES 2 611 157 T3

<210> 17  
<211> 183  
<212> PRT  
<213> *Nostoc punctiforme*

5

&lt;400&gt; 17

```

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

```

10

<210> 18  
<211> 189  
<212> PRT  
<213> *Takifugu rubripes*

15

&lt;400&gt; 18

Met Tyr Gly Phe Val Asn His Ala Leu Glu Leu Leu Val Leu Arg Asn

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

<210> 19

<211> 185

<212> PRT

<213> *Anopheles gambiae*

<400> 19

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

10

<210> 20

<211> 188

<212> PRT

ES 2 611 157 T3

<213> *Apis mellifera*

<400> 20

```

Met Tyr Gly Phe Val Asn Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Val Val Lys Thr
          1           5           10          15

```

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

5

<210> 21

<211> 189

<212> PRT

10

<400> 21

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

<210> 22  
<211> 190  
<212> PRT  
<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

5

&lt;400&gt; 22

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

10

<210> 23  
<211> 189  
<212> PRT  
<213> *Oryzias curvinotus*

15

&lt;400&gt; 23

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

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 189

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Oryzias latipes*

&lt;400&gt; 24

Met Tyr Gly Phe Val Asn His Ala Leu Glu Leu Leu Val Leu Arg Asn  
 1 5 10 15  
 Tyr Gly Pro Glu Val Trp Glu Asp Ile Lys Arg Glu Ala Gln Leu Asp  
 20 25 30

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

10

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 189

&lt;212&gt; PRT

<213> *Strongylocentrotus purpuratus*

&lt;400&gt; 25

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

5

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 189

&lt;212&gt; PRT

<213> *Sus scrofa*

10

&lt;400&gt; 26

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

<210> 27  
<211> 184  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Majority

&lt;400&gt; 27

10

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

15

<210> 28  
<211> 172  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 28

Met Tyr Gly Phe Val Asn His Ala Leu Glu Leu Leu Val Ile Arg Asn  
 1 5 10 15  
 Tyr Gly Pro Glu Val Trp Glu Asp Ile Lys Lys Glu Ala Gln Leu Asp

20	25	30	
Glu	Glu	Gly	
Gln	Phe	Leu	
Val	Arg	Ile	
Tyr	Asp	Ile	
Asp	Leu	Val	
Tyr	Asp	Ala	
Asp	Ala	Ala	
Ser	Lys	Val	
Leu	Asn	Leu	
Asn	Leu	Asn	
Ala	Gly		
Gl	Ile	Leu	
Gln	Met	Phe	
		Gly	
		Lys	
		Met	
		Phe	
		Val	
		Phe	
		Cys	
		Gln	
		Glu	
65	70	75	80
Ser	Gly	Tyr	Asp
Tyr	Asp	Thr	Ile
Asp	Thr	Leu	Arg
Thr	Ile	Arg	Val
Ile	Leu	Leu	Gly
Arg	Val	Leu	Ser
Val	Gly	Gly	Asn
Gly	Asn	Asn	Val
Asn	Leu	Leu	Arg
Leu	Asp	Asp	Glu
Asp	Ala	His	
Ala	Leu	Asp	
Leu	His	His	
His	A	His	
100	105	110	
Pro	Gly	Met	Arg
Arg	Ala	Pro	Ser
Ala	Pro	Ser	Phe
Pro	Ser	Phe	Arg
Ser	Phe	Arg	Cys
Phe	Arg	Cys	Thr
Arg	Cys	Thr	Asp
Cys	Thr	Asp	Ala
Thr	Asp	Ala	Glu
Asp	Ala	Glu	Lys
Ala	Glu	Lys	Gly
Glu	Lys	Gly	Leu
Lys	Gly	Leu	Gln
Gly	Leu	Gln	Asp
Leu	Gly	Asp	
Gly	Ile		
Ile	Val		
Val	Ile		
Ile	Gly		
Gly	Ile		
Ile	Ile		
Ile	Lys		
Lys	Thr		
Thr	Val		
Val	Ala		
Ala	Gln		
Gln	Gln		
Gln	Ile		
Ile	His		
His	Gly		
Gly	Thr		
Thr	Ile		
Ile	Asp		
Asp	Met		
Met	Lys		
Lys	Val		
Val	Ile		
Ile	Gln		
Gln	Gln		
Gln	Arg		
Arg	Asn		
Asn	Glu		
Glu			
165	170		

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 172

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 29

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

10

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 170

15 &lt;212&gt; PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

&lt;400&gt; 30

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

Asp Ile Leu Glu Leu Phe Gly Lys Thr Phe Phe Glu Phe Cys Gln Asp  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Tyr Asp Lys Ile Leu Gln Val Leu Gly Ala Thr Pro Arg Asp  
 85 90 95  
 Phe Leu Gln Asn Leu Asp Ala Leu His Asp His Leu Gly Thr Leu Tyr  
 100 105 110  
 Pro Gly Met Arg Ala Pro Ser Phe Arg Cys Thr Glu Lys Asp Gly Glu  
 115 120 125  
 Leu Leu Leu His Tyr Tyr Ser Glu Arg Pro Gly Leu Glu His Ile Val  
 130 135 140  
 Ile Gly Ile Val Lys Ala Val Ala Ser Lys Leu His Gly Val Glu Val  
 145 150 155 160  
 Glu Ile Asp Ile Val Lys Arg Lys Gly Glu  
 165 170

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 170

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

&lt;400&gt; 31

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

10

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 173

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Caenorhabditis elegans*

&lt;400&gt; 32

Met Phe Gly Trp Ile His Glu Ser Phe Arg Gln Leu Val Thr Arg Lys  
 1 5 10 15  
 Tyr Gly Lys Asp Ile Trp Glu Lys Ile Val His Met Ser Lys Phe Glu  
 20 25 30  
 Leu Gly Thr Glu Ser Glu Ile Ala His Tyr Tyr Asn Asp Asp Glu Thr  
 35 40 45  
 Leu Arg Leu Val Asn Ser Met Ala Asn Val Ile Gly Ile Pro Ile Glu  
 50 55 60  
 Glu Ile Trp Glu Ala Tyr Gly Gly Phe Leu Ile Gln Phe Thr Met Glu  
 65 70 75 80  
 Thr Gly Trp Asp Glu Leu Leu Arg Ala Met Ala Pro Asp Leu Glu Gly  
 85 90 95  
 Phe Leu Asp Ser Leu Asp Ser Leu His Tyr Phe Ile Asp His Val Val

100 105 110  
 Tyr Lys Thr Lys Leu Arg Gly Pro Ser Phe Arg Cys Asp Val Gln Ala  
 115 120 125  
 Asp Gly Thr Leu Leu Leu His Tyr Tyr Ser Lys Arg Ser Gly Leu Tyr  
 130 135 140  
 Pro Ile Val Lys Gly Val Val Arg Glu Val Ala Arg Arg Ile Tyr Asp  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Val Val Met Lys Val Gln Glu Arg Lys Gln Glu  
 165 170

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 169

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Nostoc punctiforme*

&lt;400&gt; 33

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

10

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 166

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Caulobacter crescentus*

&lt;400&gt; 34

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

Thr Glu Gly Ala Ala Arg Gln Phe His Glu Val Ile Thr Phe Glu His  
 145 150 155 160  
 Ala Ala Cys Val Glu Lys  
 165

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 167

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Shewanella oneidensis*

&lt;400&gt; 35

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

10

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 169

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Legionella pneumophila*

&lt;400&gt; 36

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

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 166

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Clostridium acetobutylicum*

&lt;400&gt; 37

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

10

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 163

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 38

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

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 188

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 39

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

10

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Clostridium acetobutylicum*

&lt;400&gt; 40

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

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 184

5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Clostridium tetani

&lt;400&gt; 41

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

10

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 172

15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Desulfovibrio desulfuricans

## ES 2 611 157 T3

&lt;400&gt; 42

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

5

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 185

&lt;212&gt; PRT

<213> *Vibrio vulnificus*

10

&lt;400&gt; 43

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

15

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 186

&lt;212&gt; PRT

<213> *Caulobacter crescentus*

&lt;400&gt; 44

5

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

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 180

10

&lt;212&gt; PRT

<213> *Microbulbifer degradans*

&lt;400&gt; 45

15

Met	Lys	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Asn	Asp	Met	Val	Glu	Glu	Val
1							5					10			15
Phe	Ser	Met	Ala	Val	Trp	Asp	Gln	Val	Leu	Ala	Lys	Val	Lys	Pro	Asp

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

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 181

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Vibrio cholerae

&lt;400&gt; 46

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

10

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 181

15 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Shewanella oneidensis

&lt;400&gt; 47

Met Lys Gly Ile Ile Phe Asn Val Leu Glu Asp Met Val Val Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Cys Gly Met Ser Val Trp Asn Glu Leu Leu Glu Lys His Ala Pro Lys  
 20 25 30

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

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 189

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 48

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

10

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 191

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 49

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

5        <210> 50  
       <211> 183  
       <212> PRT  
       <213> *Nostoc punctiforme*

10      &lt;400&gt; 50

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

&lt;210&gt; 51

ES 2 611 157 T3

<211> 187  
<212> PRT  
<213> *Nostoc* sp.

5 <400> 51

Met	Tyr	Gly	Leu	Val	Asn	Lys	Ala	Ile	Gln	Asp	Met	Ile	Ser	Lys	His
1									10						15
His	Gly	Glu	Asp	Thr	Trp	Glu	Ala	Ile	Lys	Gln	Lys	Ala	Gly	Leu	Glu
									20						30
Asp	Ile	Asp	Phe	Phe	Val	Gly	Met	Glu	Ala	Tyr	Ser	Asp	Asp	Val	Thr
									35						45

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

10 <210> 52  
<211> 73  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Majority

<400> 52

```

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

```

20  
<210> 53  
<211> 555  
<212> ADN  
<213> *Thermoanaerobacter tenacitatis*

25 <400> 53

atgaagggga caatcgctgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgggaatgat 60  
 gtgggttgc aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgatga ggttaggaga attttgcta aggtgagtga aaaaactgg 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtg ggaaggcaga acataaaaac tttcagcgaa 240  
 tggttccct cctatttgc agggagaagg ctatgtattttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgtgcaa aagatgccat taaaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtacgattac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 184

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 54

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

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 555

15 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 55

atgaagggga caatcgctgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgggaatgat 60  
 gtgggttgc aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgatga ggttaggaga attttgcta aggtgagtga aaaaactgg 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtg ggaaggcaga acataaaaac tttcagcgaa 240  
 tggttccct cctatttgc agggagaagg ctatgtattttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgtgcaa aagatgccat taaaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtacgattac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

20

<210> 56  
<211> 184  
<212> PRT  
<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

5

&lt;400&gt; 56

```

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

 130          135          140
Ile Glu Gly Ser Ser Lys Phe Phe Lys Glu Glu Ile Ser Val Glu Glu
145          150          155          160
Val Glu Arg Gly Glu Lys Asp Gly Phe Ser Arg Leu Lys Val Arg Ile
165          170          175
Lys Phe Lys Asn Pro Val Phe Glu
180

```

10

<210> 57  
<211> 555  
<212> ADN  
<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

15

&lt;400&gt; 57

```

atgaaggggaa caatcgctcg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgggaatgtat 60
gtgggtgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120
gaggatattg atgacgatga ggttaggaga attttgcta aggtgagtga aaaaacttgt 180
aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtt ggaaggcaga acataaaaac ttccagcgaa 240
tggtttccct cctattttgc agggagaagg ctatgttaattttaatgtat gatggatgag 300
gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360
cctgttgcaa aagatgccat tggaaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtacgatctt 420
tttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480
gtcgaaaagag gcgaaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540
cccgttttg agtga                                         555

```

20

<210> 58  
<211> 184  
<212> PRT  
<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 58

25

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

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 555

&lt;212&gt; ADN

5 <213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 59

atgaaggggga caatcgtcgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cggaaatgat 60

gtgggtgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgtatca ggttaggaga atttttgcta aggtgagtga aaaaactgg 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcaga acataaaaac tttcagcgaa 240  
 tggttccct cctattttgc agggagaagg ctatgtaaatt tttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgc aaagatgcatt tgaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtacgatcac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

10

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 60

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

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 555

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 61

atgaagggga caatcgctgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cggaaatgtat 60  
 gtggttgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgtatga ggttaggaga atttttgcta aggtgagtga aaaaactgg 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcaga acataaaaac tttcagcgaa 240  
 tggttccct cctatttgc agggagaagg ctatgtaaatt tttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggtt tattgcaaag 360  
 cctgttgc aaagatgcac tacgatggag tacgtttcta aaagaaagat gtacgatgcc 420  
 tttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

10

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 184

15 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 62

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

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 555

5 &lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 63

atgaagggga caatcgctgg gacatttata aagaccctga gggaccttta cggaaatgtat 60  
 gtgggttgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gagatattg atgacgtatga gtttaggaga atttttgcata aggtgagtgaa aaaaactgg 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtt ggaaggcaga acataaaaaac ttccagcgaa 240  
 tggtttccct cctattttgc agggagaagg ctatgtaaatt ttttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgcaa aagatgccat tggaaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtaccattac 420  
 tttttaggac ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

10

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 64

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

Met Glu Tyr Val Ser Lys Arg Lys Met Tyr Asp Tyr Phe Leu Gly Leu  
 130 135 140  
 Ile Glu Gly Ser Ser Lys Phe Phe Lys Glu Glu Ile Ser Val Glu Glu  
 145 150 155 160  
 Val Glu Arg Gly Glu Lys Asp Gly Phe Ser Arg Leu Lys Val Arg Ile  
 165 170 175  
 Lys Phe Lys Asn Pro Val Phe Glu  
 180

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 555

5 &lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 65

atgaagggga caatcgctgg gacattata aagaccctga gggaccctta cgggaatgat 60  
 gtgggttcatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgtatga ggttaggaga attttgcta aggtgagtga aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcaga acataaaaaac ttccagcgaa 240  
 tggtttcctt cctatttgc agggagaagg ctatgtattt ttttaatgat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgc aaatgtccat tgaaatggag tacgtttcta aaagaaagat gtacgatttt 420  
 ttttttagggc ttatagaggg tagttctaaa tttttcaagg aagaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

10

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 184

15 &lt;212&gt; PRT

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 66

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

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 555

5

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 67

atgaagggga caatcgctcg gacatttata aagaccctga gggaccttta cgggaatgtat 60  
 gtgggtgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gagatattg atgacgatga gtttaggaga atttttgcta aggtgagtgaa aaaaactgggt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtt ggaaggcaga acataaaaaac tttcagcgtaa 240  
 tggttccct cctattttgc agggagaagg ctatgttaattttttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaaag 360  
 cctgttgc aaagatgccat tggaaatggag tacgtttctaa aaagaaaagat gtacgatcac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaga tgctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

10

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

15

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 68

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

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 555

5

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 69

atgaagggga caatcgctgg gacatttata aagaccctga gggaccctta cggaaatgtat 60  
 gtgggttcatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacaccctctg 120  
 gaggatattg atgacgatga ggttaggaga atttttgcta aggtgagtgta aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcagg caataaaaaac tttcagcgaa 240  
 tggtttccct cctattttgc agggagaagg ctagtgaatt tttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgc aaagatgccat tgaaatggag tacgttctta aaagaaaagat gtacgattac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

10

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

15

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 70

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

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 555

5

&lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 71

atgaagggga caatcgtcg gacatacata aagaccctga gggaccttta cggaaatgtat 60  
 gtgggtgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgatga ggttaggaga atttttgcta aggtgagtgta aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcaga acataaaaaac ttccagcgaa 240  
 tggtttccct cctatttgc agggagaagg ctatgtaaatt ttttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgc当地 aagatgccat taaaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtacgattac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa atttaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

10

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

15

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 72

Met Lys Gly Thr Ile Val Gly Thr Tyr Ile Lys Thr Leu Arg Asp Leu  
 1 5 10 15  
 Tyr Gly Asn Asp Val Val Asp Glu Ser Leu Lys Ser Val Gly Trp Glu  
 20 25 30  
 Pro Asp Arg Val Ile Thr Pro Leu Glu Asp Ile Asp Asp Asp Glu Val  
 35 40 45  
 Arg Arg Ile Phe Ala Lys Val Ser Glu Lys Thr Gly Lys Asn Val Asn  
 50 55 60  
 Glu Ile Trp Arg Glu Val Gly Arg Gln Asn Ile Lys Thr Phe Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Trp Phe Pro Ser Tyr Phe Ala Gly Arg Arg Leu Val Asn Phe Leu Met  
 85 90 95  
 Met Met Asp Glu Val His Leu Gln Leu Thr Lys Met Ile Lys Gly Ala  
 100 105 110  
 Thr Pro Pro Arg Leu Ile Ala Lys Pro Val Ala Lys Asp Ala Ile Glu

115 120 125  
 Met Glu Tyr Val Ser Lys Arg Lys Met Tyr Asp Tyr Phe Leu Gly Leu  
 130 135 140  
 Ile Glu Gly Ser Ser Lys Phe Phe Lys Glu Glu Ile Ser Val Glu Glu  
 145 150 155 160  
 Val Glu Arg Gly Glu Lys Asp Gly Phe Ser Arg Leu Lys Val Arg Ile  
 165 170 175  
 Lys Phe Lys Asn Pro Val Phe Glu  
 180

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 555

5 &lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 73

atgaagggga caatcgctgg gacaaatata aagaccctga gggaccttta cgggaatgtat 60  
 gtgggttcatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgatga ggttaggaga atttttgcta aggtgagtgaa aaaaactgggt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtt ggaaggcaga acataaaaaac tttcagcgaa 240  
 tggttccct cctattttgc agggagaagg ctatgttattttatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgc当地 aagatgc当地 tggaaatggag tacgttctta aaagaaaagat gtacgattac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa tttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

10

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 74

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

<210> 75  
 <211> 555

5 <212> ADN  
 <213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

<400> 75

atgaagggga caatcgctgg gacacacata aagaccctga gggaccttta cgggaatgat 60  
 gtgggttcatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggtatattg atgacgtatga ggttaggaga atttttgcta aggtgagtga aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtt ggaaggcaga acataaaaaac ttccagcgaa 240  
 tggtttccct cctattttgc agggagaagg ctagtgaatt tttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgc当地 aagatgccat taaaatggag tacgtttcta aaagaaaatgtt gtagcattac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

10

<210> 76  
 <211> 184  
 <212> PRT

15 <213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

<400> 76

```

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

```

<210> 77  
<211> 555

<212> ADN  
<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

<400> 77

atgaaggggg cagcagtccgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgaaaaatgtat 60  
gtggttatgt aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacaccctctg 120  
gaggatattg atgacgtatga ggttaggaga attttgcata aggtgagtga aaaaacttgt 180  
aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcaga acataaaaaac tttcagcgaa 240  
tggtttccct ctatatttgc agggagaagg ctatgtat tttaatgtat gatggatgag 300  
gtacacccatc agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaaag 360  
cctgttgc aaagatgccat tgaaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtacgattac 420  
tttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
gtcgaaaagag gcgaaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaaa attaaaaaac 540  
cccgtttttg agtga 555

10

<210> 78  
<211> 184  
<212> PR

15 <213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

<400> 78

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

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 555

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 79

atgaagggga cacttgcgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cggaatgtat 60  
 gtgggtgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgatga gtttaggaga attttgcta aggtgagtga aaaaactgg 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcaga acataaaaaac tttcagcgaa 240  
 tggttccct cctatttgc agggagaagg ctatgtaaatt ttttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgc aaagatgccat tgaatggag tacgttctta aaagaaaagat gtacgattac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaga tgctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

10

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 184

15 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 80

Met	Lys	Gly	Thr	Leu	Val	Gly	Thr	Trp	Ile	Lys	Thr	Leu	Arg	Asp	Leu
1						5				10					15
Tyr	Gly	Asn	Asp	Val	Val	Asp	Glu	Ser	Leu	Lys	Ser	Val	Gly	Trp	Glu
						20				25					30
Pro	Asp	Arg	Val	Ile	Thr	Pro	Leu	Glu	Asp	Ile	Asp	Asp	Asp	Glu	Val
						35				40					45
Arg	Arg	Ile	Phe	Ala	Lys	Val	Ser	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Asn	Val	Asn
						50				55					60
Glu	Ile	Trp	Arg	Glu	Val	Gly	Arg	Gln	Asn	Ile	Lys	Thr	Phe	Ser	Glu
						65				70					80
Trp	Phe	Pro	Ser	Tyr	Phe	Ala	Gly	Arg	Arg	Leu	Val	Asn	Phe	Leu	Met
						85				90					95
Met	Met	Asp	Glu	Val	His	Leu	Gln	Leu	Thr	Lys	Met	Ile	Lys	Gly	Ala
						100				105					110

Thr	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Ala	Lys	Pro	Val	Ala	Lys	Asp	Aia	Ile	Glu
						115				120					125
Met	Glu	Tyr	Val	Ser	Lys	Arg	Lys	Met	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Leu	Gly	Leu
						130				135					140
Ile	Glu	Gly	Ser	Ser	Lys	Phe	Phe	Lys	Glu	Glu	Ile	Ser	Val	Glu	Glu
						145				150					160
Val	Glu	Arg	Gly	Glu	Lys	Asp	Gly	Phe	Ser	Arg	Leu	Lys	Val	Arg	Ile
						165				170					175
Lys	Phe	Lys	Asn	Pro	Val	Phe	Glu								
						180									

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 555

5

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 81

atgaagggga	cacttgcgg	gacatggata	aagaccctga	gggaccttta	cgggaatgtat	60
gtgggttgcgt	aatctttaaa	aagtgtgggt	tgggaaccag	atagggtaat	tacacctctg	120
gaggatattg	atgacgtat	ggttaggaga	atttttgcta	aggtgagtga	aaaaacttgtt	180
aaaaatgtca	acgaaatatg	gagagaggtt	ggaaggcaga	acataaaaaac	tttcagcgaa	240
tggttccct	cctatattgc	agggagaagg	ctagtgaatt	ttttaatgtat	gatggatgag	300
gtacacctac	agcttaccaa	gatgataaaa	ggagccactc	ctgcaaggct	tattgcaaag	360
cctgttgc	aagatgcacat	tgaaaatggag	tacgtttcta	aaagaaaagat	gtacgattac	420
tttttagggc	ttatagaggg	tagttctaaa	ttttcaagg	aagaaatttc	agtggaaagag	480
gtcgaaagag	gcccggaaaga	tggctttca	aggctaaaag	tcaggataaa	attaaaaaac	540
ccccgttttg	agtga					555

10

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

15

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 82

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

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 555

5 &lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 83

atgaagggga caatcgctgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgccaatgtat 60  
 gtgggtgatg aatctttaaa aagtgtgggt tggaaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgatga gtttaggaga atttttgcta aggtgagtga aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtt ggaaggcaga acataaaaaac tttcagcgaa 240  
 tggttccct cctatttgc agggagaagg ctatgtattt ttttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctgccaggtt tattgcaaag 360  
 cctgttgc aaatgcctat taaaatggag tacgtttcta aaagaaaatgtt gtacgattac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtga 555

10

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 84

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

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 567

5

&lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 85

atgaaggggga caatcgctgg gacatggata aagaccctta gggaccttta cggaaatgat 60  
 gtgggttcatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgatga ggtaggaga attttgcta aggtgatgtaa aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtt ggaaggcagg aaataaaaaac ttccagcgaa 240  
 tggtttccct cctattttgc agggagaagg ctagtgaatt ttttatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaaag 360  
 cctgttgc aaatgtccat tggaaatggag tacgtttcta aaagaaaatgtt gtaatgtt 420  
 tttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtataagaa aaattgt 567

10

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 188

&lt;212&gt; PRT

15

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 86

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

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 567

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 87

atgaagggga caatcgctgg gacatggata aagacccctga gggaccctta cggaaatgtat 60  
 gtgggtgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattt atgacgatga ggttaggaga attttgcta aggtgagtga aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcagg ccataaaaaac ttccagcgaa 240  
 tggtttccct ctatatttgc agggagaagg ctagtgaatt ttttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacccac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgcaa aagatgccat tggaaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtacgatcac 420  
 ttttttagggc ttatagaggg tagttctaaa tttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtataagaa aaattga 567

10

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 188

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 88

Met Lys Gly Thr Ile Val Gly Thr Trp Ile Lys Thr Leu Arg Asp Leu  
 1 5 10 15  
 Tyr Gly Asn Asp Val Val Asp Glu Ser Leu Lys Ser Val Gly Trp Glu  
 20 25 30  
 Pro Asp Arg Val Ile Thr Pro Leu Glu Asp Ile Asp Asp Asp Glu Val  
 35 40 45  
 Arg Arg Ile Phe Ala Lys Val Ser Glu Lys Thr Gly Lys Asn Val Asn  
 50 55 60  
 Glu Ile Trp Arg Glu Val Gly Arg Gln Ala Ile Lys Thr Phe Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Trp Phe Pro Ser Tyr Phe Ala Gly Arg Arg Leu Val Asn Phe Leu Met  
 85 90 95  
 Met Met Asp Glu Val His Leu Gln Leu Thr Lys Met Ile Lys Gly Ala

100	105	110
Thr Pro Pro Arg Leu Ile Ala Lys Pro Val Ala Lys Asp Ala Ile Glu		
115	120	125
Met Glu Tyr Val Ser Lys Arg Lys Met Tyr Asp His Phe Leu Gly Leu		
130	135	140
Ile Glu Gly Ser Ser Lys Phe Phe Lys Glu Glu Ile Ser Val Glu Glu		
145	150	155
Val Glu Arg Gly Glu Lys Asp Gly Phe Ser Arg Leu Lys Val Arg Ile		
165	170	175
Lys Phe Lys Asn Pro Val Phe Glu Tyr Lys Lys Asn		
180	185	

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 591

5

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 89

atgaaggggga caatcgctcg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgggaatgtat 60  
 gtgggtgatg aatctttaaa aagtgtgggt tggaaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gagatatttgc atgacgatga gtttaggaga attttgcta aggtgagtgaa aaaaacttgtt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcaga acataaaaaac tttcagcgtaa 240  
 tggttccct cctattttgc agggagaagg ctatgtaaatt tttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacccatc agcttaccaa gatgataaaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaaag 360  
 cctgttgc aaatgtccat taaaatggag tacgtttcta aacagaagat gtacgattac 420  
 tttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaagag gcgaaaaaga tgctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtataagaa aaatctcgag caccaccacc accaccactg a 591

10

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; PRT

15

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 90

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

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 567

5 &lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 91

atgaagggga caatcgtcgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cggaatgtat 60  
 gtgggttgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggttaat tacacctctg 120  
 gagatattg atgacgatga ggttaggaga attttgcta aggtgagtga aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtt ggaaggcagg ccataaaaac tttcagcgaa 240  
 tggttccct cctatttgc agggagaagg ctatgttaattttatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgc当地 aagatgccat tggaaatggag tacgtttcta aaagaaaatgtt gtacgattac 420  
 tttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtataagaa aaattga 567

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 188

10 &lt;212&gt; PRT

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 92

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

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 591

5

&lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 93

atgaagggga caatcgctgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgggaatgtat 60  
 gtgggtgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgatga ggitaggaga attttgcta aggtgagtgaa aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtt ggaaggcagg ccataaaaaac ttccagcgaa 240  
 tggtttccct cctattttgc agggagaagg ctatgtaaatt tttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgcaa aagatgccat taaaatggag tacgtttcta aaagaaagat gtacgattac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtataagaa aaatctcgag caccaccacc accaccactg a 591

10

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; PRT

15

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 94

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

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 567

5 &lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 95

atgaaggggca caatcgctgg gacaaatata aagaccctga gggacccctta cgggaatgtat 60  
 gtgggttcatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgtatga ggttaggaga atttttgcata aggtgagtgaa aaaaactgg 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtt ggaaggcaga acataaaaaac ttccagcgaa 240  
 tggtttccct cctattttgc agggagaagg ctagtgcatt ttttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgcac aagatgcacat tgaaatggag tacgtttctaa aaagaaaagat gtacgattac 420  
 ttttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gcgaaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttttgc agtataagaa aaattgtat 567

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 188

10 &lt;212&gt; PRT

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 96

Met	Lys	Gly	Thr	Ile	Val	Gly	Thr	Asn	Ile	Lys	Thr	Leu	Arg	Asp	Leu
1															15
Tyr	Gly	Asn	Asp	Val	Val	Asp	Glu	Ser	Leu	Lys	Ser	Val	Gly	Trp	Glu
															20
Pro	Asp	Arg	Val	Ile	Thr	Pro	Leu	Glu	Asp	Ile	Asp	Asp	Asp	Glu	Val
															35
Arg	Arg	Ile	Phe	Ala	Lys	Val	Ser	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Asn	Val	Asn
															50
															55
															60

Glu	Ile	Trp	Arg	Glu	Val	Gly	Arg	Gln	Asn	Ile	Lys	Thr	Phe	Ser	Glu
65															80
Trp	Phe	Pro	Ser	Tyr	Phe	Ala	Gly	Arg	Arg	Leu	Val	Asn	Phe	Leu	Met
															85
Met	Met	Asp	Glu	Val	His	Leu	Gln	Leu	Thr	Lys	Met	Ile	Lys	Gly	Ala
															100
Thr	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Ala	Lys	Pro	Val	Ala	Lys	Asp	Ala	Ile	Glu
															115
Met	Glu	Tyr	Val	Ser	Lys	Arg	Lys	Met	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Leu	Gly	Leu
															130
Ile	Glu	Gly	Ser	Ser	Lys	Phe	Phe	Lys	Glu	Glu	Ile	Ser	Val	Glu	Glu
145															150
Val	Glu	Arg	Gly	Glu	Lys	Asp	Gly	Phe	Ser	Arg	Leu	Lys	Val	Arg	Ile
															165
Lys	Phe	Lys	Asn	Pro	Val	Phe	Glu	Tyr	Lys	Lys	Asn				
															180
															185

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 567

5

&lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 97

atgaagggga caatcgctgg gacacatata aagaccctga gggaccttta cgggaatgtat 60  
 gtgggtgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgtatga ggttaggaga attttgcta aggtgagtgta aaaaactgtt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtta ggaaggcaga acataaaaaac ttccagcgaa 240  
 tggttccct cctatttgc agggagaagg ctagtgcatt ttttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgc当地 aagatgc当地 tgaaatggag tacgttgc当地 aagaaaagat gtacgattac 420  
 tttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaaagag gc当地aaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaac 540  
 cccgttttg agtataagaa aaattgtat 567

10

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 188

&lt;212&gt; PRT

15

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 98

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

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 567

5

&lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 99

atgaagggga caatcgctgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cggaaatgtat 60  
 gtgggttgcgt aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgtatga gtttaggaga atttttgcta aggtgagtgta aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcagc atataaaaac ttccagcgaa 240  
 tggtttccct cctatttgc agggagaagg ctatgtaaatt ttttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgcaa aagatgccat tggaaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtacgattac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtgaaagag 480  
 gtcgaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtataagaa aaattga 567

10

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 188

&lt;212&gt; PRT

15

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 100

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

&lt;210&gt; 101

&lt;211&gt; 573

5

&lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 101

atgaagggga caatcgtcgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgggaatgtat 60  
 gtgggttcatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgtatga ggttaggaga attttgcata aggtgagtgtaa aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcaga acttcaaaaac ttccagcgaa 240  
 tggtttccct cctatttgc agggagaagg ctatgtaaatt ttttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgcaa aagatgccat tggaaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtacgattac 420  
 tttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480

gtcgaaaagag gcgaaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agcaccacca ccaccaccac tga 573

10

&lt;210&gt; 102

&lt;211&gt; 190

&lt;212&gt; PRT

15

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 102

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

&lt;210&gt; 103

&lt;211&gt; 573

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 103

atgaaggggca caatcgctgg gacatggata aagaccctga gggaccctta cggaaatgtat 60  
 gtgggttgcgtg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120  
 gaggtatattg atgacgtatga ggttaggaga attttgcta aggtgagtga aaaaacttgt 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtg ggaaggcaga acataaaaaac ttccagcgaa 240  
 tggtttccct cctattttgc agggagaagg ctatgtattt ttttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgcaa aagatgccat tggaaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtacgattac 420  
 ttttaggggt ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtggaaagag gcgaaaaaga tggctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agcaccacca ccaccaccac tga 573

10

&lt;210&gt; 104

&lt;211&gt; 190

15 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Thermoanaerobacter tengcongensis

&lt;400&gt; 104

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

50	55	60
Glu Ile Trp Arg Glu Val	Gly Arg Gln Asn Ile	Lys Thr Phe Ser Glu
65	70	75
Trp Phe Pro Ser Tyr Phe Ala	Gly Arg Arg Leu Val Asn Phe	Leu Met
85	90	95
Met Met Asp Glu Val His Leu Gln	Leu Thr Lys Met Ile Lys Gly	Ala
100	105	110
Thr Pro Pro Arg Leu Ile Ala	Lys Pro Val Ala Lys Asp Ala	Ile Glu
115	120	125
Met Glu Tyr Val Ser Lys Arg	Lys Met Tyr Asp Tyr Phe	Leu Gly Phe
130	135	140
Ile Glu Gly Ser Ser Lys Phe	Phe Lys Glu Glu Ile Ser Val Glu	Glu
145	150	155
Val Glu Arg Gly Glu Lys Asp	Gly Phe Ser Arg Leu Lys Val Arg	Ile
165	170	175
Lys Phe Lys Asn Pro Val Phe	Glu His His His His His	
180	185	190

&lt;210&gt; 105

&lt;211&gt; 591

5 &lt;212&gt; ADN

<213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 105

atgaagggga caatcgctgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgggaatgtat 60  
 gtgggttcatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggttaat tacacctctg 120  
 gaggatattg atgacgatga gtttaggaga atttttgcta aggtgagtga aaaaactgg 180  
 aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggtta ggaaggcaga acataaaaaac tttcagcgaa 240  
 tggttccct cctatttgc agggagaagg ctatgttaatt tttaatgtat gatggatgag 300  
 gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360  
 cctgttgc aaatgcacat taaaatggag tacgtttcta aaagaaaagat gtacgattac 420  
 ttttagggc ttatagaggg tagttctaaa ttttcaagg aagaaaatttc agtggaaagag 480  
 gtcgaaagag gcgaaaaaga tgctttca aggctaaaag tcaggataaa attaaaaaac 540  
 cccgttttg agtataagaa aaatctcgag caccaccacc accaccactg a 591

10

&lt;210&gt; 106

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Thermoanaerobacter tengcongensis*

&lt;400&gt; 106

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

&lt;210&gt; 107

&lt;211&gt; 564

5 &lt;212&gt; ADN

<213> *Legionella pneumophila*

&lt;400&gt; 107

atgatgtcta tgaaaggaat catattcaac gaatttctca attttgtaga aaaaagtcaa 60  
 tcctacaccc tggtagatca aatttattatg gatagtcatt tgaagtccca tgggcctac 120  
 acgtctatcg gtacatactc tcccaaagaa ttatttcaat tggtaaaagc gcttgctatg 180  
 aaaaatggca aaccaacatc agtgatttta caagaatatg gtgagtttatttggaggtt 240  
 tttgaaaaaa aatatcctca attttcagg gaaaaaaaaagt cgggtttca attttggaa 300  
 gcgcttggaaa cacatattca tttcgaagtg aaaaaattgt atgactatac tgaactaccc 360  
 cattttgaat gccaaatatac cagtc当地at caaatggaaa tgatttacac ttcttcgcgt 420  
 cctttggccg attttgcggg aggttataa aaaggtttagtataa taaatatac taaagaaaaac 480  
 atgactatttgcgtgaaa tctgcctgca aaaacaggct ttaaggtaag atttgttatta 540  
 acaaaaaggcg atcctgatga gtga 564

10 &lt;210&gt; 108

&lt;211&gt; 187

&lt;212&gt; PRT

15 <213> *Legionella pneumophila*

&lt;400&gt; 108

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

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 564

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Legionella pneumophila

&lt;400&gt; 109

atgatgtcta tgaaaaggaaat catattcaac gaatttctca attttgtaga aaaaagtgaa 60  
 tcctacaccc tggtagatca aatttattatg gatagtcatt tgaagtccca tggtcctac 120  
 acgtctatcg gtacatactc tcccaaagaa ttatttcaat tggtaaagc gcttgctatg 180  
 aaaaatggca aaccaacatc agtgattttt caagaatatg gtgagtattt gttttaggtt 240  
 tttgcaaaaaa aatatcctca attttcagg gaaaaaaaaatc cggtgtttca atttttggaa 300

gcgcttgaaa cacatattca tttcgaagtg aaaaaattgt atgactatac tgaactaccc 360  
 catttgaat gccaatatca cagtcaaaat caaatggaaa tgatttacac ttcttcgcgt 420  
 ccttggccg attatgcgga aggttaata aaagggtgtt ttaaatatca taaagaaaaac 480  
 atgactattt ttcgtgaaaa tctgcctgca aaaacaggct ttaaggtaag atttgtatta 540  
 acaaaaggcg atcctgatga gtga 564

10

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 187

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Legionella pneumophila

&lt;400&gt; 110

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

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 564

5

&lt;212&gt; ADN

<213> *Legionella pneumophila*

&lt;400&gt; 111

atgatgtctca tgaaaaggaat catatggAAC gaatttctca attttgtaga aaaaagtgaa 60  
 tcctacaccc tggtagatca aatttattatg gatagtcatt tgaagtccca tgggcctac 120  
 acgtctatcg gtacatactc tcccaaagaa ttatttcaat tggtaaagc gcttgctatg 180  
 aaaaatggca aaccaacatc agtgatttta caagaatatg gtgagttt gtttggagg 240  
 tttgcaaaaa aatatccctca atttttcagg gaaaaaaaaat cgggtttca atttttggaa 300  
 gogcttggaaa cacatattca tttcgaagtg aaaaaattgt atgactatac tgaactaccc 360  
 cattttgaat gccaaatatca cagtcaaat caaatggaaa tgatttacac ttcttcgcgt 420  
 ccttggccg attatgcgga aggttaata aaagggtgta taaaatatca taaaagaaaac 480  
 atgactattt ttcgtggaaa tctgcctgca aaaacaggct ttaaggtaag atttgtatta 540  
 acaaaaaggcg atcctgatga gtga 564

10

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 187

&lt;212&gt; PRT

15

<213> *Legionella pneumophila*

&lt;400&gt; 112

Met Met Ser Met Lys Gly Ile Ile Trp Asn Glu Phe Leu Asn Phe Val  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Ser Glu Ser Tyr Thr Leu Val Asp Gln Ile Ile Met Asp Ser  
 20 25 30

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

<210> 113

<211> 543

<212> ADN

<213> *Legionella pneumophila*

<400> 113

atgaaaggta tcgtttttac ctcccttaat gacatgatta tagaacaatt tggcatagaa 60  
acctgggacc aactcgatc ctcactagac cttccaagtgtt gatggaaatgtt tacagcaggc 120  
ggcacttact cggtatacaga atttcagcaat ttgattaagg ccattgcgaa gaggaccaat 180  
cagcacgctt ctgtttttttt agaggcctt ggtgaataca tgtttccat cttatcgagt 240  
aagtgcgcaa tttttttaaa aaaggacatg acattaaaag aatttttaaa aagcattgtat 300  
ggaacaattc atgtggaaatg agaaaaatgtt taccggatgtt aaacattacc taccatttagc 360  
tatgaagagc ctgtgtcaaa ccaattggtt atgggtgtatc gatcgcatag aagactctgt 420  
cattttgcaat tggggctcat ccagggagca ggcacacatt taaaaaagaa aattaccatt 480  
aagcagactc actgcatgtt aaaaaaagat gatcattgtc gtttggagat tacctttgag 540  
tga 543

10

<210> 114

<211> 180

<212> PRT

15

<213> *Legionella pneumophila*

<400> 114

Met	Lys	Gly	Ile	Val	Phe	Thr	Ser	Leu	Asn	Asp	Met	Ile	Ile	Glu	Gln
1															15
Phe	Gly	Ile	Glu	Thr	Trp	Asp	Gln	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Asp	Leu	Pro
															20
Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ala	Gly	Gly	Thr	Tyr	Ser	Asp	Thr	Glu	Phe
															35
Gln	Gln	Leu	Ile	Lys	Ala	Ile	Ala	Lys	Arg	Thr	Asn	Gln	His	Ala	Ser
															50
Val	Phe	Leu	Glu	Ala	Phe	Gly	Glu	Tyr	Met	Phe	Pro	Ile	Leu	Ser	Ser
															65
Lys	Cys	Ala	Ile	Phe	Leu	Lys	Lys	Asp	Met	Thr	Leu	Lys	Glu	Phe	Leu
															85
Lys	Ser	Ile	Asp	Gly	Thr	Ile	His	Val	Glu	Val	Glu	Lys	Leu	Tyr	Pro
															100
Asp	Glu	Thr	Leu	Pro	Thr	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Pro	Ala	Ala	Asn	Gln
															115
Leu	Val	Met	Val	Tyr	Arg	Ser	His	Arg	Arg	Leu	Cys	His	Phe	Ala	Met
															130
Gly	Leu	Ile	Gln	Gly	Ala	Ala	Gln	His	Phe	Lys	Lys	Lys	Ile	Thr	Ile
															145
															150
															155
															160

Lys	Gln	Thr	His	Cys	Met	Leu	Lys	Lys	Asp	Asp	His	Cys	Arg	Leu	Glu
															165
															170
Ile	Thr	Phe	Glu												175
															180

&lt;210&gt; 115

&lt;211&gt; 543

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Legionella pneumophila

&lt;400&gt; 115

atgaaaaggta	tcgttttac	ctccttaaat	gacatgatta	tagaacaatt	tggcatagaa	60
acctgggacc	aactcgatac	ctcaactagac	cttccaagtg	gtggaagtt	tacagcaggc	120
ggcacttact	cggatacaga	atttcagcaa	ttgattaagg	ccattgcgaa	gaggaccaat	180
cagcacgctt	ctgtttttt	agaggcctt	ggtgaataca	tgtttccat	cttatcgagt	240
aagtgcgcaa	ttttttaaa	aaaggacatg	acattaaaag	aatttttaaa	aagcattgtat	300
ggaacaattc	atgtggaagt	agaaaagtt	tacccagatg	aaacattacc	taccatttagc	360
tatgaagagc	ctgctgcaaa	ccaaattgggt	atggtgtatc	gatcgcatag	aagactctgt	420
cattacgcaa	tggggctcat	ccagggagca	gcgcaacatt	ttaaaaagaa	aattaccatt	480
aaggcagactc	actgcatgtt	aaaaaaagat	gatcattgtc	gtttggagat	tacctttgag	540
						543

10

&lt;210&gt; 116

&lt;211&gt; 180

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Legionella pneumophila

&lt;400&gt; 116

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

&lt;210&gt; 117

&lt;211&gt; 525

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Desulfovibrio desulfuricans

&lt;400&gt; 117

atgaagatgc gcggtatttt gccgaaaata tttatgaatt ttataaaaga gatctatggg 60  
 gatgacgtgt ttgctcatgt ttctaaaacc atgggcgagc ctgtcttcat gccggaaat 120  
 tcctaccctg atcagggttt ggcgcagatg gctaaatag tatgccagcg cacgggcgaa 180  
 cagcccaagt tgtttttga aaaagcaggg cgtcaagcc tgcaggctt taacagaatg 240

tacaggcagt actttaaagg ggaaaccctt aaagagttc tgctggccat gaatgatatc 300  
 cacaggcacc tgacaaagga caatccggc gtacccccgc ctaaatttga gtatgacgat 360  
 cagggcgata cgcttgttat gacatataag tcgcagaggg attacggaga atacttttg 420  
 ggcatcatca aggcagctgc ggagttaaa aaggaaaaag tgcgtatcag ctccggagcat 480  
 gccggttaagg ggcgaacaac ggcaagggtt acatttatta aatga 525

10

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 174

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Desulfovibrio desulfuricans

&lt;400&gt; 118

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

&lt;210&gt; 119

&lt;211&gt; 525

5 &lt;212&gt; ADN

<213> *Desulfovibrio desulfuricans*

&lt;400&gt; 119

atgaagatgc gcggtatttt gccgaaaata tttatgaatt ttataaaaga gatctatggg 60  
 gatgacgtgt ttgctcatgt ttataaaacc atggcgagc ctgtcttcgt gccgggaaat 120  
 tcctaccctg atcagggttt ggccagatg gctgaaatag tatgccagcg cacggggcgaa 180  
 cagcccaagt tggttttga aaaagcaggg cgtcaagcc tgcaggctt taacagaatg 240  
 tacaggcagt actttaaagg gaaaaccctt aaagagttc tgctggccat gaatgatatc 300  
 cacaggcacc tgacaaagga caatccggc gtacccccgc ctaaatttga gtatgacgat 360  
 cagggcgata cgcttgttat gacatataag tgcagaggg attacggaga acttttggtg 420  
 ggcatcatca aggcaagctgc ggagttaaa aaggaaaaag tgcgtatcag ctcggagcat 480  
 gccggtaagg ggcgaacaac ggcaagggtt acatttatta aatga 525

10

&lt;210&gt; 120

&lt;211&gt; 174

15 &lt;212&gt; PRT

<213> *Desulfovibrio desulfuricans*

&lt;400&gt; 120

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

50	55	60	
Phe	Phe	Glu	
Lys	Ala	Gly	
Arg	Ala	Ser	
Leu	Gln	Ala	
Phe	Asn	Arg	
Asn	Arg	Met	
65	70	75	80
Tyr	Arg	Gln	Tyr
Phe	Lys	Gly	Glu
Thr	Leu	Lys	Glu
Phe	Leu	Leu	Leu
Ala			
85	90	95	
Met	Asn	Asp	Ile
Ile	His	Arg	His
Leu	Leu	Thr	Lys
Asp	Asn	Pro	Gly
100	105	110	
Pro	Pro	Lys	Phe
Glu	Tyr	Asp	Asp
Gln	Gly	Asp	Thr
Leu	Val	Met	Thr
115	120	125	
Tyr	Lys	Ser	Gln
Arg	Asp	Tyr	Gly
Glu	Leu	Phe	Val
Val	Gly	Ile	Ile
130	135	140	Lys
Ala	Ala	Ala	Glu
Phe	Lys	Glu	Lys
145	150	155	160
Ala	Gly	Lys	Gly
Arg	Thr	Thr	Ala
Val	Arg	Val	Thr
165	170		Phe
			Ile
			Lys

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 1158

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 121

atgtacggat ttgtgaatca cgccctggag ttgctggta tccgcaatta cggccccgag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agagggcacag tttagatgaag aaggacagg ttcttgtcaga 120  
 ataatatatg atgactccaa aaccttatgtat ttggttgtcg ctgcaggcaa agtctctcaat 180  
 ctcaatgtcg gagaaatccc ccaaattttt gggaaatgtt ttttcgtctt ttgccaagaa 240  
 tctggttatg atacaatctt gctgtcctg ggctctaattt tcagagaattt tctacagaac 300  
 cttgatgtc tgcacgacca cttgtctacc atctacccag gaatgcgtgc accttccttt 360  
 aggtgcactg atgcagaaaa gggcaaagga ctcattttgc actactactc agagagagaa 420  
 ggacttcagg atattgtcat tggaaatcatc aaaacagtgg cacaacaaat ccattggcact 480  
 gaaatagaca tgaagggtat tcagcaaga aatgaagaat gtgatcatac tcaattttta 540  
 attgaagaaa aagagtcaaa agaagaggat ttttatgaag atcttgacag atttgaagaa 600  
 aatggtaccc aggaatcactg catcagccca tatacatttct gcaaatctt tcctttcat 660  
 ataatatattt accggggaccc atgtggtcaact cagtgtggca atgctatata cagatcttc 720  
 ccccaatcc agcctggaa ttgcagecctt ctgtctgtct tctcgctgt tcgtccctcat 780  
 attgatatta gtttccatgg gatcccttccatcaata ctgtttttgtt attgagaagc 840  
 aaggaaggat tggatgtt ggagaaattha gaatgtgagg atgaacttgc tggactgag 900  
 atcagctgt tacgtctcaa gggtcaaatg atctacttac ctgaaggcaga tagcataactt 960  
 tttctatgtt caccatgtt catgaacccg gacgatttga caaggagagg gctgtatcta 1020  
 agtgcacatcc ctctgcatttca tggcacgcgc gatcttggttc ttttgggaga acaattttaga 1080  
 gaggaataca aactcaccca agaactggaa atcctcactg acaggctaca gctcacgtta 1140  
 agagccctgg aagattga 1158

10

&lt;210&gt; 122

&lt;211&gt; 385

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 122

Met Tyr Gly Phe Val Asn His Ala Leu Glu Leu Leu Val Ile Arg Asn  
 1 5 10 15  
 Tyr Gly Pro Glu Val Trp Glu Asp Ile Lys Lys Glu Ala Gln Leu Asp  
 20 25 30  
 Glu Glu Gly Gln Phe Leu Val Arg Ile Ile Tyr Asp Asp Ser Lys Thr  
 35 40 45  
 Tyr Asp Leu Val Ala Ala Ser Lys Val Leu Asn Leu Asn Ala Gly  
 50 55 60  
 Glu Ile Leu Gln Met Phe Gly Lys Met Phe Phe Val Phe Cys Gln Glu  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Tyr Asp Thr Ile Leu Arg Val Leu Gly Ser Asn Val Arg Glu  
 85 90 95  
 Phe Leu Gln Asn Leu Asp Ala Leu His Asp His Leu Ala Thr Ile Tyr  
 100 105 110  
 Pro Gly Met Arg Ala Pro Ser Phe Arg Cys Thr Asp Ala Glu Lys Gly

115	120	125
Lys Gly Leu Ile Leu His Tyr Tyr Ser Glu Arg Glu Gly Leu Gln Asp		
130	135	140
Ile Val Ile Gly Ile Ile Lys Thr Val Ala Gln Gln Ile His Gly Thr		
145	150	155
Glu Ile Asp Met Lys Val Ile Gln Gln Arg Asn Glu Glu Cys Asp His		
165	170	175
Thr Gln Phe Leu Ile Glu Glu Lys Glu Ser Lys Glu Glu Asp Phe Tyr		
180	185	190
Glu Asp Leu Asp Arg Phe Glu Glu Asn Gly Thr Gln Glu Ser Arg Ile		
195	200	205
Ser Pro Tyr Thr Phe Cys Lys Ala Phe Pro Phe His Ile Ile Phe Asp		
210	215	220
Arg Asp Leu Val Val Thr Gln Cys Gly Asn Ala Ile Tyr Arg Val Leu		
225	230	235
Pro Gln Leu Gln Pro Gly Asn Cys Ser Leu Leu Ser Val Phe Ser Leu		
245	250	255
Val Arg Pro His Ile Asp Ile Ser Phe His Gly Ile Leu Ser His Ile		
260	265	270
Asn Thr Val Phe Val Leu Arg Ser Lys Glu Gly Leu Leu Asp Val Glu		
275	280	285
Lys Leu Glu Cys Glu Asp Glu Leu Thr Gly Thr Glu Ile Ser Cys Leu		
290	295	300
Arg Leu Lys Gly Gln Met Ile Tyr Leu Pro Glu Ala Asp Ser Ile Leu		
305	310	315
Phe Leu Cys Ser Pro Ser Val Met Asn Leu Asp Asp Leu Thr Arg Arg		
325	330	335
Gly Leu Tyr Leu Ser Asp Ile Pro Leu His Asp Ala Thr Arg Asp Leu		
340	345	350
Val Leu Leu Gly Glu Gln Phe Arg Glu Glu Tyr Lys Leu Thr Gln Glu		
355	360	365
Leu Glu Ile Leu Thr Asp Arg Leu Gln Leu Thr Leu Arg Ala Leu Glu		
370	375	380
Asp		
385		

<210> 123  
 <211> 1158  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 123

atgtacggat ttgtgaatca cgccctggag ttgctggta tccgcaatta cggccccgag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcacag ttagatgaag aaggacagtt tcttgtcaga 120  
 ataatatatg atgactcaa aaccttatgtt ttgggtgctg ctgcaagcaa agtccctaat 180  
 ctcaatgctg gagaaatctt ccaaattttt gggaaatgtt ttttcgtctt ttgccaagaa 240  
 tctggttatg atacaatctt gctgtcctg ggctctaattt tcagagaattt tctacagaac 300  
 cttgatgctc tgacacgacca ccttgcattt atctaccctt gaatgcgtgc accttcctt 360  
 aggtgcactg atgcagaaaa gggcaaagga ctcattttgc actactactc agagagagaa 420  
 ggacttcagg attatgtcat tggaaatcatc aaaacagtgg cacaacaaat ccattggact 480  
 gaaatagaca tgaaggatcat tcagcaaaa aatgaagaat gtgatcatac tcaattttt 540  
 attgaagaaaa aagagtcaaa agaagaggat ttttatgaag atcttgacag atttgaagaa 600  
 aatggtaccc aggaatcacg catcagccca tatacattctt gcaaagctt tcctttcat 660  
 ataatatattt accggggaccc agtggtaact cagtgtggca atgctatata cagatttctc 720  
 ccccaagctcc agcctggaa ttgcagccctt ctgtctgtct tctcgctggt tcgtccat 780  
 attgatattt gtttccatgg gatccttttctt cacatcaata ctgtttttt attgagaagc 840  
 aaggaaggat tggatgtt ggagaaaatta gaatgtgagg atgaactgac tgggactgag 900  
 atcagctgct tacgtctcaa gggtcaaatg atctacttttac ctgaagcaga tagcataactt 960  
 tttctatgtt caccatgtt catgaacctg gacgatttga caaggagagg gctgtatcta 1020  
 agtgcacatcc ctctgcatga tgcacacgcgc gatcttgcgtt tttgggaga acaattttaga 1080  
 gaggaataaca aactcacca agaactggaa atcctcactg acaggctaca gtcacgtta 1140  
 agagccctgg aagatttga 1158

5

<210> 124  
 <211> 385  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 124

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

&lt;210&gt; 125

&lt;211&gt; 1158

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 125

 atgtacggat ttgtgaatca cgcctggag ttgctggta tccgcaatta cggccccgag 60  
 gtgtggaaag acataaaaa agaggcacag ttagatgaag aaggacagt tcttgtcaga 120

ataatatatg atgactccaa aacttatgtat ttggttgctg ctgcaagcaa agtcctcaat 180  
 ctcaatgctg gagaaaatccc ccaaataatgtt gggaaagatgt ttttcgtctt ttgccaaagaa 240  
 tctggttatg atacaatctt gcgtgtcctg ggctctaatt tcagagaatt tctacagaac 300  
 cttgatgctc tgcacgacca ccttgctacc atctacccag gaatgcgtgc accttccttt 360  
 aggtgcactg atgcagaaaa gggcaaagga ctcatttgc actactactc agagagagaa 420  
 ggacttcagg atcatgtcat tggaaatcatc aaaacagtgg cacaacaaat ccatggcact 480  
 gaaatagaca tgaaggat tat tcagcaaaga aatgaagaat gtgatcatac tcaatttta 540  
 attgaagaaa aagagtcaaa agaagaggat ttttatgaag atcttgacag atttgaagaa 600  
 aatggtaccc aggaatcactc catcagccca tatacatttct gcaaagctt tcctttcat 660  
 ataatatttg accgggaccc agtggtcaact cagtgtggca atgctatata cagagttctc 720  
 ccccagctcc agcctggaaa ttgcagecctt ctgtctgtct tctcgctgtt tcgtcctcat 780  
 attgatatta gtttccatgg gatcctttct cacatcaata ctgtttttgtt attgagaagc 840  
 aaggaaggat tggatgtt ggagaaatata gaatgtgagg atgaactgac tggactgag 900  
 atcagctgt tacgtctcaa gggtaaatg atctacttac ctgaagcaga tagcataactt 960  
 tttctatgtt caccaagtgtt catgaacctg gacgatttga caaggagagg gctgtatcta 1020  
 agtgacatcc ctctgcatga tgccacgcgc gatcttggat ttttgggaga acaatttaga 1080  
 gaggaataaca aactcacccaa agaactggaa atcctcactg acaggctaca gtcacgtta 1140  
 agagccctgg aagattga 1158

5 <210> 126  
 <211> 385  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 126

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

Phe Leu Cys Ser Pro Ser Val Met Asn Leu Asp Asp Leu Thr Arg Arg  
 325 330 335  
 Gly Leu Tyr Leu Ser Asp Ile Pro Leu His Asp Ala Thr Arg Asp Leu  
 340 345 350  
 Val Leu Leu Gly Glu Gln Phe Arg Glu Glu Tyr Lys Leu Thr Gln Glu  
 355 360 365  
 Leu Glu Ile Leu Thr Asp Arg Leu Gln Leu Thr Leu Arg Ala Leu Glu  
 370 375 380  
 Asp  
 385

<210> 127  
 <211> 1158  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 127

atgtacggat ttgtgaatca cgccctggag ttgctggta tccgcaatta cggccccgag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcacag ttagatgaag aaggacagt tcttgcaga 120  
 ataatatatg atgactccaa aaccttatgat ttgggtctg ctgcaagcaa agtctcaat 180  
 ctcaatgtcg gagaaatcct ccaaattttt gggaaatgtt ttttcgtctt ttaccaagaa 240  
 tctggttatg atacaatctt gctgtcttg ggctctaattt tcagagaattt tetacagaac 300  
 cttgatgtctc tgacgacca cttgtctacc atctacccag gaatgcgtgc accttcctt 360  
 aggtgcactg atgcagaaaa gggcaaaagga ctcatttgc actactactc agagagagaa 420  
 ggacttcagg atattgtcat tggaaatcatc aaaacagtgg cacaacaaat ccattggact 480  
 gaaatagaca tgaaggatcat tcagcaaaaga aatgaagaat gtgatcatac tcaattttt 540  
 attgaagaaa aagagtcaaa agaagaggat ttttatgaag atcttgacag atttgaagaa 600  
 aatggtaccc aggaatcact catcagccca tatacattct gcaaagctt tcctttcat 660  
 ataatatttgc accgggaccc agtggtcact cagtgtggca atgctatata cagagttctc 720  
 ccccaactcc acgctggaa ttgcagcctt ctgtctgtct tctcgcttgt tcgttctcat 780  
 attgatattt gttccatgg gatccttttctt cacatcaata ctgtttttgtt attgagaagc 840  
 aaggaaggat tggatgtt ggagaaatttta gaatgtgagg atgaacttgac tggactgag 900  
 atcagctgtt tacgtctcaa gggtaaatg atctacttac ctgaagcaga tagcataactt 960  
 tttctatgtt caccatgtt catgaacctg gacgatttga caaggagagg gctgtatcta 1020  
 agtgcacatcc ctctgcatttga tgccacgcgc gatcttgcgtt ttttggaga acaattttaga 1080  
 gaggaataaca aactcaccca agaactggaa atcctcactg acaggctaca gctcacgtta 1140  
 agagccctgg aagattga 1158

&lt;210&gt; 128

&lt;211&gt; 385

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 128

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

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

<210> 129  
 <211> 1158  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 129

atgtacggat ttgtgaatca cgccctggag ttgctggta tccgcaatta cggccccgag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcacag ttagatgaag aaggacagtt tcttgtcaga 120  
 ataatatatg atgactccaa aaccttatgtat ttgggttgcgt ctgcaagcaa agtcctcaat 180  
 ctcaatgtcg gagaatctt ccaaattgtt gggaaatgtt ttttcgtctt ttgcacaagaa 240  
 tctggttatg atacaatctt gcgtgtcctg ggctctaatt tcagagaatt tctacagaac 300  
 cttgatgtc tggatcgacca ccttgctacc atctaccatc gaatgcgtgc accttcctt 360  
 aggtgcactg atgcagaaaa gggcaaaagga ctcattttgc actactactc agagagagaa 420  
 ggacttcagg atattgtcat tggatcatc aaaacagtgg cacaacaat ccatggcact 480  
 gaaatagaca tgaaggatcat tggatcatc aatgaagaat gtgatcatac tcaatttta 540  
 attgaagaaa aagagtccaa agaagaggat ttttatgaag atcttgacag atttgaagaa 600  
 aatggtaccc aggaatcacg catcagccca tatacattct gcaaaatctt tcctttcat 660  
 ataatatatttgc accgggacact agtggtaact cagtgtggca atgctatata cagattctc 720  
 ccccaatcc accctggaa ttgcagccctt ctgtctgtct tctcgctgt tcgtcctcat 780  
 attgatatta gttccatgg gatcccttct cacatcaata ctgtttttgtt attgagaagc 840  
 aaggaaggat tggatgtt ggagaaatata gaatgtgagg atgaactgac tggactgag 900  
 atcagctgt tacgtctcaa gggtaaatg atctacttac ctgaagcaga tagcataatt 960  
 tttctatgtt caccatgtt catgaacactg gacgatttga caaggagagg gctgtatcta 1020  
 agtgacatcc ctctgtatgt tgccacgcgc gatcttttc ttttgggaga acaattttaga 1080  
 gaggaataaca aactcaccca agaactggaa atcctcactg acaggctaca gtcacgtta 1140  
 agagccctgg aagattga   1158

<210> 130  
 <211> 385

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 130

5

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

<210> 131

<211> 1158

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 131

atgtacggat ttgtaatca cgcctggag ttgctggta tccgcaatta cggccccgag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcacag ttagatgaag aaggacagtt tcttgtcaga 120  
 ataatatatg atgactccaa aacttatgat ttgggtgctg ctgcaagcaa agtccctaat 180  
 ctcaatgctg gagaatcct ccaaattgtt gggaaatgtt ttgcgtctt ttgccaagaa 240  
 tctggttatg atacaatett gcgtgtcctg ggctctaatt tcagagaatt tctacagaac 300  
 cttgatgctc tgggtgacca cttgtctacc atctacccag gaatgcgtgc accttccttt 360  
 aggtgcactg atgcagaaaa gggcaaagga ctcatttgc actactactc agagagagaa 420

ggacttcagg atattgtcat tggaaatcatc aaaacagtgg cacaacaaat ccatggcact 480  
 gaaatagaca tgaagggtat tcagcaaaaga aatgaagaat gtgatcatac tcaatttta 540  
 attgaagaaa aagagtcaaa agaagaggat tttatgaag atcttgacag atttgaagaa 600  
 aatggtaccc aggaatcacg catcagccca tatacattt gcaaagctt tcctttcat 660  
 ataatatgg accgggaccc agtggtcact cagtgtggca atgctatata cagagttctc 720  
 ccccgctcc agcctggaa ttgcagectt ctgtctgtct tctcgtgtt tcgttectcat 780  
 attgatatta gtttccatgg gatcctttt cacatcaata ctgtttttgtt attgagaagc 840  
 aaggaaggat tggtggatgt ggagaaattha gaatgtgagg atgaactgac tggactgag 900  
 atcagctgct tacgtctcaa gggtaaatg atctacttac ctgaagcaga tagcataactt 960  
 ttctatgtt caccaggatgt catgaacctg gacgatttga caaggagagg gctgtatcta 1020  
 agtgcacatcc ctctgcatga tgccacgcgc gatcttggttc ttttgggaga acaatttaga 1080  
 gaggaataca aactcacccaa agaactggaa atcctcactg acaggctaca gtcacgtta 1140  
 agagccctgg aagattga 1158

5 <210> 132  
 <211> 385  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 132

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

355	360	365
Leu Glu Ile Leu Thr Asp Arg Leu Gln Leu Thr Leu Arg Ala Leu Glu		
370	375	380

Asp  
385

<210> 133  
 <211> 585  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 133

atgtacggat ttgtgaatca cgccctggag ttgctggta tccgcaatta cggccccgag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcacag ttagatgaag aaggacagt tcttgcaga 120  
 ataatatatg atgactccaa aacttatgat ttgggtcgtg ctgcaagcaa agtccctaat 180  
 ctcaatgctg gagaaatctt ccaaattttt gggaaatgtt ttttcgtctt ttgccaagaa 240  
 tctggttagt atacaatctt gcgtgtcctg ggctctaatt tcagagaatt tctacagaac 300  
 cttgatgctc tgacacgacca cttgttaccatctacccag gaatgcgtgc accttccttt 360  
 aggtgcactg atgcagaaaa gggcaaaggat ctcattttgc actactactc agagagagaa 420  
 ggacttcagg atattgtcat tggaaatcatc aaaacagtgg cacaacaaat ccatggcact 480  
 gaaatagaca tgaaggat tat tcagcaaaga aatgaagaat gtgatcatac tcaattttta 540  
 attgaagaaa aagagtcaaa agaagaggat ttttatgaag attga 585

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 194

5 &lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 134

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

10

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 585

15 &lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 135

atgtacggat ttgtgaatca cgccctggag ttgctggta tccgcaatta cggccccgag 60

gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcacag ttagatgaag aaggacagtt tcttgtcaga 120  
 ataatatatg atgactccaa aacttatgtat ttgggtgctg ctgcaccaa agtcctcaat 180  
 ctcacatgctg gagaatcct ccaaattgtt gggaaatgtt tttcgctt ttgccaagaa 240  
 tctgtttagt atacaatctt gcgtgtcttg ggctctaatt tcagagaatt tctacagaac 300  
 cttgatgctc tgacgacca cttgtctacc atctacccag gaatgcgtgc acttccctt 360  
 aggtgcactg atgcagaaaa gggcaaaagga ctcattttgc actactactc agagagagaa 420  
 ggacttcagg attatgtcat tgaatcatc aaaacagtgg cacaacaaat ccatggcact 480  
 gaaatagaca tgaaggat tcaagaaatgaaat gtgatcatac tcaattttta 540  
 attgaagaaa aagagtcaaa agaagaggat tttatgaag attga 585

5 <210> 136  
 <211> 194  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 136

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

<210> 137  
 <211> 585  
 <212> ADN  
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 137

atgtacggat ttgtgaatca cgccctgggag ttgctggta tccgcaatta cggccccgag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcacag ttagatgaag aaggacagtt tcttgtcaga 120  
 ataatatatg atgactccaa aacttatgtat ttgggtgctg ctgcaccaa agtcctcaat 180  
 ctcacatgctg gagaatcct ccaaattgtt gggaaatgtt tttcgctt ttgccaagaa 240  
 tctgtttagt atacaatctt gcgtgtcttg ggctctaatt tcagagaatt tctacagaac 300  
 cttgatgctc tgacgacca cttgtctacc atctacccag gaatgcgtgc acttccctt 360  
 aggtgcactg atgcagaaaa gggcaaaagga ctcattttgc actactactc agagagagaa 420  
 ggacttcagg attatgtcat tgaatcatc aaaacagtgg cacaacaaat ccatggcact 480  
 gaaatagaca tgaaggat tcaagaaatgaaat gtgatcatac tcaattttta 540  
 attgaagaaa aagagtcaaa agaagaggat tttatgaag attga 585

<210> 138  
<211> 194  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

&lt;400&gt; 138

```

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

```

10

<210> 139  
<211> 1158  
<212> ADN  
<213> *Rattus norvegicus*

15

&lt;400&gt; 139

```

atgtacggtt ttgtgaacca tgcctggag ctgcttgta tccgcaatta cggccccgag 60
gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcgcag ctggatgaag aaggccagtt tcttgtgaga 120
ataatctacg atgattccaa aacctatgac ttgggtggctg ctgcgagcaca agtccctcaac 180
ctcaatgctg gtgaaaatcct gcagatgtt gggaaagatgt ttttcgtctt ctgtcaagag 240
tctggctatg ataccatctt gcgtgtcctg ggatctaatg tcaggggagtt tttgcagaac 300
ctcgacgccc tgcacgacca cctcgccacc atctacccag ggatgcgcgc accttccttc 360
cggtgcacccg atgcagaaaaa aggcaaaggg ctcattctgc actactactc ggaaagagag 420
gggcttcagg acattgtat cgggattata aagactgtat ctcacacat ccatggcact 480
gagatagaca tgaaggttat tcagcaaaga agtgaagaat gtgatcatac ccaattttta 540
attgaagaaa aagaatcaa aagaagaggat ttttatgaag atctggacag gtttgaagag 600
aacgttaccc aggactccccg tattcagecccg tacacccctt gaaaagegtt tcctttcac 660
atcatatttg accggggaccc agtagtcacg cagtgtggaa atgctatcta cagagtgc 720
ccccagctcc agcctggaa gtgcagcctt ctgtctgtct tctctctgtt ccgcctctat 780
attgacatca gtttccacgg gattcttca cacatcaata ccgtctttgt actgagaagc 840
aaggaagggt tgctggatgt tgagaaaactt gaatgtgagg atgaactgac tggggcagag 900
attagctgcc tccgtctcaa aggccaaatg atctatttac cggaaagcaga tagcatacctc 960
ttcctctgtt caccaagtgt gatgaacttg gatgaccaa caagaagagg cctgtacctg 1020
agtgacatcc ctctccatga tgctacacga gacctggtcc ttttgggaga acagttccgg 1080
gaggagtaca aactgacaca agagctggaa atcctcacag acaggctgca gctcacactg 1140
aggctttgg aggattga                                1158

```

<210> 140  
<211> 385  
<212> PRT  
<213> *Rattus norvegicus*

5

&lt;400&gt; 140

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

10

<210> 141  
<211> 1158  
<212> ADN

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 141

```

atgtacggtt ttgtgaacca tgccctggag ctgctggta tccgcaatta cggccccgag 60
gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcgtag ctggatgaag aaggccagtt tcttgcgaga 120
ataatctacg atgattccaa aacctatgac ttggggctg ctgcgagcaa agtcctcaac 180
ctcaatgctg gtgaaatcct gcagatgttt gggaaatgtt ttttcgttct ctgtcaagag 240
tctggctatg ataccatctt gcgtgtcctg ggatctaattc tcagggagtt tttgcagaac 300
ctcgacgccc tgcacgacca cctcgccacc atctacccag ggatgcgcgc accttccttc 360
cggtgtcaccg atgcagaaaa aggcaaaaggg ctcattctgc actactactc gaaaagagag 420
gggcttcagg actacgttatc cgggattatc aagactgttag ctcaacagat ccattggcact 480
gagatagaca tgaagttat tcagcaaaa agtgaagaat gtgatcatac ccaattttta 540

```

```

attgaagaaa aagaatcaaa agaagaggat ttttatgaag atctggacag gtttgaagag 600
aacggtagcc aggactcccg tatcagcccg tacaccccttgc gcaaagcgtt tcctttcac 660
atcatatttg accgggaccc agtagtcacg cagtgtggaa atgctatcta cagagtgc 720
ccccagctcc agcctggaa gtgcagccctt ctgtctgtct tctctctgtt ccgcctcat 780
attgacatca gtttccacgg gattttca cacatcaata ccgtctttgtt actgagaagc 840
aaggaagggt tgctggatgt tgagaaactt gaatgtgagg atgaactgtac tggggcagag 900
attagctgcc tccgtctcaa aggccaaatg atctatttac cggaaagcaga tagcatcctc 960
ttcctctgtt caccaagtgt gatgaacttg gatgacctaa caagaagagg cctgtacctg 1020
agtgacatcc ctctccatga tgctcacacga gacctggtcc ttttgggaga acagttccgg 1080
gaggagtaca aactgacaca agagctggaa atcctcacag acaggctgca gtcacactg 1140
agggcttgg aggattga 1158

```

5

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 385

&lt;212&gt; PRT

10 <213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 142

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

&lt;210&gt; 143

&lt;211&gt; 1158

&lt;212&gt; ADN

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 143

atgtacggtt ttgtgaacca tgcctggag ctgctggta tcggcaatata cggccccag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcgtag ctggatgaag aaggccagtt tcttgtgaga 120  
 ataatctacg atgattccaa aacatatgac ttggggctg ctgcgagcaa agtcctcaac 180  
 ctcaatctg gtgaaatctt gcagatgtt gggaaatgt tttcgttt ctgtcaagag 240  
 tctggctatg ataccatctt gctgtctg ggatctaattc tcagggaggtt ttgcagaac 300  
 ctgcacqccc tgcacgacca cctgcaccacc atctacccag ggatgcgcgc accttccttc 360  
 cgggtcaccg atgcagaaaa aggcaaaagggt ctcattctgc actactactc ggaaagagag 420  
 gggcttcagg accatgttat cgggattatc aagactgttag ctcaacagat ccattggact 480  
 gagatagaca tgaaggttat tcagcaaaga agtgaagaat gtgatcatc ccaattttta 540  
 attgaagaaa aagaatcaaa agaagaggat ttttatgaag atctggacag gtttgaagag 600  
 aacggtaccc aggactcccg tattcagcccg tacacccctt gcaaagcggtt tcctttcac 660  
 atcatatttg accggggacct agtagtcacg cagtgtggaa atgctatcta cagagtgcctc 720  
 ccccagetcc agcctgggaa gtgcagecctt ctgtctgtct tctctctgtt ccgcctctat 780  
 attgacatca gtttccacgg gatttttca cacatcaata ccgtctttgtt actgagaagc 840  
 aaggaagggt tgctggatgt tgagaaactt gaatgtgagg atgaactgac tggggcagag 900  
 attagctgcc tccgtctcaa aggccaaatg atctattttac cggaaagcaga tagcatcctc 960  
 ttctctgtt caccaagtgt gatgaacttg gatgacctaa caagaagagg cctgtacctg 1020  
 agtgacatcc ctctccatga tgctacacga gacctggtcc ttttgggaga acagttccgg 1080  
 gaggagttaca aactgacaca agagctggaa atcctcacag acaggctgca gctcacactg 1140  
 agggctttgg aggattga 1158

<210> 144  
 <211> 385  
 5 <212> PRT  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 144

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

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

<210> 145  
 <211> 1158  
 <212> ADN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 145

atgtacggtt ttgtgaacca tgccctggag ctgctggta tccgcaatta cggccccag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcgtag ctggatgaag aaggccagtt tcttgtgaga 120  
 ataacttacg atgattccaa aacctatgac ttggggctg ctgcgagcaa agtcttcac 180  
 ctcaatgtg gtgaaatct gcagatgtt gggagatgt tttcgtctt ctatcaagag 240  
 tctggctatg ataccatctt gcgtgtctg ggatctaatg tcagggagtt tttcagaac 300  
 ctgcacgccc tgcacgacca cctcgccacc atctacccag ggatgcgcgc accttccttc 360  
 cggtgccaccg atgcagaaaa aggcaaaggg ctcattctgc actactactc gaaaagagag 420  
 gggcttcagg acattgtat cgggatttac aagactgtat ctaaacatcat ccatggcact 480  
 gagatagaca tgaaggat tatcagcaaaaga agtgaagaat gtgatcatac ccaattttta 540  
 attgaagaaa aagaatcaaa agaagaggat ttttatgaag atctggacag gtttgaagag 600  
 aacggtaccc aggactcccg tatacgcccg tacacccctt gcaaagcggt tcctttcac 660  
 atcatatttg accgggacct agtagtcaog cagtgtggaa atgttatcta cagagtgttc 720  
 cccagctcc agcctggaa gtgcagccctt ctgtctgtct tctctctgtt ccgcctctat 780  
 attgacatca gtttccacgg gatttttca cacatcaata ccgtctttgt actgagaagc 840  
 aaggaagggt tgctggatgt tgagaaaactt gaatgtgagg atgaactgtac tggggcagag 900  
 attagctgcc tccgtctcaa aggcacaaatg atctatttac cgaaagcaga tagcatcctc 960  
 ttctctgtt caccatgtt gatgaacttg gatgaccaa caagaagagg cctgtacctg 1020  
 agtgacatcc ctctccatga tgctacacga gacctggtcc ttttgggaga acagttccgg 1080  
 gaggagtaca aactgacaca agagctggaa atcctcacag acaggctgca gtcacactg 1140  
 agggctttgg aggattga 1158

<210> 146  
 <211> 385  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 146

10

15

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

50	55	60														
Glu	Ile	Leu	Gln	Met	Phe	Gly	Lys	Met	Phe	Phe	Val	Phe	Tyr	Gln	Glu	
65																80
Ser	Gly	Tyr	Asp	Thr	Ile	Leu	Arg	Val	Leu	Gly	Ser	Asn	Val	Arg	Glu	
															95	
Phe	Leu	Gln	Asn	Leu	Asp	Ala	Leu	His	Asp	His	Leu	Ala	Thr	Ile	Tyr	
															110	
100																
Pro	Gly	Met	Arg	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	Cys	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Gly	
															125	
115																
Lys	Gly	Leu	Ile	Leu	His	Tyr	Tyr	Ser	Glu	Arg	Glu	Gly	Leu	Gln	Asp	
															140	
130																
Ile	Val	Ile	Gly	Ile	Ile	Lys	Thr	Val	Ala	Gln	Gln	Ile	His	Gly	Thr	
145															160	
Glu	Ile	Asp	Met	Lys	Val	Ile	Gln	Gln	Arg	Ser	Glu	Glu	Cys	Asp	His	
															175	
165																
Thr	Gln	Phe	Leu	Ile	Glu	Glu	Lys	Glu	Ser	Lys	Glu	Glu	Asp	Phe	Tyr	
															190	
180																
Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Phe	Glu	Glu	Asn	Gly	Thr	Gln	Asp	Ser	Arg	Ile	
															205	
195																
Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Cys	Lys	Ala	Phe	Pro	Phe	His	Ile	Ile	Phe	Asp	
															220	
210																
Arg	Asp	Leu	Val	Val	Val	Thr	Gln	Cys	Gly	Asn	Ala	Ile	Tyr	Arg	Val	Leu
															240	
225																
Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gly	Lys	Cys	Ser	Leu	Leu	Ser	Val	Phe	Ser	Leu	
															255	
245																
Val	Arg	Pro	His	Ile	Asp	Ile	Ser	Phe	His	Gly	Ile	Leu	Ser	His	Ile	
															270	
260																
Asn	Thr	Val	Phe	Val	Leu	Arg	Ser	Lys	Glu	Gly	Leu	Leu	Asp	Val	Glu	
															285	
275																
Lys	Leu	Glu	Cys	Glu	Asp	Glu	Leu	Thr	Gly	Ala	Glu	Ile	Ser	Cys	Leu	
															300	
290																
Arg	Leu	Lys	Gly	Gln	Met	Ile	Tyr	Leu	Pro	Glu	Ala	Asp	Ser	Ile	Leu	
															320	
305																
310																
Phe	Leu	Cys	Ser	Pro	Ser	Val	Met	Asn	Leu	Asp	Asp	Leu	Thr	Arg	Arg	
															335	
325																
Gly	Leu	Tyr	Leu	Ser	Asp	Ile	Pro	Leu	His	Asp	Ala	Thr	Arg	Asp	Leu	
															350	
340																
Val	Leu	Leu	Gly	Glu	Gln	Phe	Arg	Glu	Glu	Tyr	Lys	Leu	Thr	Gln	Glu	
															365	
355																
Leu	Glu	Ile	Leu	Thr	Asp	Arg	Leu	Gln	Leu	Thr	Leu	Arg	Ala	Leu	Glu	
															380	
370																
Asp																
385																

<210> 147  
<211> 1158  
<212> ADN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 147

atgtacggtt ttgtgaacca tgccctggag ctgctggta tccgcaatta cggtcccag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcgcag ctggatgaag aaggccagtt tcttgtgaga 120  
 ataatctacg atgattccaa aacctatgac ttggtggtcg ctgcgagcaa agtcctcaac 180  
 ctcaatgtcg gtgaaatctt gcagatgttt gggaaagatgt ttttcgtctt ctgtcaagag 240  
 tctggctatg ataccatctt gctgtctcg ggatctaatt tcagggagtt tttgcagaac 300  
 ctgcacgccc tggtcgacca cctcgccacc atctacccag ggatgcgcgc acettcttc 360  
 cggtgcaccc atgcagaaaa aggcaaaggg ctcattctgc actactactc ggaaagagag 420  
 gggcttcagg acattgttat cgggattatc aagactgttag ctcaacagat ccatggcact 480  
 gagatagaca tgaaggttat tcagcaaaaga agtgaagaat gtgatcatac ccaattttta 540  
 attgaagaaa aagaatcaaa agaagaggat ttttatgaag atctggacag gtttgaagag 600  
 aacgtaccc aggactcccc tatcagcccg tacaccttct gcaaagcgtt tcctttcac 660  
 atcatatttgc accgggaccc agtagtcacg cagtgtggaa atgctatcta cagagtgcgc 720  
 ccccagctcc agcctggaa gtgcagcctt ctgtctgtct tctctctggt ccgcctctat 780  
 attgacatca gtttccacgg gattttca cacatcaata cctgttttgtt actgagaagc 840  
  
 aaggaagggt tgctggatgt tgagaaaactt gaatgtgagg atgaactgac tggggcagag 900  
 attagctgcc tccgtctcaa aggc当地atg atctatttac cggaaagcaga tagcatectc 960  
 ttcctctgtt caccaagtgt gatgaacttg gatgacctaa caagaagagg cctgtacctg 1020  
 agtgacatcc ctctccatga tgctacacga gacctggtcc ttttgggaga acagttccgg 1080  
 gaggagtaca aactgacacca agagctggaa atccctcacag acaggctgca gctcacactg 1140  
 agggctttgg aggattga 1158

5 <210> 148  
 <211> 385  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 148

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

&lt;210&gt; 149

&lt;211&gt; 1158

&lt;212&gt; ADN

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 149

atgtacggtt ttgtgaacca tgccctggag ctgctggta tccgcaatta cggccccag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcgcag ctggatgaag aaggccagtt tcttgtgaga 120  
 ataactacg atgattccaa aacctatgac ttggtggtcg ctgcgagcaa agtcctcaac 180  
 ctcaatgctg gtgaaatccct gcagatgtt gggaaagatgt ttttgcgttt ctgtcaagag 240  
 tctggctatg ataccatctt gctgtcctg ggatctaatt tcagggagtt tttgcagaac 300  
 ctcgaecccc tgggggacca cctcgcaccatctaccagg ggatgcgcgc accttccttc 360  
 cggtgccaccg atgcagaaaa aggcaaaaggg ctcattctgc actactactc ggaagagag 420  
 gggcttcagg acattgtat cggttgcattc aagactgttag ctcaacagat ccattggact 480  
 gagatagaca tgaaggatcat tcagcaaaa agtgaagaat gtgatcatac ccaattttta 540  
 attgaagaaaa aagaatcaaa agaagaggat ttttatgaag atctggacag gtttgaagag 600  
 aacggtaccc aggactcccg tattcagcccg tacacccctt gcaaagcgtt tcctttcac 660  
 atcatatttgc accgggaccc agtagtcacg cagtgtggaa atgctatcta cagagtgcctc 720  
 ccccaagctcc agcctggaa gtgcagccctt ctgtctgtct tctctctgtt ccgcctctat 780  
 attgacatca gtttccacgg gattttca cacatcaata ccgtctttgtt actgagaagc 840  
 aaggaagggt tgctggatgt tgagaaaactt gaatgtgagg atgaactgac tggggcagag 900  
 attagctgcc tccgtctcaa aggccaaatttgc atctattttac cggaaagcaga tagcatcetc 960  
 ttcctctgtt caccagtttgc gatgacctaa caagaagagg cctgtacctg 1020  
 agtacatcc ctctccatga tgctacacga gacctggcc ttttgggaga acagttccgg 1080  
 gaggagttaca aactgacaca agagctggaa atcctcacag acaggctgca gtcacactg 1140  
 agggctttgg aggattga 1158

&lt;210&gt; 150

&lt;211&gt; 385

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 150

Met	Tyr	Gly	Phe	Val	Asn	His	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Val	Ile	Arg	Asn
1															15
Tyr	Gly	Pro	Glu	Val	Trp	Glu	Asp	Ile	Lys	Lys	Glu	Ala	Gln	Leu	Asp
															30
Glu	Glu	Gly	Gln	Phe	Leu	Val	Arg	Ile	Ile	Tyr	Asp	Asp	Ser	Lys	Thr
															45
Tyr	Asp	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Ser	Lys	Val	Leu	Asn	Leu	Asn	Ala	Gly
															55
															60
Glu	Ile	Leu	Gln	Met	Phe	Gly	Lys	Met	Phe	Phe	Val	Phe	Cys	Gln	Glu
															80
Ser	Gly	Tyr	Asp	Thr	Ile	Leu	Arg	Val	Leu	Gly	Ser	Asn	Val	Arg	Glu
															95
Phe	Leu	Gln	Asn	Leu	Asp	Ala	Leu	Gly	Asp	His	Leu	Ala	Thr	Ile	Tyr
															110
100															
Pro	Gly	Met	Arg	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	Cys	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Gly
															125
115															
Lys	Gly	Leu	Ile	Leu	His	Tyr	Tyr	Ser	Glu	Arg	Glu	Gly	Leu	Gln	Asp
															140
130															
Ile	Val	Ile	Gly	Ile	Ile	Lys	Thr	Val	Ala	Gln	Gln	Ile	His	Gly	Thr
															160
145															
Glu	Ile	Asp	Met	Lys	Val	Ile	Gln	Gln	Arg	Ser	Glu	Glu	Cys	Asp	His
															175
165															
Thr	Gln	Phe	Leu	Ile	Glu	Glu	Lys	Glu	Ser	Lys	Glu	Glu	Asp	Phe	Tyr
															190
180															
Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Phe	Glu	Glu	Asn	Gly	Thr	Gln	Asp	Ser	Arg	Ile
															205
195															
Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Cys	Lys	Ala	Phe	Pro	Phe	His	Ile	Ile	Phe	Asp
															220
210															
Arg	Asp	Leu	Val	Val	Thr	Gln	Cys	Gly	Asn	Ala	Ile	Tyr	Arg	Val	Leu
															240
225															
Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gly	Lys	Cys	Ser	Leu	Leu	Ser	Val	Phe	Ser	Leu
															255
245															
250															

Val Arg Pro His Ile Asp Ile Ser Phe His Gly Ile Leu Ser His Ile  
                  260                 265                 270  
 Asn Thr Val Phe Val Leu Arg Ser Lys Glu Gly Leu Leu Asp Val Glu  
                  275                 280                 285  
 Lys Leu Glu Cys Glu Asp Glu Leu Thr Gly Ala Glu Ile Ser Cys Leu  
                  290                 295                 300  
 Arg Leu Lys Gly Gln Met Ile Tyr Leu Pro Glu Ala Asp Ser Ile Leu  
                  305                 310                 315                 320  
 Phe Leu Cys Ser Pro Ser Val Met Asn Leu Asp Asp Leu Thr Arg Arg  
                  325                 330                 335  
 Gly Leu Tyr Leu Ser Asp Ile Pro Leu His Asp Ala Thr Arg Asp Leu  
                  340                 345                 350  
 Val Leu Leu Gly Glu Gln Phe Arg Glu Glu Tyr Lys Leu Thr Gln Glu  
                  355                 360                 365  
 Leu Glu Ile Leu Thr Asp Arg Leu Gln Leu Thr Leu Arg Ala Leu Glu  
                  370                 375                 380  
**Asp**  
                  385

&lt;210&gt; 151

&lt;211&gt; 585

5       &lt;212&gt; ADN

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 151

atgtacggtt ttgtgaacca tgccctggag ctgctggta tccgcaatta cggccccgag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcgcag ctggatgaag aaggccagtt tcttgtgaga 120  
 ataatctacg atgattccaa aaccttatgac ttgggtggctg ctgcgagcaa agtcctcaac 180  
 ctcaatgctg gtgaaatcct gcagatgtt gggaaagatgt ttttcgtctt ctgtcaagag 240  
 tctggctatg ataccatctt gcgtgtcctg ggatctaatg tcagggagtt tttgcagaac 300  
 ctcgacgccc tgcacgacca cctcgccacc atctacccag ggatgcgcgc acttcccttc 360  
 cgggtgcaccc atgcagaaaa aggcaaaaggg ctcattctgc actactactc gaaaagagag 420  
 gggcttcagg acattgtat cgggattatac aagactgttag ctcaacagat ccatggcact 480  
 gagatagaca tgaaggttat tcagcaaaga agtgaagaat gtgatcatac ccaattttta 540  
 attgaagaaa aagaatcaaa agaagaggat ttttatgaag attga                   585

10

&lt;210&gt; 152

&lt;211&gt; 194

15       &lt;212&gt; PRT

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 152

```

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

```

<210> 153

<211> 585

<212> ADN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 153

atgtacggtt	tttgtgaacca	tgcctggag	ctgctggta	tccgcaatta	cggccccgag	60
gtgtgggaag	acatcaaaaa	agaggcgtag	ctggatgaa	aaggccagg	tcttgtgaga	120
ataatctacg	atgattccaa	aacctatgac	tttgtggctg	ctgcgagcaa	agtcttcaac	180
ctcaatgtcg	gtgaaaatcct	gcagatgttt	gggaagatgt	tttgcgtt	ctgtcaagag	240
tctggctatg	ataccatctt	gcgtgtcctg	ggatctaatg	tcagggagtt	tttgcagaac	300
ctcgacgccc	tgcacgacca	cctcgccacc	atctaccagg	ggatgcgcgc	accttccttc	360
cggtgcaccc	atgcagaaaa	aggcaaaaggg	ctcattctgc	actactactc	ggaaagagag	420
gggcttcagg	actacgtgtat	cgggattatc	aagactgttag	ctcaacacat	ccatggcact	480
gagatagaca	tgaaggttat	tcaagaaaga	agtgaagaat	gtgatcatac	ccaattttta	540
attqaagaaaa	aaaatcaaaa	agaaqagqat	tttatqaaq	attqa		585

10

<210> 154

<211> 194

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 154

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

&lt;210&gt; 155

&lt;211&gt; 585

5

&lt;212&gt; ADN

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 155

atgtacggtt ttgtgaacca tgcctggag ctgctggta tccgcaatta cggccccag 60  
 gtgtggaaag acatcaaaaa agaggcgcag ctggatgaag aaggccagtt tcttgtgaga 120

ataatctacg atgattccaa aacctatgac ttggggctg ctgcgagcaa agtcctcaac 180  
 ctcaatgctg gtgaatcct gcagatgtt gggaaatgt ttttcgtctt ctgtcaagag 240  
 tctgctatg ataccatctt gcgtgtcctg ggatctaatt tcagggagtt tttcagaac 300  
 ctgcacgccc tgcacgacca cctcgccacc atctacccag ggatgcgcgc actttccttc 360  
 cggtcacccg atgcagaaaa agccaaaggc ctcattctgc actactactc ggaaagagag 420  
 gggcttcagg actacgtgat cgggattatc aagactgttag ctcaacagat ccatggcact 480  
 gagatagaca tgaaggat tat tcagcaaaga agtgaagaat gtgatcatac ccaattttta 540  
 attgaagaaa aagaatcaa agaagaggat ttttatgaag attga 585

10

&lt;210&gt; 156

&lt;211&gt; 194

&lt;212&gt; PRT

15

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 156

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

&lt;210&gt; 157

&lt;211&gt; 2229

5

&lt;212&gt; ADN

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 157

atgtatggat tcatacacac ctgcctgcag tctcttgtga cagagaaatt tggtgaggag 60  
 acatggaga agctgaaggc tcctgcagaa gtgcaagatg tcttcatgac ctacaccgtg 120  
 tatgatgaca tcataccat taagctcatc caagaaggct gcaaggttct ggatgtgtcc 180  
 atggaagcca ttctgaagct ctttggcgaa tacttcttta agttctgtaa gatgtctggc 240  
 tatgacagga tgctgcggac acttggagga aatctcacccg agtttattga aaaccttagat 300  
 gcactccaca gttacctggc actgtcttat caggaatga acgcaccatc ctttcgagtg 360  
 gaggaaggag ctgacggggc gatgcttctc cactactact cagacagaca tggtctgtgt 420  
 cacattgtac caggtatcat tgaagctgtg gccaaggact tctttgacac tgatgtggcc 480  
 atgagtatcc tggatatgaa cgaagaggtg gaaaggacag gaaagaaaaga acatgttg 540  
 tttctggtcg tgcagaaggc tcacagacag ataagaggag caaaggcaag ccggccacaa 600  
 ggcagtgagg acagccaggc agaccaggag gctctccagg gaacactctc tcggatgaag 660  
 gagagatatt taaacatccc tggatggccct ggggagaaat ctcactcaac tgctgtgagg 720  
 gcatcggtcc ttttggaaa agggccccctc agggacacct tccagccctt ctatcctgag 780  
 agactatggg tcgaagagga ggtgttctgt gatgctttc ctttccacat tgtcttgat 840  
 gaagcactaa gggtaaagca agctggagtg aatattcaga agtatgtccc tggaatctta 900  
 acccagaagt ttgcactaga tgagtatcc tccatcatcc accctcaagt tactttcaac 960

atctccagca tctgcaagtt cattaacagt cagtttgtct tgaagacaag aaaagaaaatg 1020  
 atgccccaaag caaggaagag ccagccgatg ctcaaactcc ggggtcagat gatctggatg 1080  
 gagtcctcga ggtgcatgtat cttcatgtgt tccccaaacg tccgcagcct gcaagagctg 1140  
 gaagagagca agatgcatct ttctgatatac gctccgcacg acacgaccag ggatctcatc 1200  
 ctccctaacc accagaggct ggcagagatg gagctgtctt gccaaactgga aaagaagaag 1260  
 gaggagttgc gtgtccttcc caatcacctg gccatcgaga agaagaagac agagaccttg 1320  
 ctgtatgcca tgctgcctga acatgtggcc aaccaactca aggagggcag aaaggtggct 1380  
 gcaggagaat ttgaaacatg tacaatcctt tttagcgtat ttgtgacatt taccacatc 1440  
 tgtgcagcct gtgaacctat ccaaatacgta aacatgctga attcaatgta ctccaaagtt 1500  
 gacaggttaa ccagtgtcca ttagtgcatac aaagtagaaa caatagggga tgcttacatg 1560  
 gtgggtgggtg gagtaccagt acccggttgcgaa agccatgctc aaagagtgcg caatttgtct 1620  
 ctggggatga gaatttctgc aaaaagaatg atgaatcctg tcactgggga acctatccag 1680  
 atcagagtgg gaatccacac tggaccagtc tttagcagggtt ttgtgggaga caagatgcct 1740  
 cggtactgct tgggggtgtt gactgtaaac acagctctta ggatggaaag tcacgggctt 1800  
 cccagcaaag tgcacatctgag ccccacagcc cacagagccc taaaaacaaa agggtttggaa 1860  
 attgtcagga gaggcgagat cgaagtgttgc gggaaaggaa agatgaccac atactttctg 1920  
 atccagaacc tgaatgccac cgaggatgag ataatggggc gacttcagec ccccgctgtat 1980  
 gggaaaggaaat tatgtactcc cggaaacccaa gtcaggaaatg cccctgtgtt cccgagggaaac 2040  
 acagaccatc agcaacaatg ctacaaagga gacccagcag acgcttctaa tgaagtca 2100  
 cttgcgtgggaa gcccagtggc aggccggaaac tccacagatg cagtcaataa ccagccatca 2160  
 ccagatgaga ccaagacaag tgcgttgcgat agtggccctg tgctgtctgc tttctgtgtt 2220  
**gtgtgtgtga** 2229

5

<210> 158  
 <211> 742  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 158

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

Gly Val Asn Ile Gln Lys Tyr Val Pro Gly Ile Leu Thr Gln Lys Phe  
 290 295 300  
 Ala Leu Asp Glu Tyr Phe Ser Ile Ile His Pro Gln Val Thr Phe Asn  
 305 310 315 320  
 Ile Ser Ser Ile Cys Lys Phe Ile Asn Ser Gln Phe Val Leu Lys Thr  
 325 330 335  
 Arg Lys Glu Met Met Pro Lys Ala Arg Lys Ser Gln Pro Met Leu Lys  
 340 345 350  
 Leu Arg Gly Gln Met Ile Trp Met Glu Ser Leu Arg Cys Met Ile Phe  
 355 360 365  
 Met Cys Ser Pro Asn Val Arg Ser Leu Gln Glu Leu Glu Glu Ser Lys  
 370 375 380  
 Met His Leu Ser Asp Ile Ala Pro His Asp Thr Thr Arg Asp Leu Ile  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Ala Glu Met Glu Leu Ser Cys Gln Leu  
 405 410 415  
 Glu Lys Lys Glu Glu Leu Arg Val Leu Ser Asn His Leu Ala Ile  
 420 425 430  
 Glu Lys Lys Thr Glu Thr Leu Leu Tyr Ala Met Leu Pro Glu His  
 435 440 445  
 Val Ala Asn Gln Leu Lys Glu Gly Arg Lys Val Ala Ala Gly Glu Phe  
 450 455 460  
 Glu Thr Cys Thr Ile Leu Phe Ser Asp Val Val Thr Phe Thr Asn Ile  
 465 470 475 480  
 Cys Ala Ala Cys Glu Pro Ile Gln Ile Val Asn Met Leu Asn Ser Met  
 485 490 495  
 Tyr Ser Lys Phe Asp Arg Leu Thr Ser Val His Asp Val Tyr Lys Val  
 500 505 510  
 Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Val Gly Gly Val Pro Val Pro  
 515 520 525  
 Val Glu Ser His Ala Gln Arg Val Ala Asn Phe Ala Leu Gly Met Arg  
 530 535 540  
 Ile Ser Ala Lys Glu Val Met Asn Pro Val Thr Gly Glu Pro Ile Gln  
 545 550 555 560  
 Ile Arg Val Gly Ile His Thr Gly Pro Val Leu Ala Gly Val Val Gly  
 565 570 575  
 Asp Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn Thr Ala  
 580 585 590  
 Ser Arg Met Glu Ser His Gly Leu Pro Ser Lys Val His Leu Ser Pro  
 595 600 605  
 Thr Ala His Arg Ala Leu Lys Asn Lys Gly Phe Glu Ile Val Arg Arg  
 610 615 620  
 Gly Glu Ile Glu Val Lys Gly Lys Gly Lys Met Thr Thr Tyr Phe Leu  
 625 630 635 640  
 Ile Gln Asn Leu Asn Ala Thr Glu Asp Glu Ile Met Gly Arg Pro Ser  
 645 650 655  
 Ala Pro Ala Asp Gly Lys Glu Val Cys Thr Pro Gly Asn Gln Val Arg  
 660 665 670  
 Lys Ser Pro Ala Val Pro Arg Asn Thr Asp His Gln Gln Val Tyr  
 675 680 685  
 Lys Gly Asp Pro Ala Asp Ala Ser Asn Glu Val Thr Leu Ala Gly Ser  
 690 695 700  
 Pro Val Ala Gly Arg Asn Ser Thr Asp Ala Val Asn Asn Gln Pro Ser  
 705 710 715 720  
 Pro Asp Glu Thr Lys Thr Ser Val Val Ala Ser Gly Pro Val Leu Ser  
 725 730 735  
 Ala Phe Cys Val Val Leu  
 740

&lt;210&gt; 159

&lt;211&gt; 651

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 159

atgtatggat tcataaacac ctgcctgcag tctttgtga cagagaaatt tggtgaggag 60  
 acatggaga agctgaagc tcctgcagaa gtcaagatg tcttcatgac ctacaccgtg 120  
 tatgatgaca tcataccat taagctcatc caagaagcct gcaaggtct ggatgtgtcc 180  
 atgaaagcca ttctgaagct cttggcgaa tacttctta agttctgtaa gatgtctggc 240  
 tatgacagga tgctgcccac acttggagga aatctcaccg agtttatgaa aaaccttagat 300  
 gcactccaca gttacccgc actgtcctat cagggaaatga acgcaccatc cttcgagtg 360  
 gaggaaggag ctgacgggc gatgcttcactact cagacagaca tggctgtgt 420  
 cacattgtac caggtatcat tgaagctgtg gccaaggact tcttgacac tgatgtggc 480  
 atgagtatcc tggatatgaa cgaagaggtt gaaaggacag ggaagaaaga acatgttgtg 540  
 tttctggcgc tgcaagaaggc tcacagacag ataagaggag caaaggcaag ccggccacaa 600  
 ggcagtgagg acagccaggc agaccaggag gctctccagg gaacactct t 651

5

&lt;210&gt; 160

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

10 <213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 160

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

15

&lt;210&gt; 161

&lt;211&gt; 651

&lt;212&gt; ADN

20 <213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 161

atgtatggat tcatcaacac ctgcctgcag tctcttgtga cagagaaatt tggtgaggag 60  
 acatgggaga agctgaaggc tcctgcagaa gtgcaagatg tcttcatgac ctacaccgtg 120  
 tatgtatgaca tcatcaccat taagctcatc caagaaggct gcaagggtct ggatgtgtcc 180  
 atggaagcca ttctgaagct ctttggcgaa tacttctta agttctgtaa gatgtctggc 240  
 tatgacagga tgctgcggac acttggagga aatctcaccc agtttattga aaaccttagat 300  
 gcactccaca gttaccttgc actgtcctat caggaatga acgcaccatc ctttcgagtg 360  
 gaggaaggag ctgacggggc gatgttctc cactactact cagacagaca tggtctgtgt 420  
 cactatgtac caggtatcat tgaagctgtg gccaggact tctttgacac tgatgtggcc 480  
 atgagtatcc tggatatgaa cgaagaggtg gaaaggacag gaaagaaaaga acatgtgtg 540  
 tttctggtcg tgcagaaggc tcacagacag ataagaggag caaaggcaag ccggccacaa 600

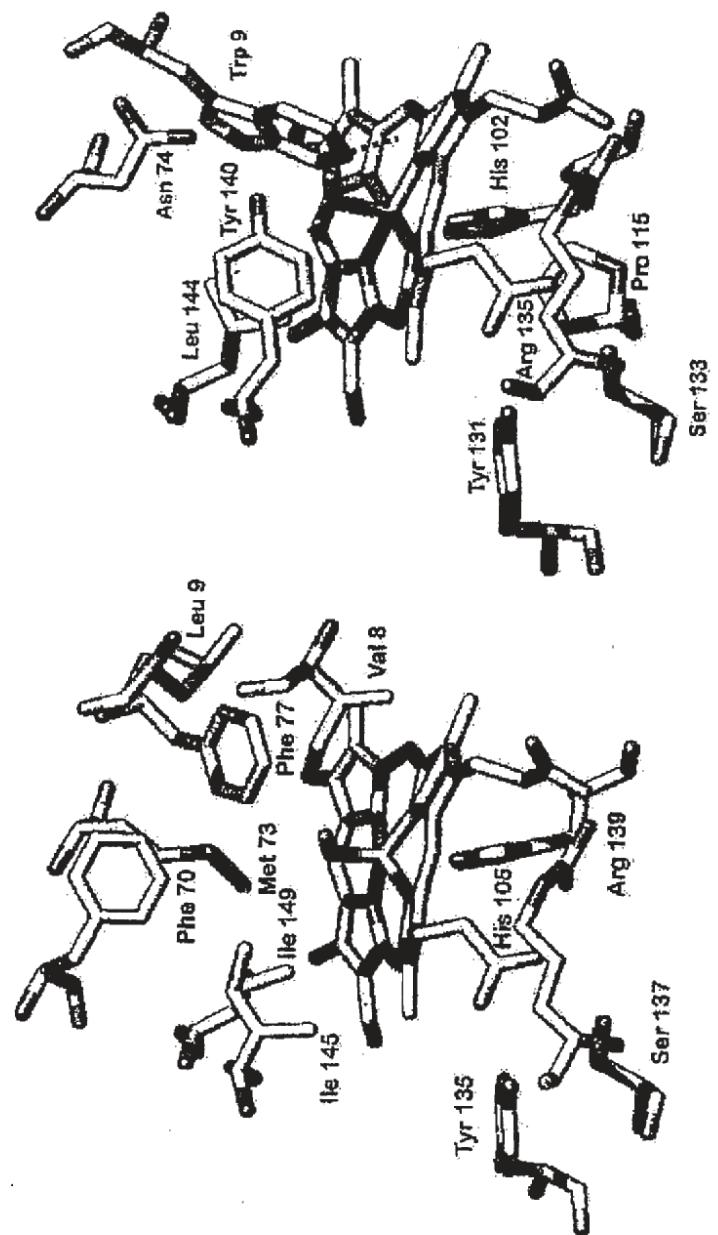
ggcagtgagg acagccaggc agaccaggag gctctccagg gaacactcct t 651

5 <210> 162  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 162

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

## REIVINDICACIONES

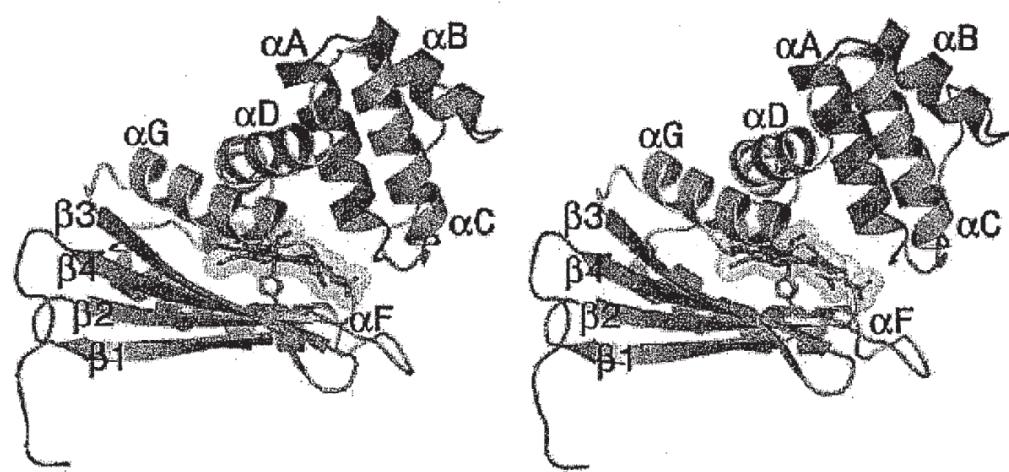
1. Una composición farmacéutica adecuada para la administración de O<sub>2</sub> a seres humanos, que comprende (i) una cantidad farmacéuticamente aceptable de una proteína H-NOX y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde ya sea
- (a) la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre 1 nM y 1 mM a 20 °C y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C, o
- (b) la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina alfa humana y la reactividad del NO de la proteína H-NOX es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina alfa humana
- y en donde la proteína H-NOX comprende al menos una mutación en el bolsillo distal, siendo dicha mutación de un resto en la hélice alfa A, D, E o G
- y en donde la proteína H-NOX no es inmunogénica en seres humanos.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la proteína H-NOX está unida covalentemente a otra molécula o fracción.
3. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la proteína H-NOX es una proteína de fusión que comprende un dominio H-NOX y parte o la totalidad de otra proteína.
4. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 1-3, en donde el oxígeno está unido a la proteína H-NOX.
5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la proteína H-NOX se deriva de una proteína bacteriana.
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre 1 nM y 1 mM a 20 °C y en donde la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a 700 s<sup>-1</sup> a 20 °C.
7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está dentro de 2 órdenes de magnitud de la de la hemoglobina alfa humana, y en donde la reactividad del NO de la proteína H-NOX es al menos 10 veces menor que la de la hemoglobina alfa humana.
8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la constante de disociación del O<sub>2</sub> de la proteína H-NOX está entre 50 nM y 50 μM a 20 °C.
9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la reactividad del NO de la proteína H-NOX es inferior a 1 s<sup>-1</sup> a 20 °C.
10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la k<sub>dis</sub> para el oxígeno de la proteína H-NOX está entre 0,01 s<sup>-1</sup> y 200 s<sup>-1</sup> a 20 °C.
11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el bolsillo distal incluye los restos Thr4, Ile5, Thr8, Trp9, Trp67, Asn74, Ile75, Phe78, Phe82, Tyr140 y Leu 144 de H-NOX de *T. tengcongensis*, de acuerdo con la SEQ ID NO: 8.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que la proteína H-NOX es L144F de *T. tengcongensis*.
13. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la proteína H-NOX no se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) H-NOX W9F de *T. tengcongensis*;
- (b) H-NOX W9F/Y140L de *T. tengcongensis*;
- (c) GCY-35 de *C. elegans*; y
- (d) H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*.
14. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es adecuada para inyección intravenosa.
15. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende adicionalmente un hidrato de carbono, un antioxidante, un agente quelante y/o un conservante.



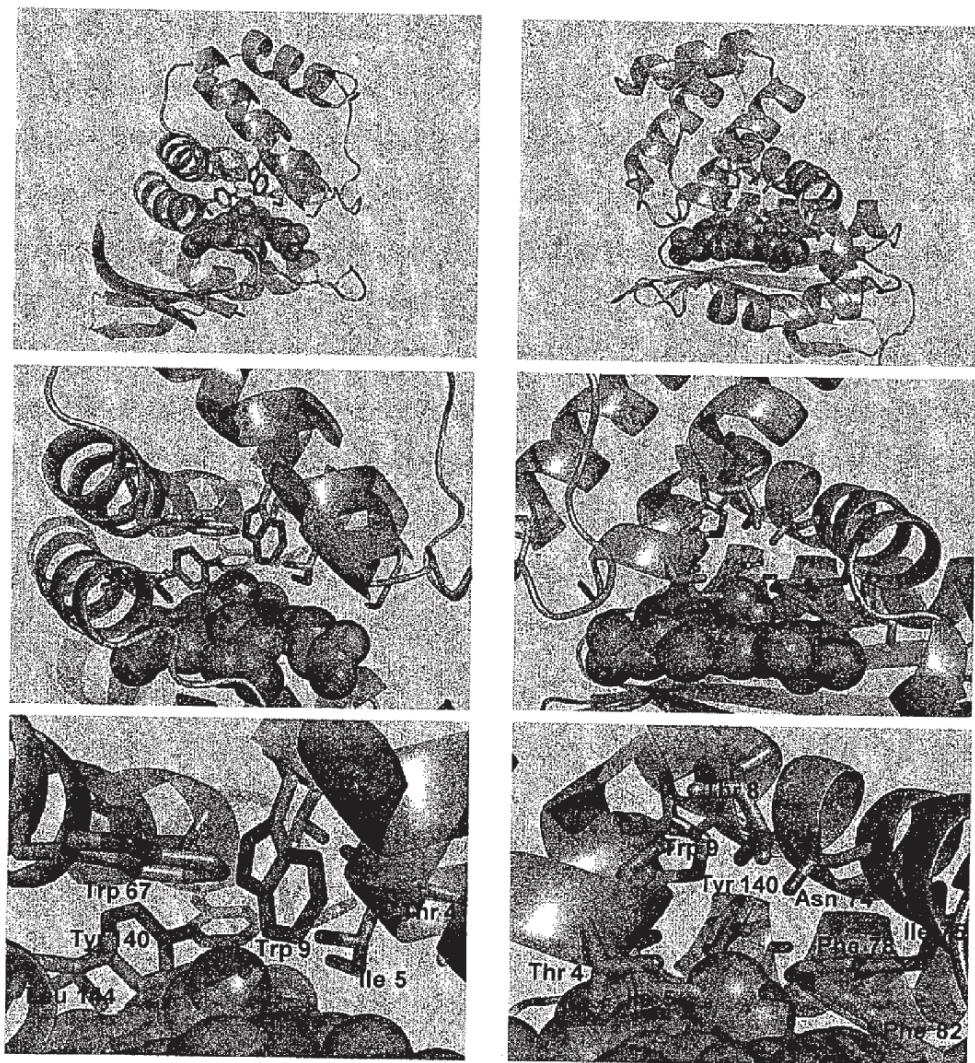
H-NOX de *T. tengcogensis*

Modelo de homología de  $\beta 1$  de *Homo sapiens*

Fig. 1  
Fig. 1A



**Figura 1B**



**Figuras 1C-1H**

Fig. 2 Ejemplos de H-NOX de unión a oxígeno

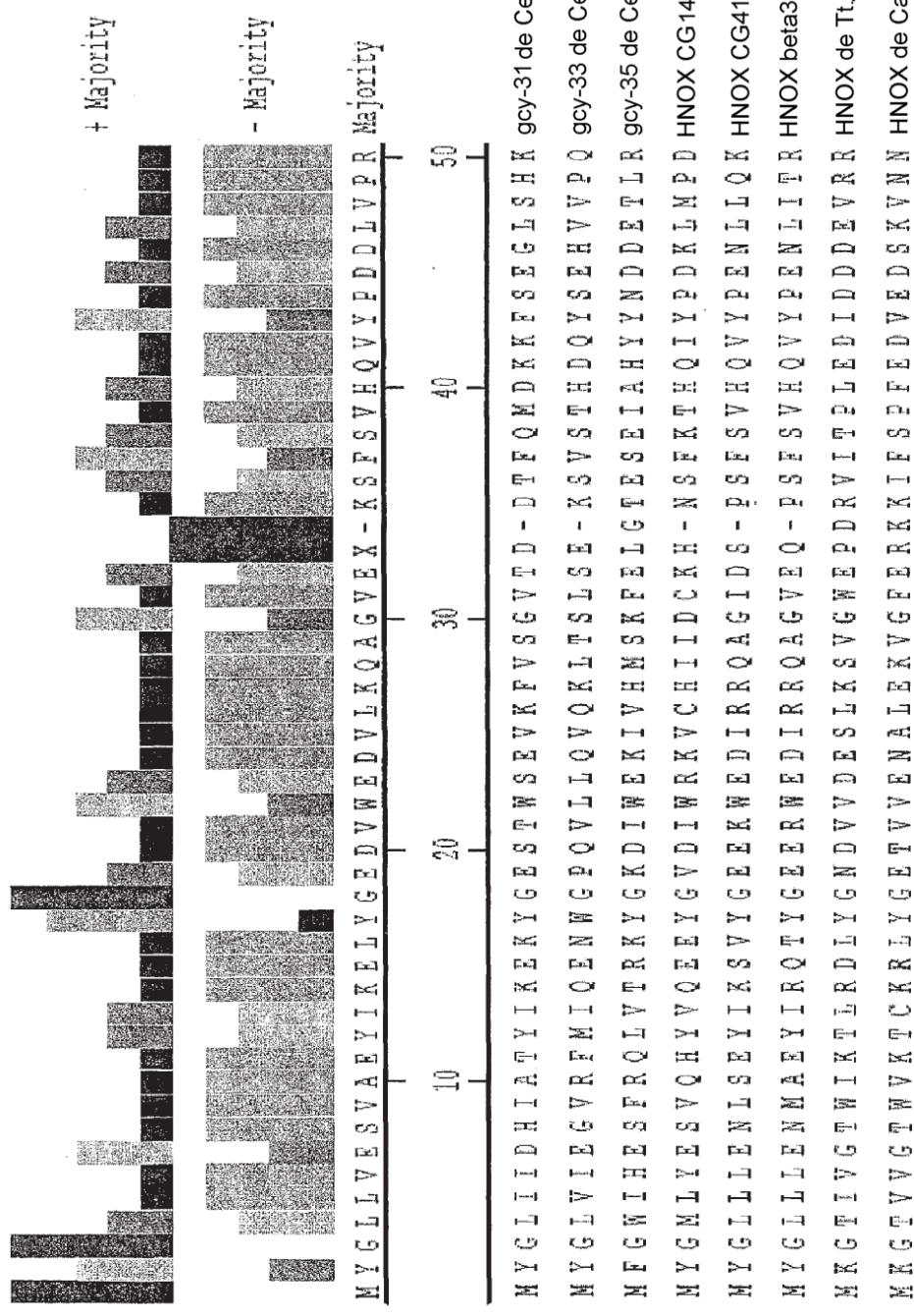


Fig. 2 (continuación)

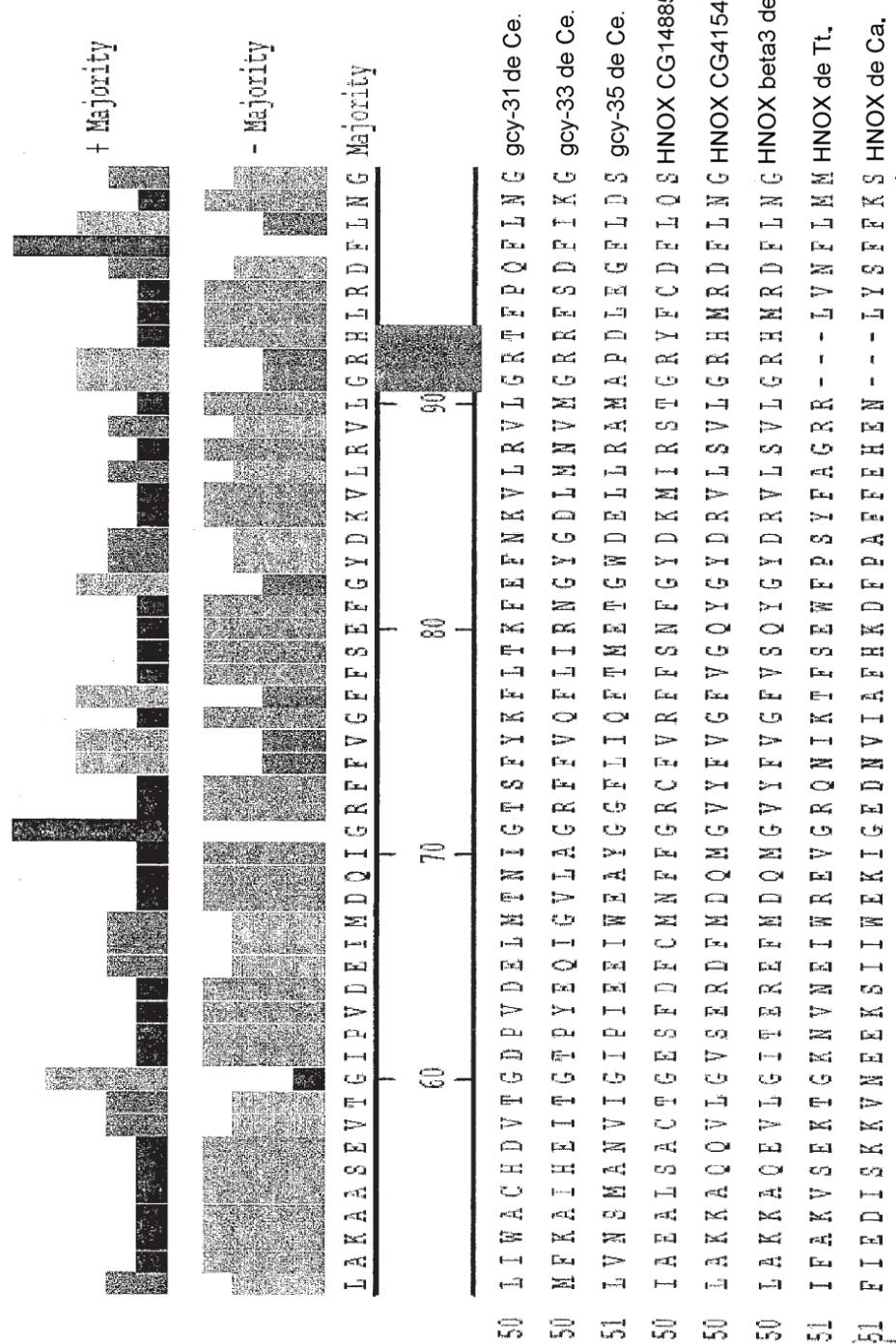


Fig. 2 (continuación)

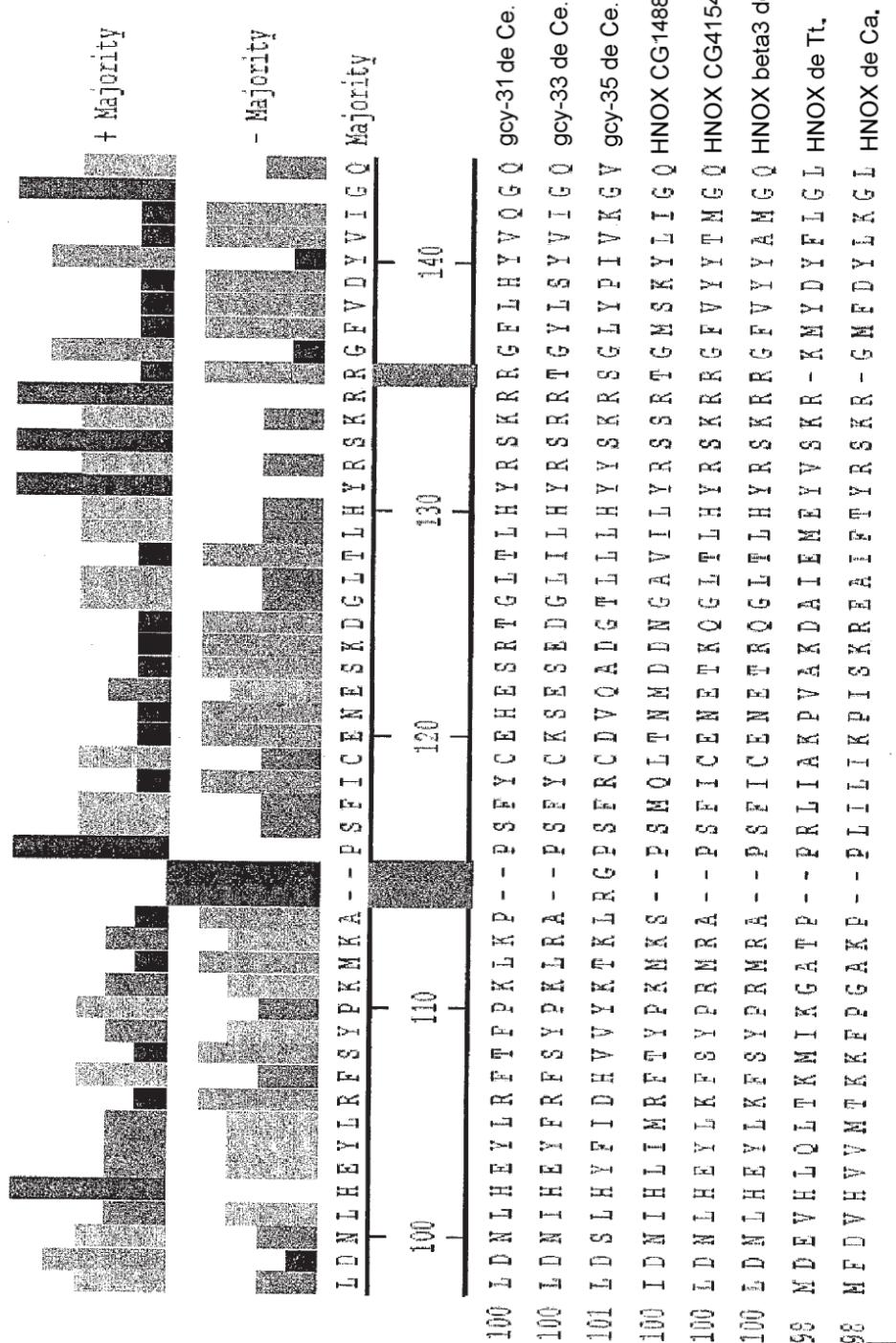


Fig. 2 (continuación)

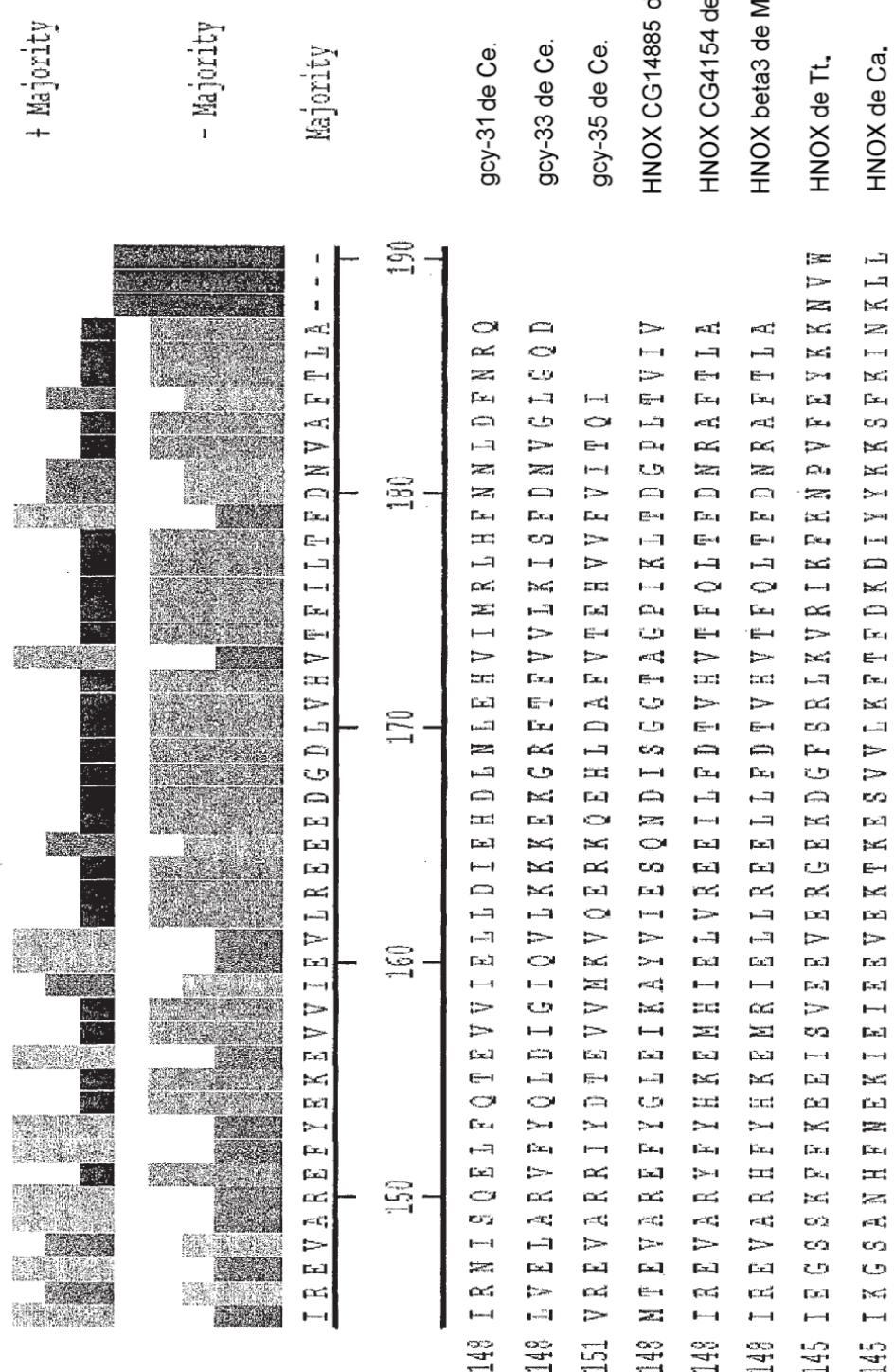


Fig. 3A Ejemplos de H-NOX que no se unen a NO

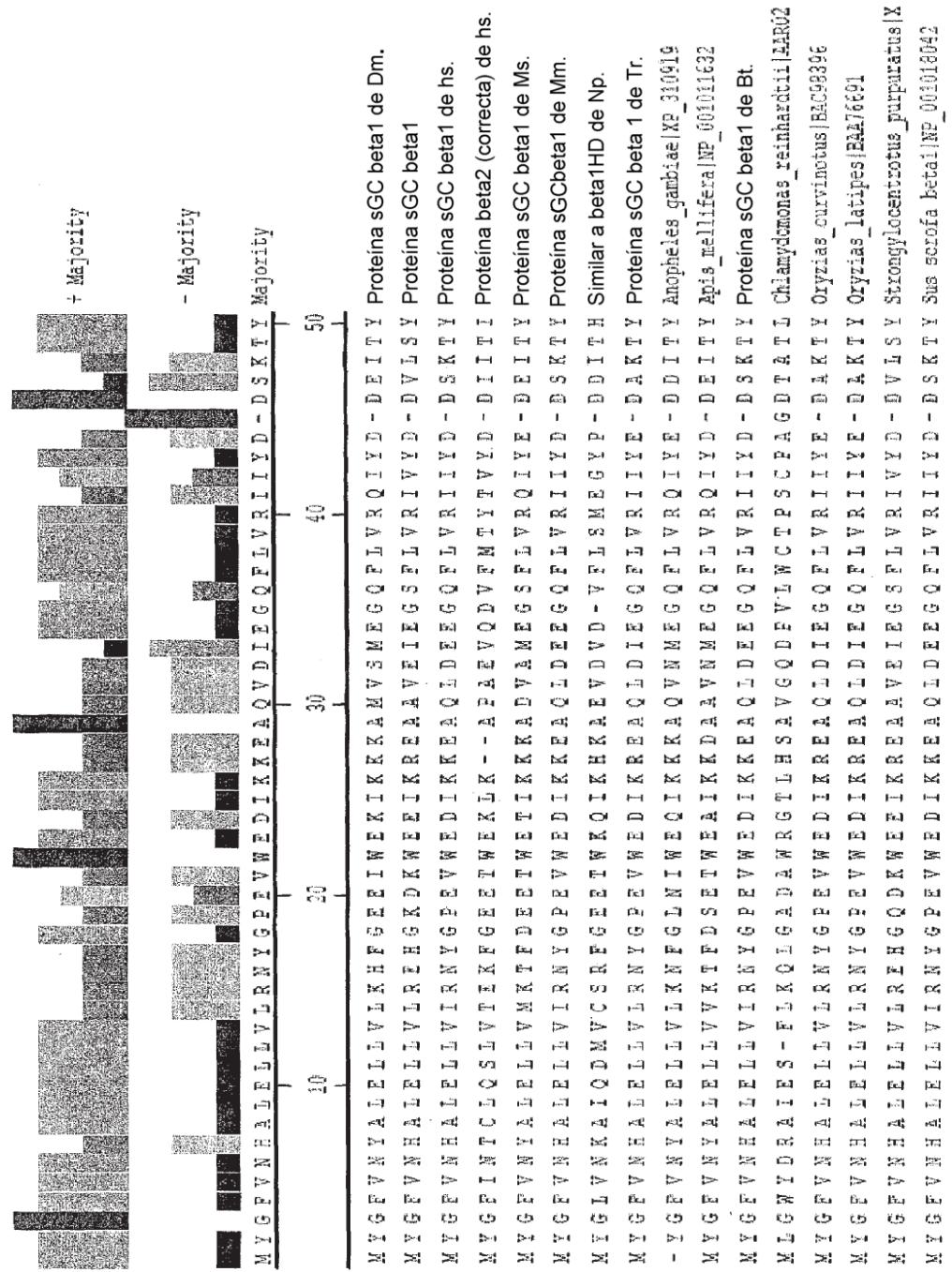


Fig. 3B

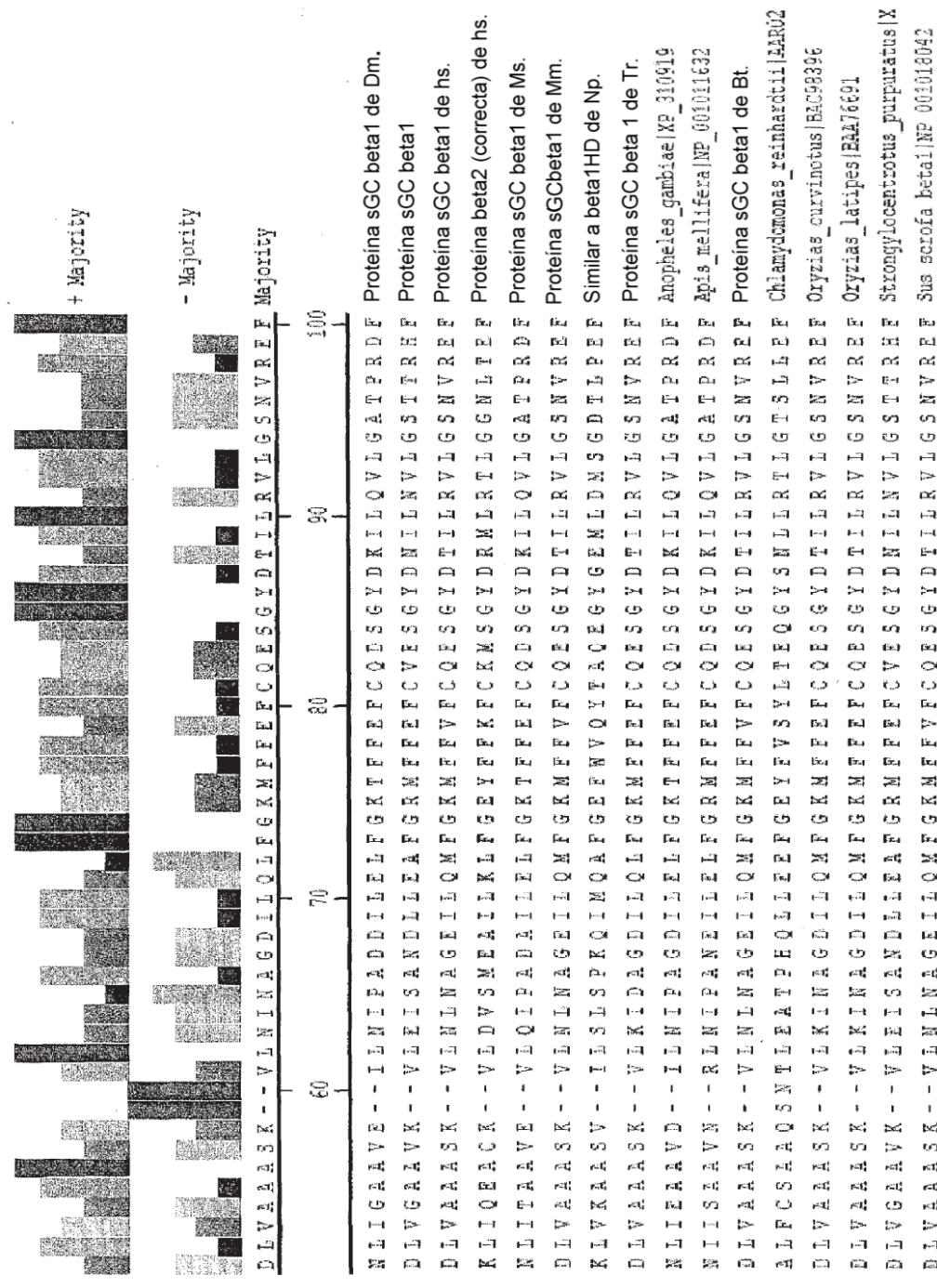
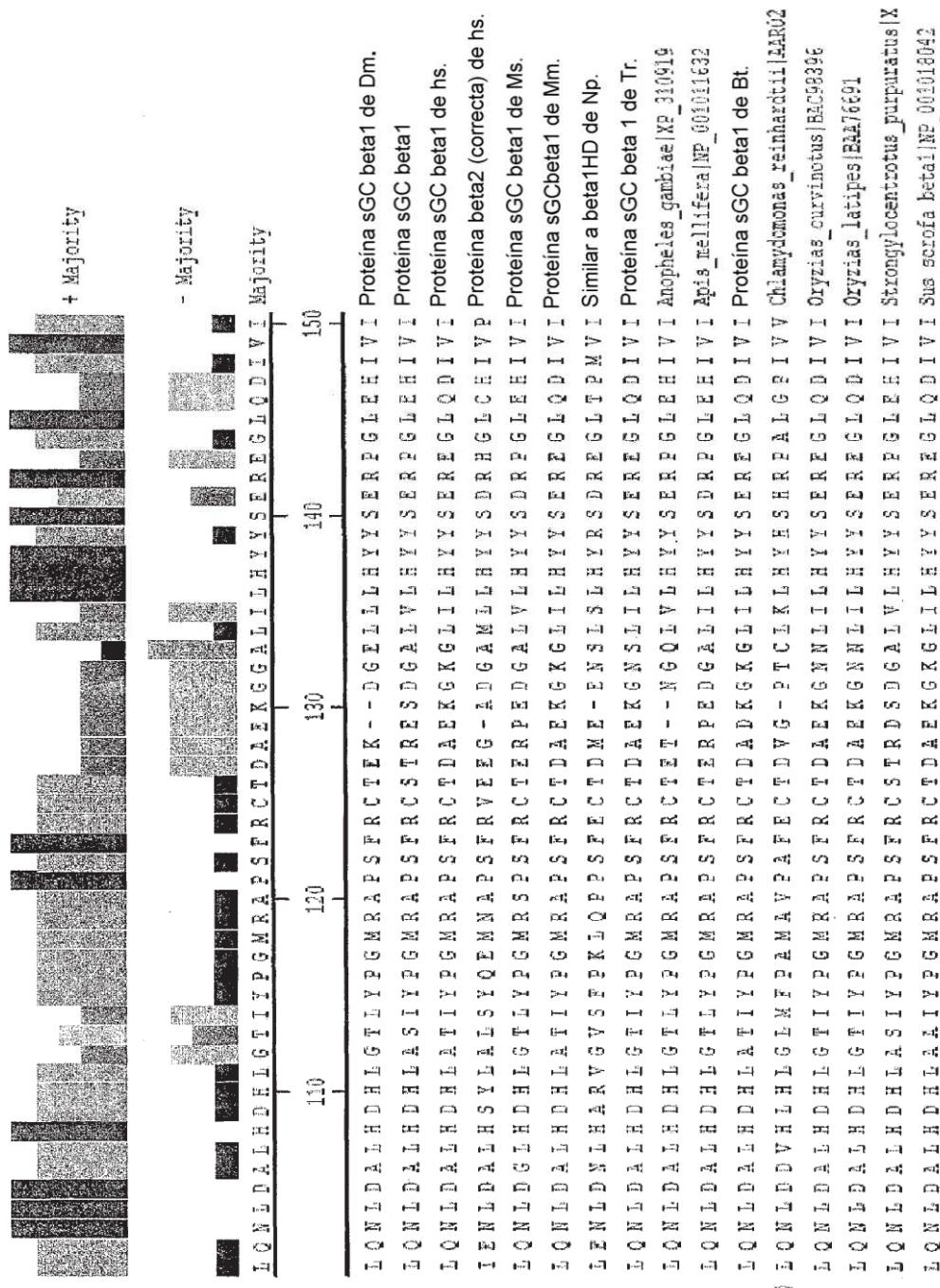
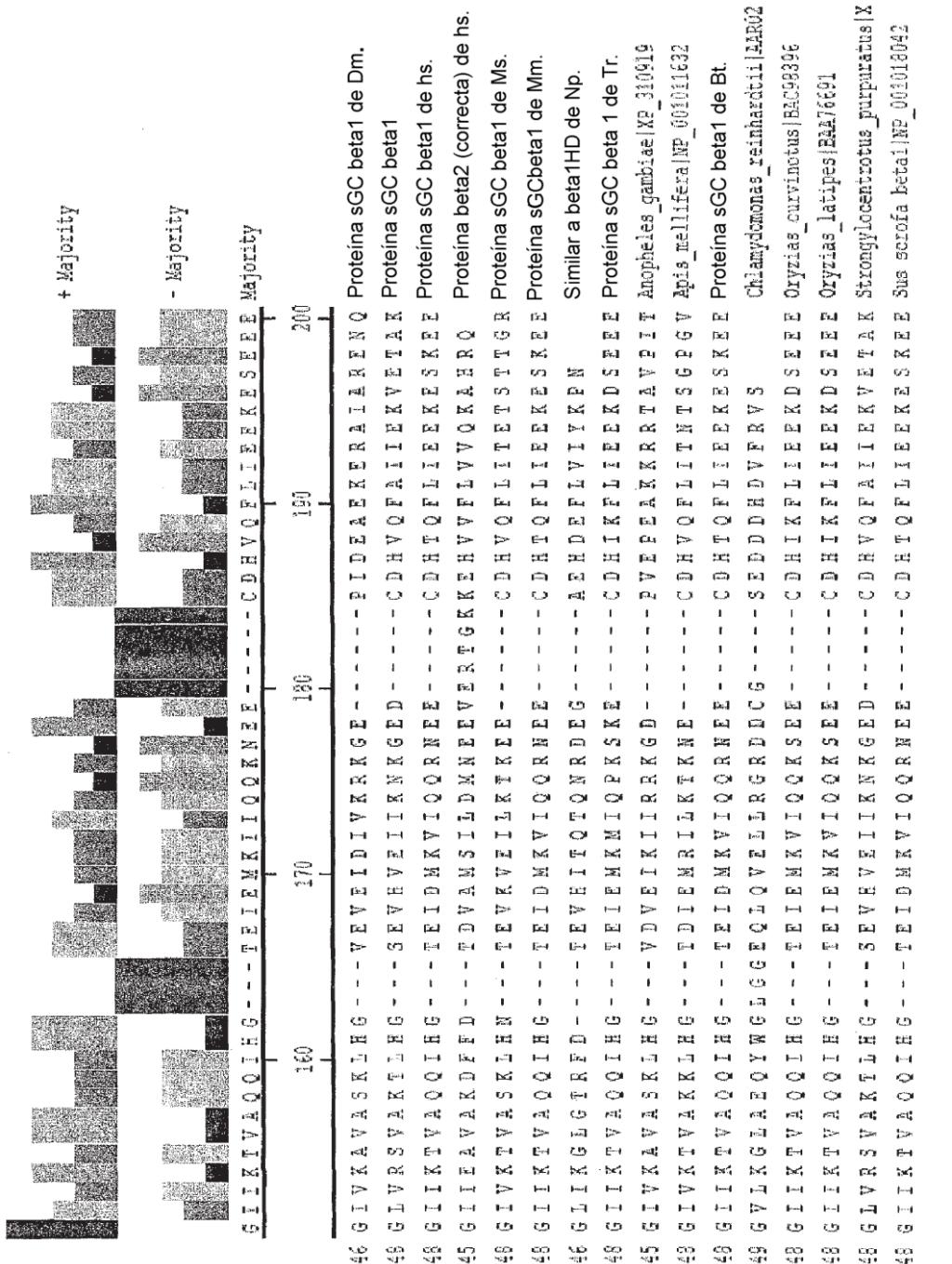


Fig. 3C



**Fig. 3D**



#### Fig. 4A Ejemplos de H-NOX de unión a oxígeno y NO

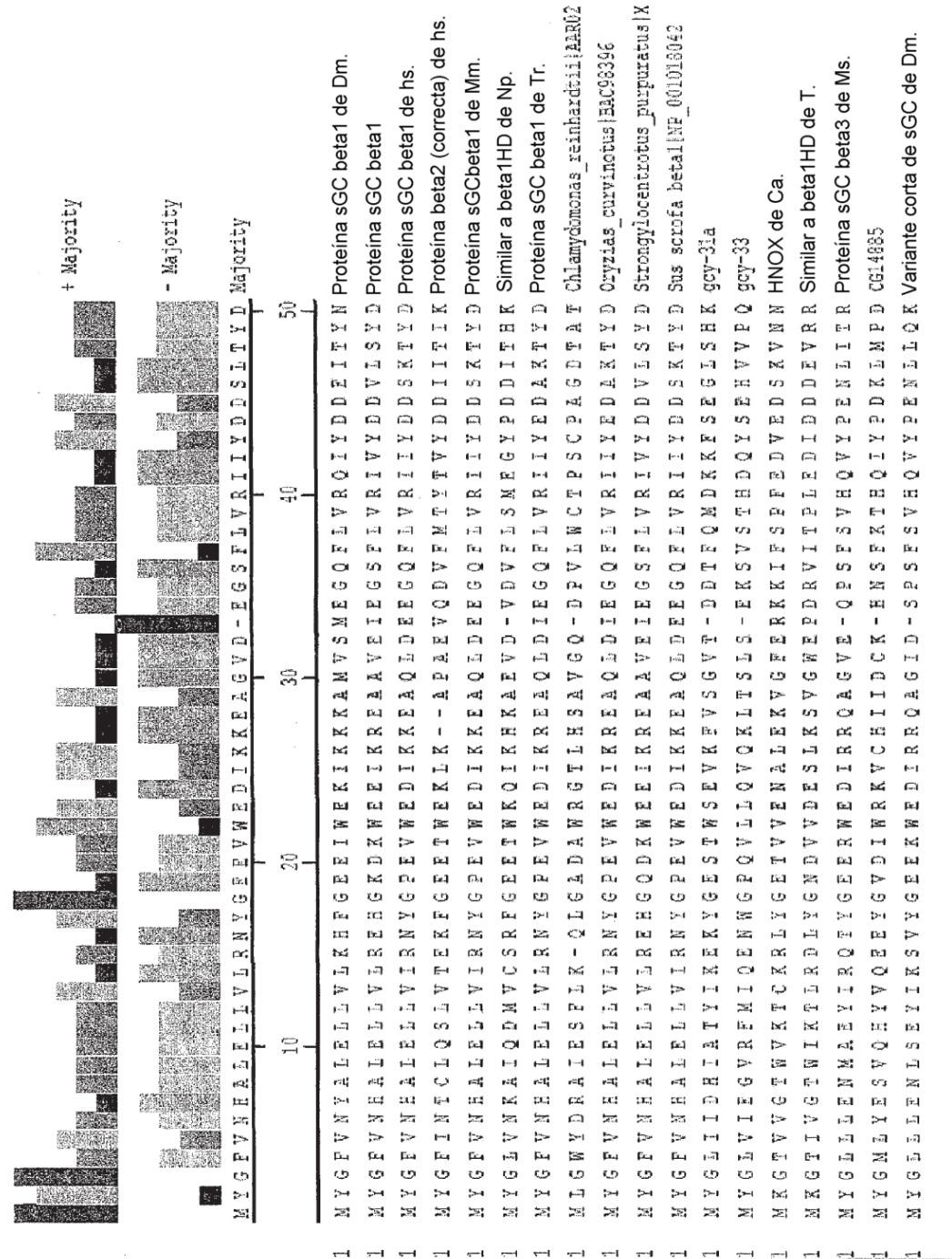


Fig. 4B

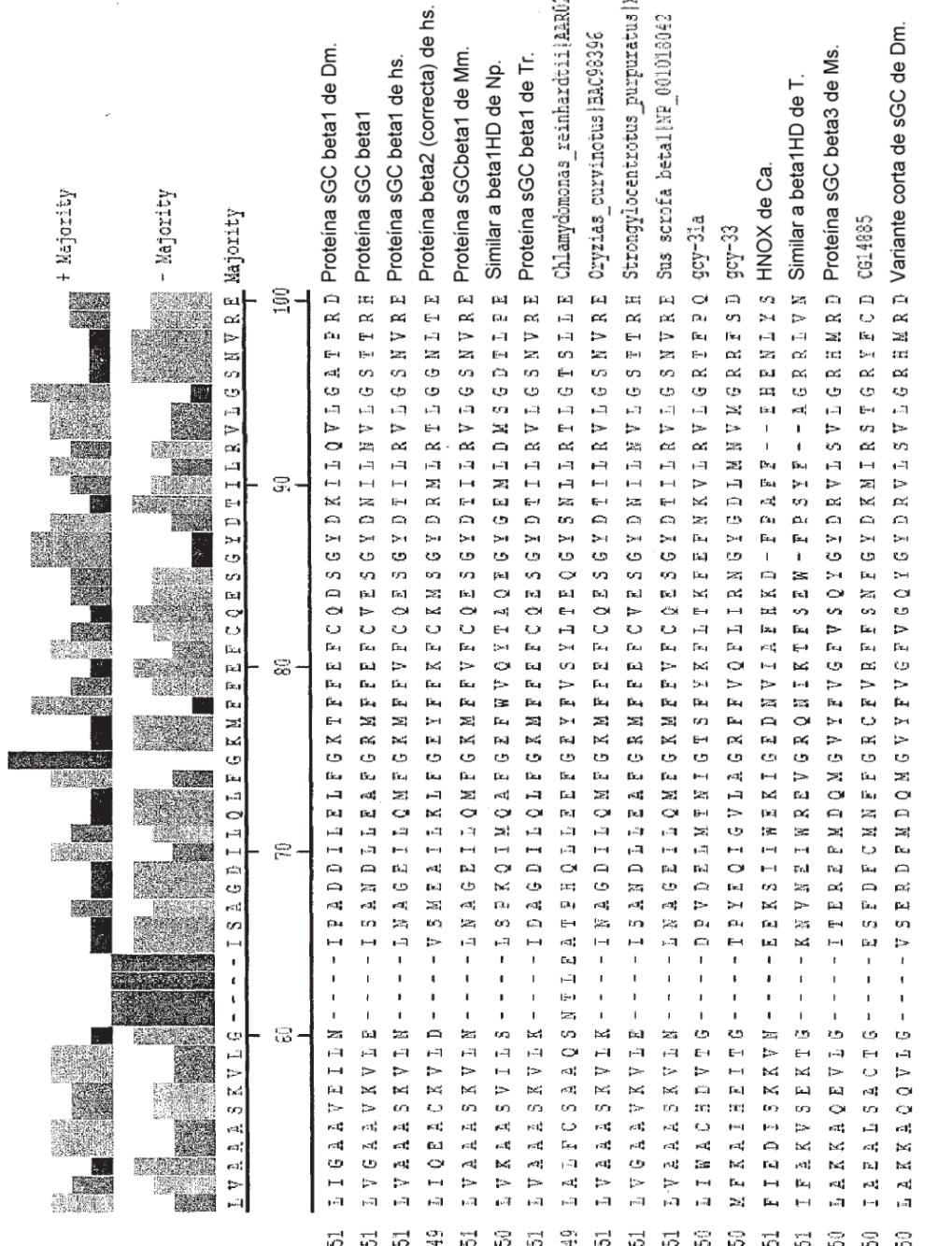


Fig. 4C

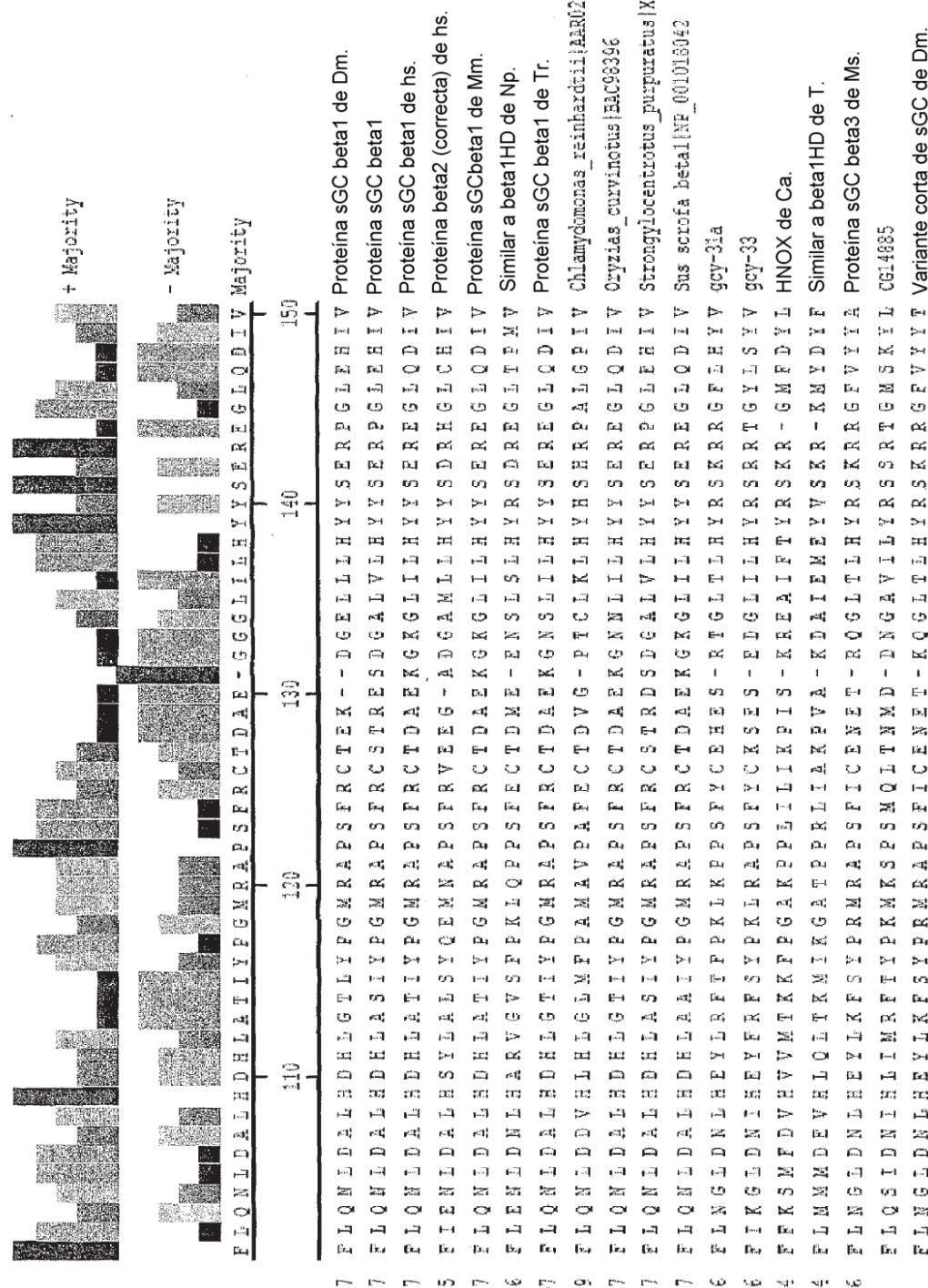
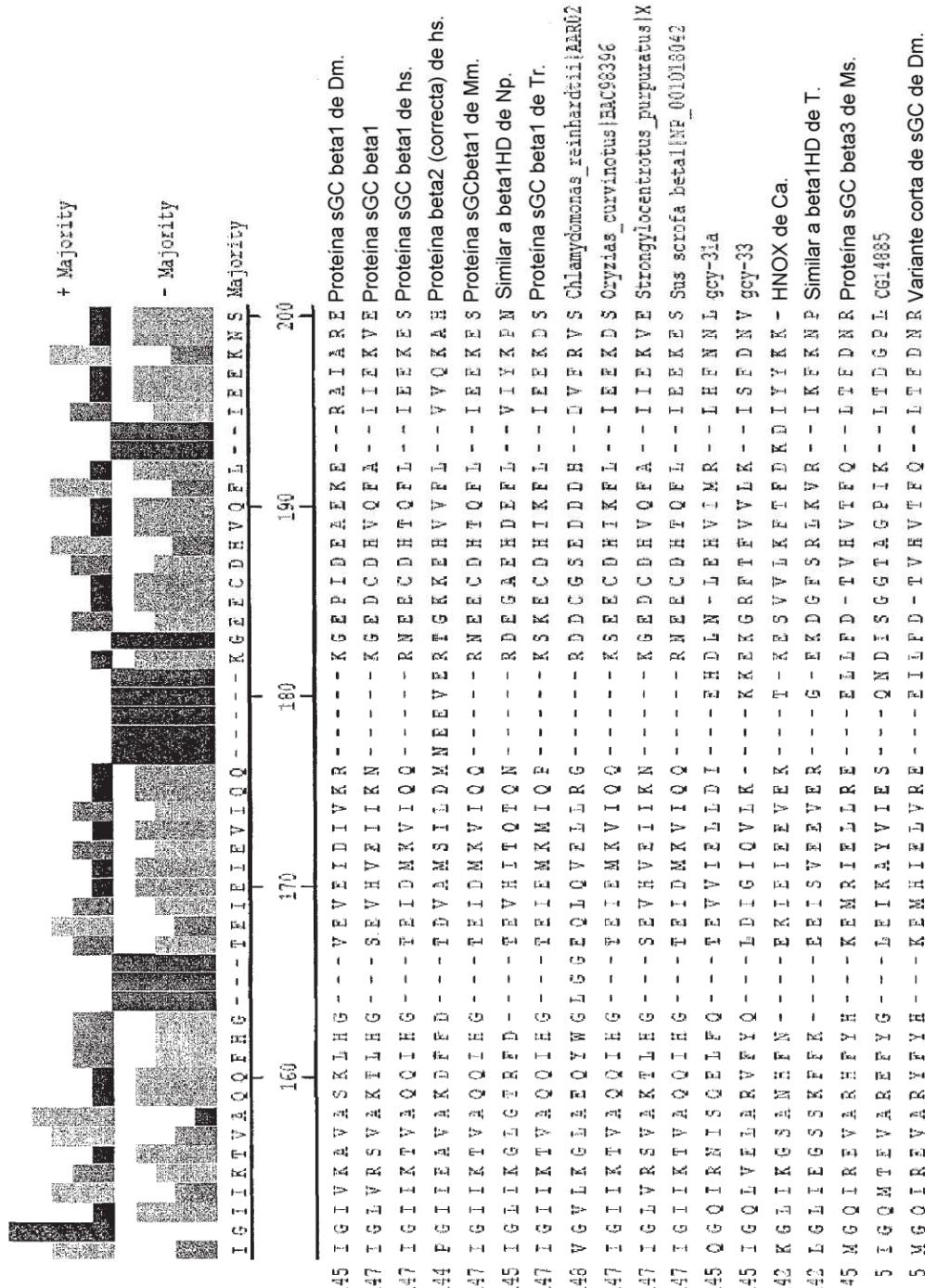
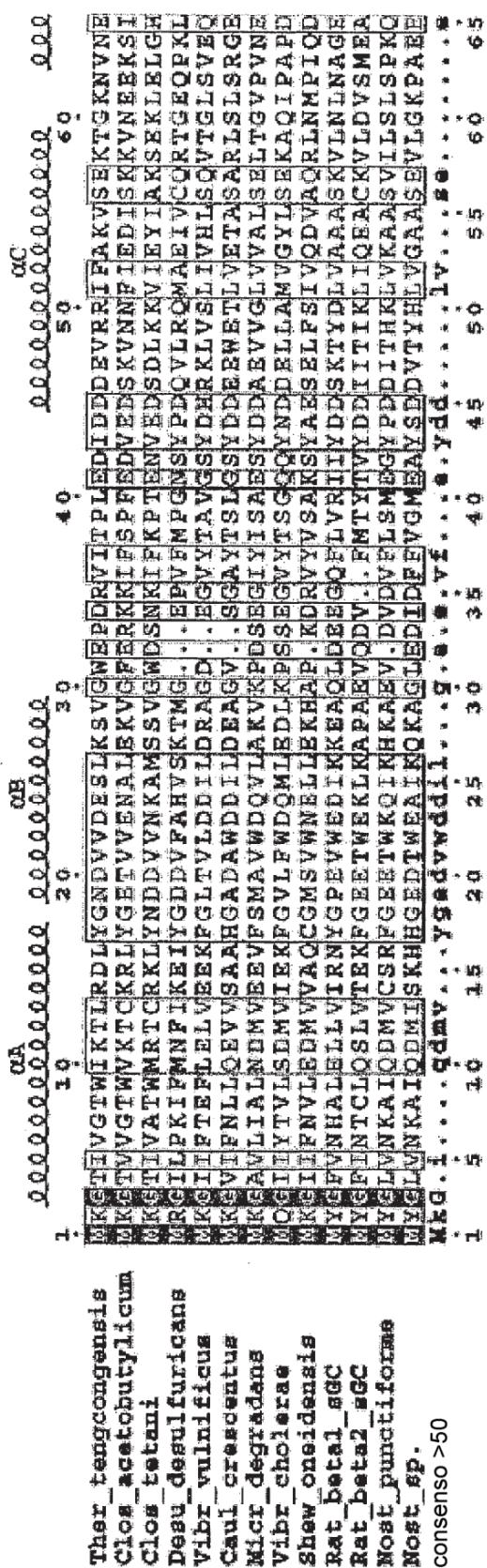


Fig. 4D

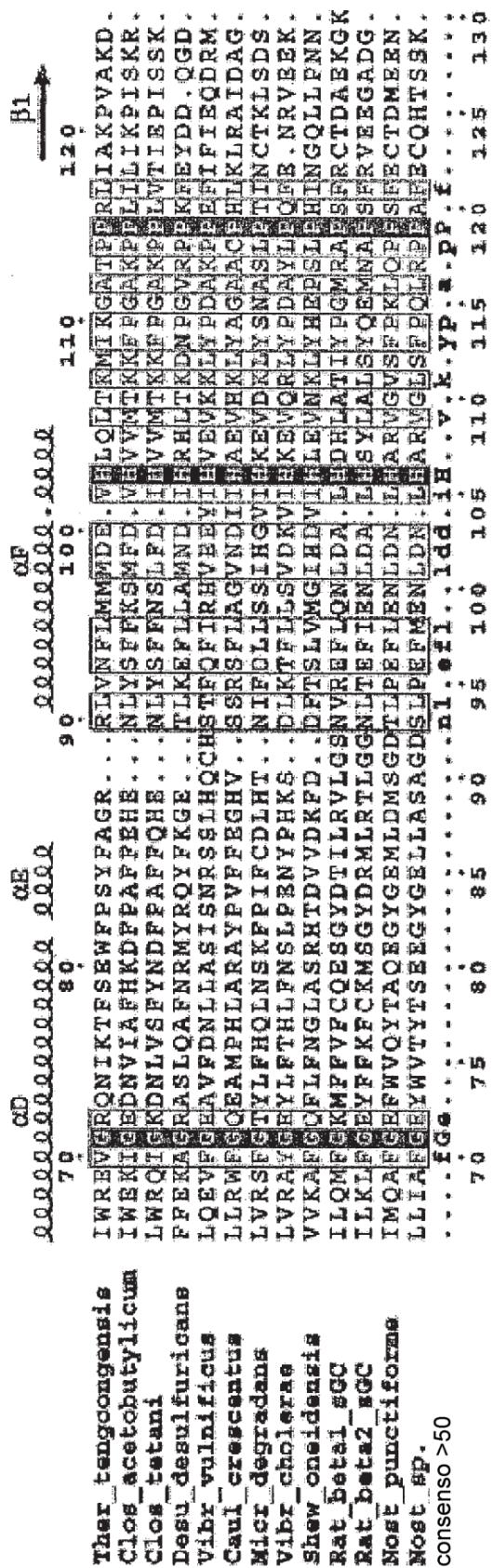


**Figura 5A**

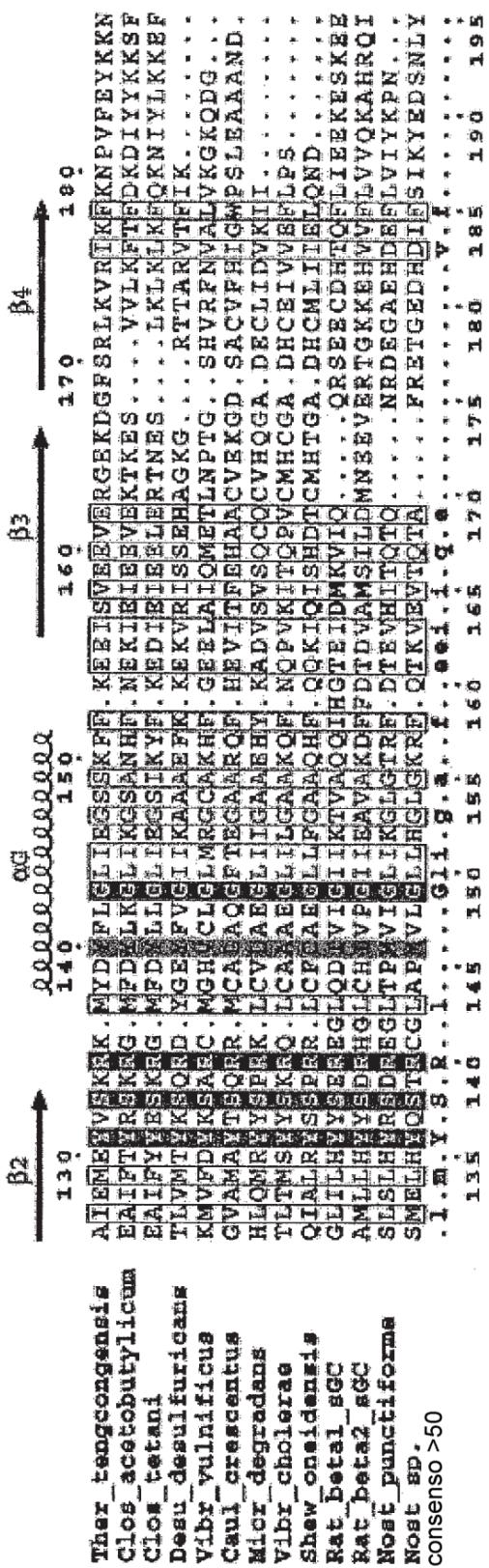
Figura 5B



**Figura 5B**  
(continuación)



**Figura 5B**  
(continuación)



**Figuras 6A y 6B**

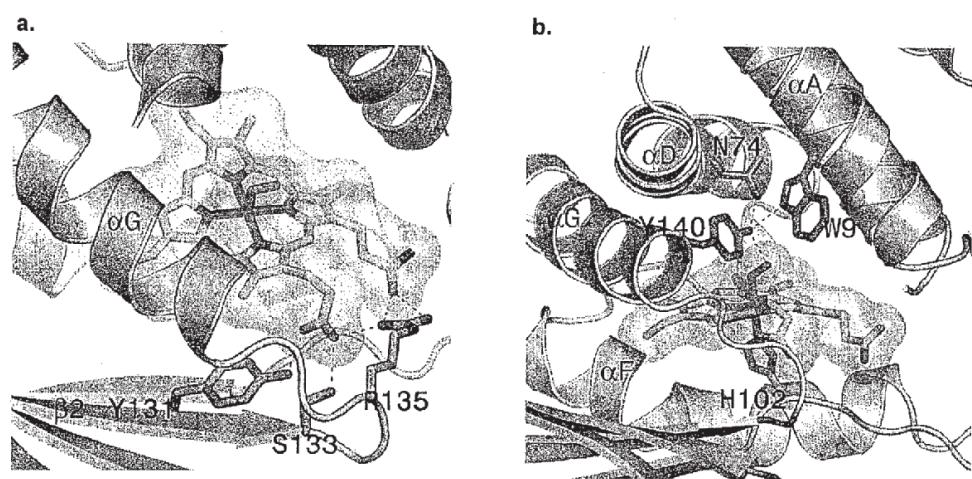


Figura 7

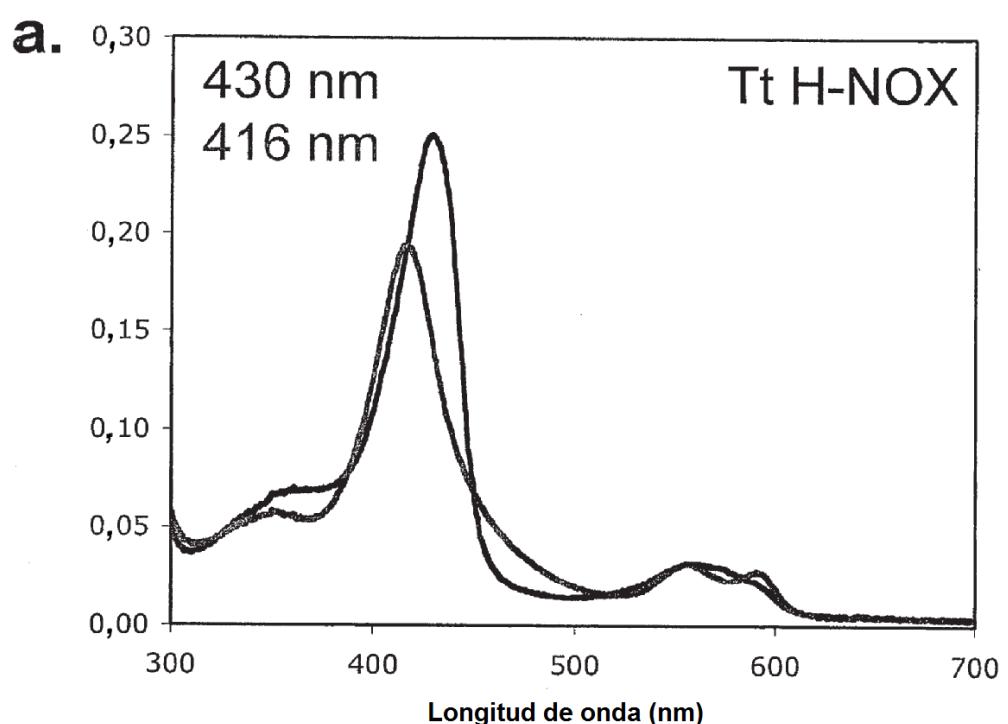


Figura 7 (continuación)

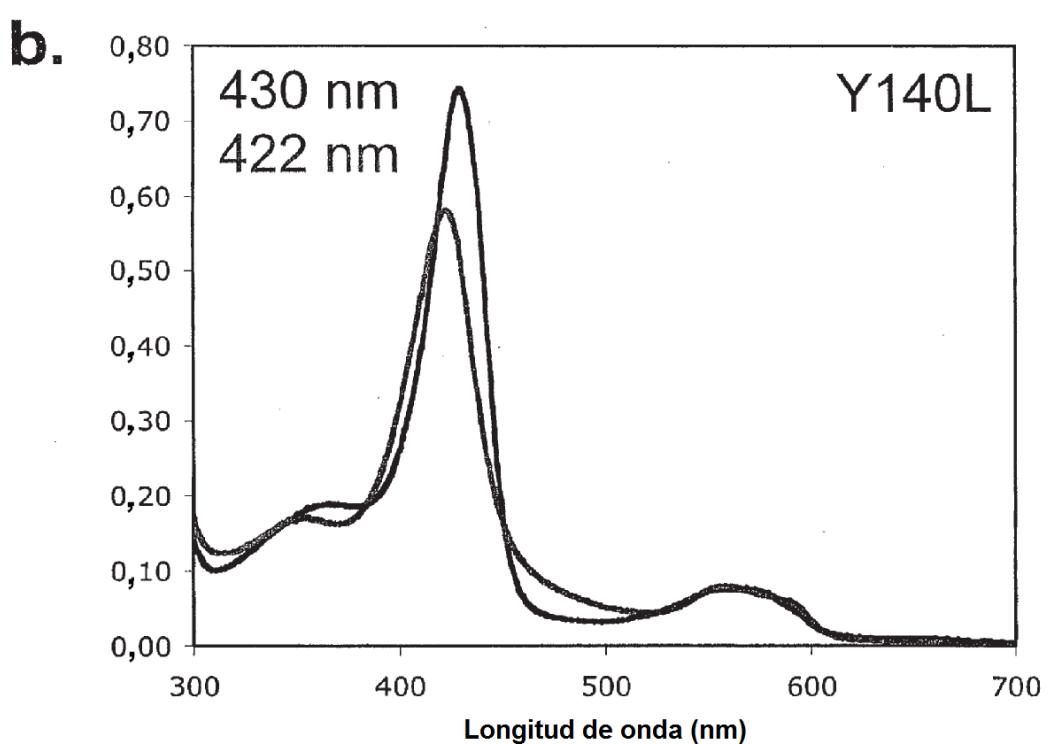


Figura 7 (continuación)

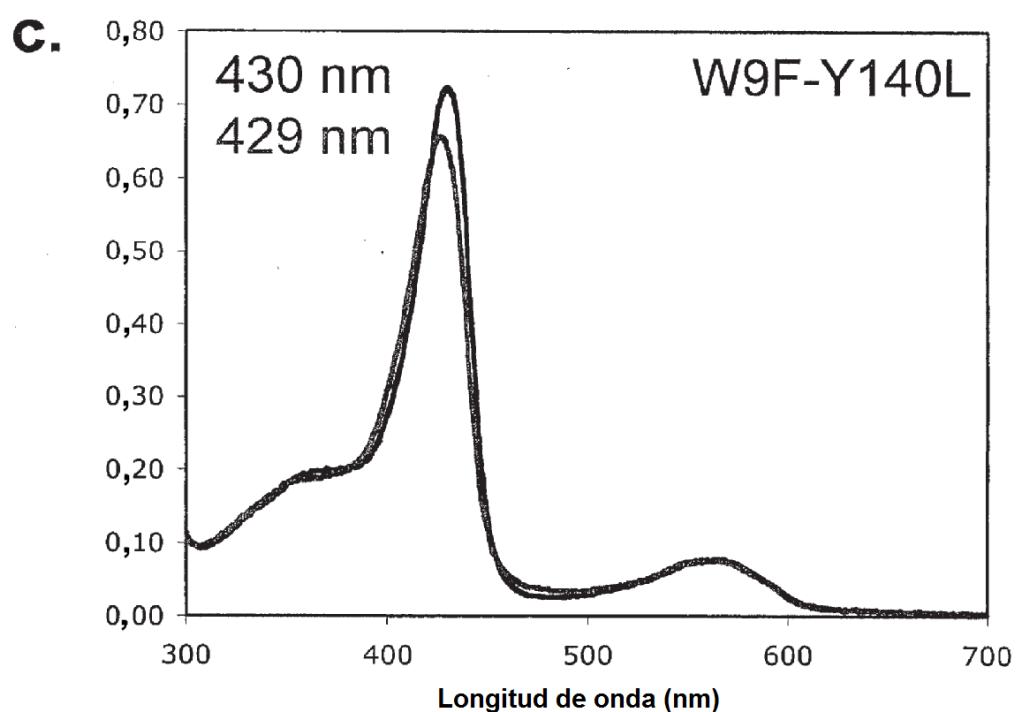


Figura 7 (continuación)

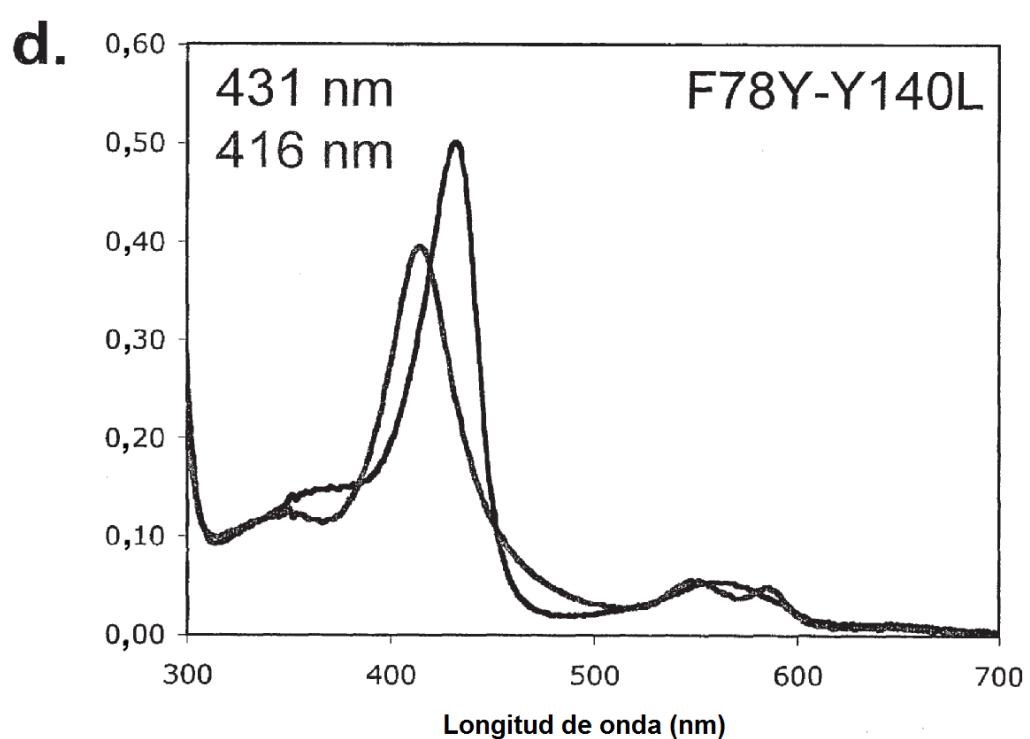


Figura 7 (continuación)

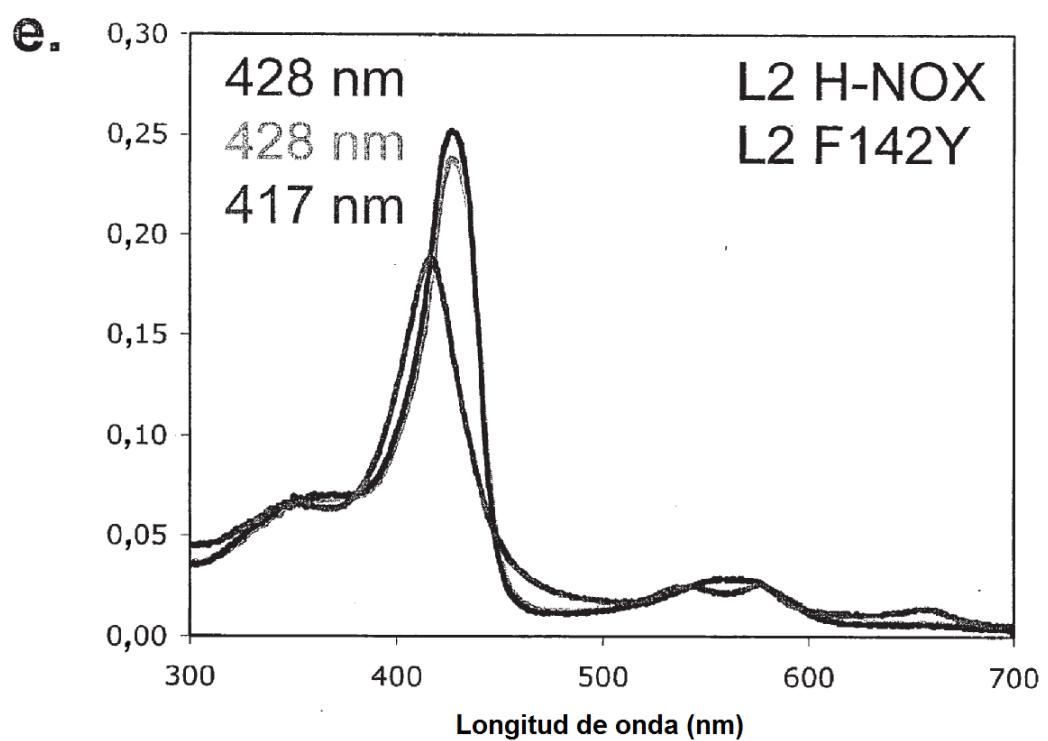
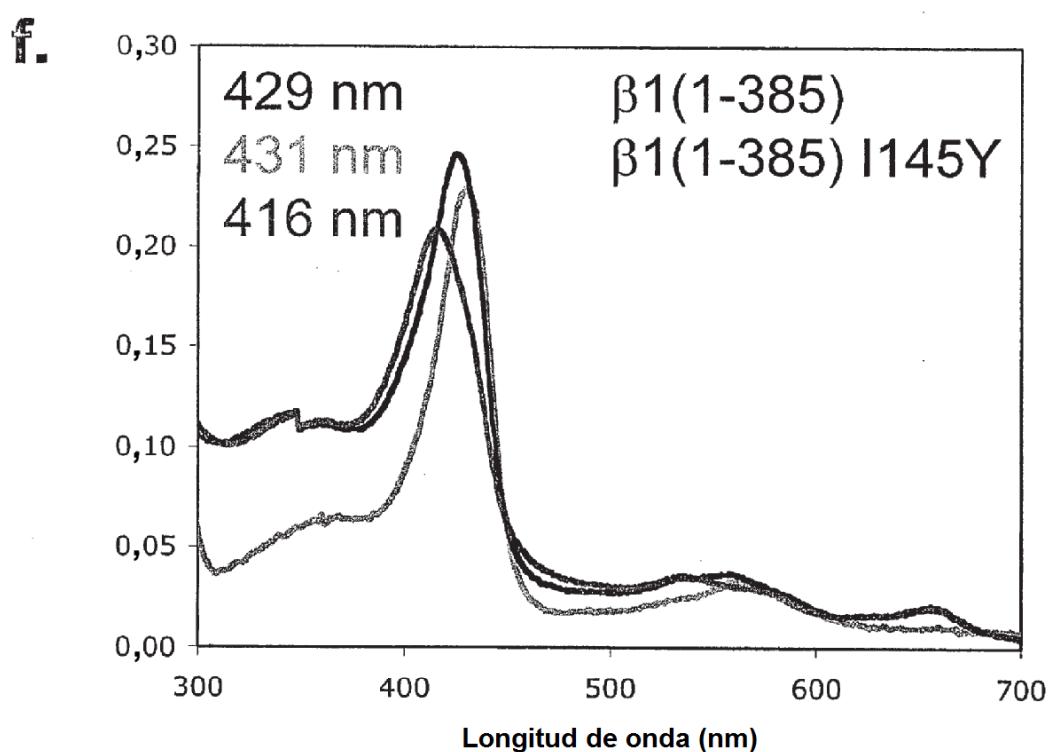


Figura 7 (continuación)



**Secuencias de H-NOX mutante y la H-NOX WT parental****NUCLEÓTIDOS seguidos de AMINOÁCIDOS****5 H-NOX de *Thermoanaerobacter tengcongensis*****Tt. WT**

(SEQ ID NO:53)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCTTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGAACAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTGGCTAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAACTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCCCTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTGGTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGAAAGAAATTTCAGTGGAGAGGTGAAAGAGGGCGAAAAAA  
 GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:54)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLRKVRIKFKNPVFE

**Tt. Y140F**

(SEQ ID NO:55)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCTTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGAACAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTGGCTAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAACTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCCCTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTGGTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTCTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGAAAGAAATTTCAGTGGAGAGGTGAAAGAGGGCGAAAAAA  
 GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:56)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYDFFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLRKVRIKFKNPVFE

FIG. 8A

**Tt. Y140L**

(SEQ ID NO:57)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTAAAAGTGTGGTTGGAACCGAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCCTATTTGCAGGGAGAACGGCTAGTGAATTGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATCACTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGAAAGAAATTTCAGTGGAAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:58)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMKGATPPRIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYDLFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGSRLKVRIFKNPVFE

**Tt. Y140H**

(SEQ ID NO:59)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTAAAAGTGTGGTTGGAACCGAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCCTATTTGCAGGGAGAACGGCTAGTGAATTGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATGCCTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGAAAGAAATTTCAGTGGAAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:60)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMKGATPPRIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYDHFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGSRLKVRIFKNPVFE

**Tt. Y140A**

(SEQ ID NO:61)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTAAAAGTGTGGTTGGAACCGAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCCTATTTGCAGGGAGAACGGCTAGTGAATTGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATGCCTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGAAAGAAATTTCAGTGGAAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:62)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMKGATPPRIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYDAFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGSRLKVRIFKNPVFE

FIG. 8B

Tt. W9F

(SEQ ID NO:63)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTATAAAGACCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGTTGGAACCGAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTCGTAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATACCCCTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGCAAGGGAGAACGGCTAGTGAATTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTTCAGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGAAAGAAATTCAAGGCTAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATT  
GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:64)

MKGTIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
WREVRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYDYLGLIEGSSKFFKEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFE

Tt. W9F/Y140L

(SEQ ID NO:65)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTATAAAGACCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGTTGGAACCGAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTCGTAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATACCCCTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGCAAGGGAGAACGGCTAGTGAATTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTTCAGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGAAAGAAATTCAAGGCTAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATT  
GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:66)

MKGTIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
WREVRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYDFFLGLIEGSSKFFKEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFE

Tt. W9F/Y140H

(SEQ ID NO:67)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTATAAAGACCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGTTGGAACCGAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTCGTAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATACCCCTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGCAAGGGAGAACGGCTAGTGAATTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATCACTTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGAAAGAAATTCAAGGCTAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATT  
GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:68)

MKGTIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
WREVRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYDHFLGLIEGSSKFFKEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFE

FIG. 8C

Tt. W9F-N74A

(SEQ ID NO:69)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTATAAAAGACCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTAGGAGAATTTCAGTGAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGCAATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCCTATTTGCAAGGGAGAAGGCTAGTGAATTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGTGAAGAGGTGAAAGAGGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:70)

MKGIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIGATPPRIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKM DYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGSRLKVRIKFKNPVFE

Tt. W9Y

(SEQ ID NO:71)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATACATAAAAGACCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTAGGAGAATTTCAGTGAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCCTATTTGCAAGGGAGAAGGCTAGTGAATTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGTGAAGAGGTGAAAGAGGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:72)

MKGIVGTYIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIGATPPRIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKM DYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGSRLKVRIKFKNPVFE

Tt. W9N

(SEQ ID NO:73)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACAATATAAAAGACCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTAGGAGAATTTCAGTGAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCCTATTTGCAAGGGAGAAGGCTAGTGAATTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGTGAAGAGGTGAAAGAGGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:74)

MKGIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIGATPPRIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKM DYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGSRLKVRIKFKNPVFE

FIG. 8D

Tt. W9H

(SEQ ID NO:75)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACACACATAAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTITGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTITTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCAAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAAA  
GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:76)

MKGTVGTHIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDEVRRIAKVSEKTGKNVNE  
IWREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMDEVHLQLTKMIGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGSRLKVRIFKNPVFE

Tt. I5A

(SEQ ID NO:77)

ATGAAGGGGACAGCAGTCGGGACATGGATAAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTITGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTITTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCAAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAAA  
GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:78)

MKGTAVGTVIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDEVRRIAKVSEKTGKNVNE  
IWREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMDEVHLQLTKMIGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGSRLKVRIFKNPVFE

Tt. I5L

(SEQ ID NO:79)

ATGAAGGGGACACTTGTGGGACATGGATAAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTITGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTITTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCAAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAAA  
GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:80)

MKGTLVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDEVRRIAKVSEKTGKNVNE  
IWREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMDEVHLQLTKMIGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGSRLKVRIFKNPVFE

FIG. 8E

Tl. ISL-P115A

(SEQ ID NO:81)

ATGAAGGGGACACTTGTCTGGACATGGATAAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGAACCGAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTCCTGCTAACGGTAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGCTAGGAAGGCAGAACATAAAACTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCTTATTCAGGGAGAACGGCTAGTGAAATTTCATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTGCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGGAGAACATTCAAGGAGGTCGAAAGAGGCAGAAAAA  
 GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:82)

MKGTLVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNE  
 IWREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMKGATPARLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMHDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFE

Tl. P115A

(SEQ ID NO:83)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGAACCGAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTCCTGCTAACGGTAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGCTAGGAAGGCAGAACATAAAACTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCTTATTCAGGGAGAACGGCTAGTGAAATTTCATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTGCCAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGGAGAACATTCAAGGAGGTCGAAAGAGGCAGAAAAA  
 GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:84)

MKGTLVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMKGATPARLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMHDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFE

Tl. N74E

(SEQ ID NO:85)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGAACCGAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTCCTGCTAACGGTAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGCTAGGAAGGCAGGAAATAAAACTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCTTATTCAGGGAGAACGGCTAGTGAAATTTCATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGGAGAACATTCAAGGAGGTCGAAAGAGGCAGAAAAA  
 GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTATAAGAAA  
 AATTGA

(SEQ ID NO:86)

MKGTLVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQEIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMKGATPPRLIAKPVAKDAIEMEY  
 VSKRKMHDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFEYKKN

FIG. 8F

Tt. N74A/Y140H

(SEQ ID NO:87)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGAACCGAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTGGCTAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGCCATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGAGGGAGAAGGCTAGTGAATTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAGATGTACGATCACTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGITCTAAATTTCAGGAAAGAAATTCAAGGAGGTCGAAAGAGGCAGAAAAA  
GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTATAAGAAA  
AATTGA

(SEQ ID NO:88)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDEVRRIAKVSEKTGKNVNEI  
WREVGRQAICKTFSEWFPSYFAGRLVNFLMMDEVHLQLTKMIGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYDHFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPFEYKNN

Tt. R135Q-His6

(SEQ ID NO:89)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGAACCGAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTGGCTAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGAGGGAGAAGGCTAGTGAATTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAACAGAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGITCTAAATTTCAGGAAAGAAATTCAAGGAGGTCGAAAGAGGCAGAAAAA  
GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTATAAGAAA  
AATCTCGAGCACCACCAACCACCACTGA

(SEQ ID NO:90)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDEVRRIAKVSEKTGKNVNEI  
WREVGRQNICKTFSEWFPSYFAGRLVNFLMMDEVHLQLTKMIGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKQKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPFEYKKNLEHHHHHH

FIG. 8G

Tt. N74A

(SEQ ID NO:91)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAAGACCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGAACCCAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTGCTAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGCCATAAAACTTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTITTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCTAAATTTCAGTGGAAAGAGGTGAAAGAGGGCGAAAAA  
GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTATAAGAAA  
AATTGA

(SEQ ID NO:92)

MKGTVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
WREVRQAIKFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMDEVHLQLTKMIGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFEYKKN

Tt. N74A-His6

(SEQ ID NO:93)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAAGACCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGAACCCAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTGCTAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGCCATAAAACTTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTITTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCTAAATTTCAGTGGAAAGAGGTGAAAGAGGGCGAAAAA  
GATGGCTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTATAAGAAA  
AATCTCGAGCACCAACCACCACTGA

(SEQ ID NO:94)

MKGTVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
WREVRQAIKFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMDEVHLQLTKMIGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFEYKKNLEHHHHHH

FIG. 8H

T<sub>r</sub>. W9N

(SEQ ID NO:95)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACAAATATAAAGACCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGTAAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTITGCTAAGGTGAGTGAAAAAAACTGGTAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCCTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTITTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG  
 ATGCCATTGAATGGAGTACGTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTITCAAGGAAGAAATTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTATAAGAAA  
 AATTGA

(SEQ ID NO:96)

MKGTVGNTNIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIFKKNPFEYKKN

T<sub>r</sub>. W9H

(SEQ ID NO:97)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACACATATAAAGACCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGTAAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTITGCTAAGGTGAGTGAAAAAAACTGGTAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACCTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCCTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTITTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG  
 ATGCCATTGAATGGAGTACGTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTITCAAGGAAGAAATTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTATAAGAAA  
 AATTGA

(SEQ ID NO:98)

MKGTVGTHIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIFKKNPFEYKKN

FIG. 8I

Tl. N74H

(SEQ ID NO:99)

ATGAAGGGACAATCGTCGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTTGATGAATCTTAAAAGTGCGGTTGGGAACCAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTCGCTAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGCATATAAAACTTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTITTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCTAAATTTCAGTGGAAAGAGGTGAAAGAGGCAGAAAAA  
GATGGCTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTATAAGAAA  
AATTGA

(SEQ ID NO:100)

MKGTIVGTVIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
WREVRQHIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFEHHHHHH

Tl. 175F

(SEQ ID NO:101)

ATGAAGGGACAATCGTCGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
GGTTGATGAATCTTAAAAGTGCGGTTGGGAACCAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTCGCTAAGGTGAGTGAAAAACTGGTAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACCTTCAAAACTTCAGCGAATGGTTCC  
CTCCTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTITTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCTAAATTTCAGTGGAAAGAGGTGAAAGAGGCAGAAAAA  
GATGGCTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGCACCCAC  
CACCACCACTGA

(SEQ ID NO:102)

MKGTIVGTVIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRDRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
WREVRQNFKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFEHHHHHH

FIG. 8J

Tt. L144F

(SEQ ID NO:103)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTAAAAGTGTGGTTGGGAACCAAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTCAGGTAGTGAAAAACTGGTAAAGAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAACTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCTTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGAAGAAATTTCAGTGAAGAGGTGAAAGAGGCAGAAAAA  
 GATGGCTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGCACCCAC  
 CACCACCACTGA

(SEQ ID NO:104)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYDYFLGFIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFEHHHHHH

Tt. WT-His6

(SEQ ID NO:105)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTAAAAGTGTGGTTGGGAACCAAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTCAGGTAGTGAAAAACTGGTAAAGAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAACTTCAGCGAATGGTTCC  
 CTCTTATTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTCAGGAAGAAAGATTCAGTGAAGAGGTGAAAGAGGCAGAAAAA  
 GATGGCTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTAAAAACCCGTTTGAGTATAAGAAA  
 AATCTCGAGCACCAACCACCACTGA

(SEQ ID NO:106)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSLKVRIKFKNPVFEYKKNLEHHHHHH

FIG. 8K

ORF2 de Legionella pneumophila

L2 WT

(SEQ ID NO:107)

ATGATGTCTATGAAAGGAATCATATTCAACGAATTCTCAATTGTAGAAAAAGTGAATCC  
TACACCCTGGTAGATCAAATTATTATGGATAGTCATTGAAGTCCATGGGCCTACACGTCT  
ATCGGTACATACTCTCCAAAGAATTATTCAATTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAATGGC  
AAACCAACATCAGTGATTACAAGAATATGGTGAGTATTGTTGAGGTTTGCAAAAAAAA  
TATCCTCAATTTCAGGGAAAAAAAGTCGGTGTTCATTGGAAAGCGCTTGAAACACAT  
ATTCAATTGAAAGTAAAAATTGTATGACTATACTGAACACTACCCATTGAAATGCCAATAT  
CACAGTCAAAATCAAATGAAATGATTACACTCTCGCCTTGGCCGATTGCGGAA  
GGTTAATAAAAGGTGTATTAAATATCATAAAGAAAACATGACTATTGTCGTGAAAATCTG  
CCTGCAAAACAGGCTTAAGGTAAAGATTGTATTAAACAAAAGGCATCTGATGAGTGA

(SEQ ID NO:108)

MMSMKGIIFNEFLNFVEKSESYTLVDQIIMDSHLKSHGAYTSIGTSPKELFQLVKALAMKNGKPT  
SVILQEYGEYLFEVFAKKYPQFFREKKSVFQFLEALETHIHFEVKKLYDYTELPHFECQYHSQNQM  
EMIYTSSRPLADFAEGLIKGCIKYHKENMTIVRENLPAKTGFKVRFLTKGDPDE

L2 F142Y

(SEQ ID NO:109)

ATGATGTCTATGAAAGGAATCATATTCAACGAATTCTCAATTGTAGAAAAAGTGAATCC  
TACACCCTGGTAGATCAAATTATTATGGATAGTCATTGAAGTCCATGGGCCTACACGTCT  
ATCGGTACATACTCTCCAAAGAATTATTCAATTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAATGGC  
AAACCAACATCAGTGATTACAAGAATATGGTGAGTATTGTTGAGGTTTGCAAAAAAAA  
TATCCTCAATTTCAGGGAAAAAAAGTCGGTGTTCATTGGAAAGCGCTTGAAACACAT  
ATTCAATTGAAAGTAAAAATTGTATGACTATACTGAACACTACCCATTGAAATGCCAATAT  
CACAGTCAAAATCAAATGAAATGATTACACTCTCGCCTTGGCCGATTGCGGAA  
GGTTAATAAAAGGTGTATTAAATATCATAAAGAAAACATGACTATTGTCGTGAAAATCTG  
CCTGCAAAACAGGCTTAAGGTAAAGATTGTATTAAACAAAAGGCATCTGATGAGTGA

(SEQ ID NO:110)

MMSMKGIIFNEFLNFVEKSESYTLVDQIIMDSHLKSHGAYTSIGTSPKELFQLVKALAMKNGKPT  
SVILQEYGEYLFEVFAKKYPQFFREKKSVFQFLEALETHIHFEVKKLYDYTELPHFECQYHSQNQM  
EMIYTSSRPLADYAEGLIKGCYHKENMTIVRENLPAKTGFKVRFLTKGDPDE

FIG. 8L

L2 F9W-F142Y

(SEQ ID NO:111)

ATGATGTCTATGAAAGGAATCATATGGAACGAATTCTCAATTITGTAGAAAAAAAGTGAATCC  
TACACCCCTGGTAGATCAAATTATTGGATAGTCATTGAAGTCCCAGGGCCTACACGTCT  
ATCGGTACATACTCTCCAAAGAATTATTCAATTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGC  
AAACCAACATCAGTGATTTACAAGAATATGGTGAGTATTGTTGAGGTTTGCAAAAAAA  
TATCCTCAATTTCAGGGAAAAAAAGTCGGTGTTCATTGGAGCGCTTGAAACACAT  
ATTCAATTGCAAGTGAAAAATGTATGACTATACTGAACTAACCCATTGAAATGCCAATAT  
CACAGTCAAAATCAAATGGAAATGATTTACACTTCTCGCCTTGGCCGATTATGCGGAA  
GGTTAATAAAAGGTGTATTAAATATCATAAAGAAAACATGACTATTGTCGTGAAAATCTG  
CCTGCAAAAACAGGTTAACAGGTAAGGATTGTATTAACAAAAGGCATCCTGATGAGTGA

(SEQ ID NO:112)

MMSMKGIWNEFLNFVEKSESYTLVDQIIMDSHLKSHGAYTSIGTYSPLKELFQLVKALAMKNGKP  
TSVILQEYGEYLFEVFAKKYPQFREKKSVFQFLEALETHIHFEVVKLYDYTELPHFECQYHSQNQ  
MEMIYTSSRPLADYAEGLIKGCIKYHKENMTIVRENLPAKTGFKVRFVLKGDPDE

ORF1 de Legionella pneumophila

L1 WT

(SEQ ID NO:113)

ATGAAAGGTATCGTTTACCTCCTAAATGACATGATTAGAACATTTGGCATAGAAACC  
TGGGACCAACTCGTATCCTCACTAGACCTCCAAGTGGTGAAGTTATACAGCAGGCGGCACT  
TACTCGGATACAGAATTCAAGCAATTGATTAAGGCCATTGCGAAGAGGACCAATCAGCACGCT  
TCTGTTTTAGAGGCCTTGGTAATACATGTTCTATCTATCGAGTAAGTGCAGCAATT  
TTTAAAAAAGGACATGACATTAAAAGAATTAAAAGCATTGATGGAACAATTATGTGG  
AAGTAGAAAAGTTACCCAGATGAAACATTACCTACCAATTAGCTATGAAGAGCCTGCTGCA  
AACCAATTGGTTATGGGTATCGATCGCATAGAAGACTCTGTCATTGCAATGGGCTCATC  
CAGGGAGCAGCGCACATTAAAAGAAAATTACCATTAAGCAGACTCACTGCATGTTAAA  
AAAAGATGATCATTGTCGTTGGAGATTACCTTGAGTGA

(SEQ ID NO:114)

MKGIVFTSLNDMIIEQFGIETWDQLVSSLNLPSGSYTAGGTYSDEFQQLIKAIKRTNQHASVFL  
EAFGEYMFPILSKCAIFLKKDMTLKEFLKSIDGTIHVEVEKLYPDETLPPTISYEPAANQLVMVYR  
SHRLCHFAMGLIQQAAQHFKKKITIKQTHCMLKKDDHCRLEITFE

FIG. 8M

**L1 F142Y**

(SEQ ID NO:115)

ATGAAAGGTATCGTTTACCTCCTAAATGACATGATTATAGAACAAATTGGCATAGAACCC  
TGGAACCAACTCGTATCCTCACTAGACCTCCAAGTGGTGAAGTTATACAGCAGGCCACT  
TACTCGGATACAGAATTCAAGCAATTGATTAAGGCCATTGCGAAGAGGACCAATCAGCACGCT  
TCTGTTTTAGAGGCCTTGGTGAATACATGTTCTATCTTATCGAGTAAGTGCAGCAATT  
TTAAAAAAAGGACATGACATTAAAAGAATTAAAAGCATTGATGGAACAATTATGTGG  
AAAGTAGAAAAGTATACCCAGATGAAACATTACCTACCATTAGCTATGAAGAGCCTGCTGCA  
AACCAATTGGTTATGGTGTATCGATCGATAGAACACTGTCAATTACGCAATGGGCTCATC  
CAGGGAGCAGCGAACATTAAAAGAAAATTACCATTAAGCAGACTCACTGCATGTTAAA  
AAAAGATGATCATTGTCGTTGGAGATTACCTTGAGTGA

(SEQ ID NO:116)

MKGIVFTSLNDMIIEQFGIETWDQLVSSLDLPSGSYTAGGTYSDTEFQQLIKAIKRTNQHASVFL  
EAFGEYMFPISSKCAIFLKKDMTLKEFLKSIDGTIHVEVEKLYPDETLPTISYEEPAANQLVMVYR  
SHRRRLCHYAMGLIQGAAQHFKKKITIKQTHCMLKKDDHCRLEITFE

*Desulfovibrio desulfuricans*

**Dd H-NOX(728-899)**

(SEQ ID NO:117)

ATGAAGATGCGCGGTATTTGCCGAAATATTATGAATTATAAAAGAGATCTATGGGGAT  
GACGTGTTGCTCATGTTCTAAAACCAGGGCGAGCCTGCTTCATGCCGGGAAATTCTACC  
CTGATCAGGTGTTGCCAGATGGCTAAATAGTATGCCAGCGCACGGCGAACAGCCAAG  
TTGTTTTGAAAAGCAGGGCGTGCAAGCCTGAGGCTTTAACAGAATGTACAGGAGTAC  
TTAAAGGGAAACCTTAAAGAGTTCTGCTGCCATGAATGATATCCACAGGCACCTGACA  
AAGGACAATCCGGCGTACGCCGCCTAAATTGAGTATGACGATCAGGGGATACGCTTGT  
ATGACATATAAGTCGAGAGGGATTACGGAGAATACCTTGTGGCATCATCAAGGCAGCTGC  
GGAGTTAAAAGGAAAAGTGCATCAGCTGGAGCATGCCGTAAAGGGCGAACACAG  
GCAAGGGTTACATTAAATGA

(SEQ ID NO:118)

MKMRGILPKIFMNFIKEIYGDDVFAHVSKTMGEPVFMPGNNSYPDQVLRQMAEIVCQRTGEQPKLF  
FEKAGRASLQAFNRMYRQYFKGETLKEFLLAMNDIHRHLTKDNPGVRPPKFYDDQGDTLVMTY  
KSQRDYGEYFVGIIKAAAECKEVKRISSEHAGKGRRTARVTFIK

FIG. 8N

Dd. Y139L (728-899)

(SEQ ID NO:119)  
ATGAAGATGCGCGGTATTTGCCGAAATATTGAATTATAAAAGAGATCTATGGGGAT  
GACGTGTTGCTCATGTTCTAAAACCAGGGCGAGCCTGCTTCATGCCGGAAATCCCTACC  
CTGATCAGGTGTTGCCAGATGGCTGAAATAGTATGCCAGCGCACGGCGAACAGCCAAG  
TTGTTTTGAAAAAGCAGGGCGTGCAAGCCTGCAGGCTTTAACAGAATGTACAGGCAGTAC  
TTAAAGGGAAACCTTAAAGAGTTCTGCTGCCATGAATGATATCCACAGGCACCTGACA  
AAGGACAATCCCGCGTACGCCGCCTAAATTGAGTATGACGATCAGGGCGATACGCTTGTT  
ATGACATATAAGTCGAGAGGGATTACGGAGAACTTTGTGGCATCATCAAGGCAGCTGC  
GGAGTTAAAAGGAAAAGTGCATCAGCTGGAGCATGCCGTAAGGGCGAACAAACG  
GCAAGGGITACATTATAATGA

(SEQ ID NO:120)  
MKMRGILPKIFMNFIKEIYGDDVFAHVSKTMGEPVFMPGNSYPDQVLRQMAEIVCQRTGEQPKLF  
FEKAGRASLQAFNRMYRQYFKGETLKEFLLAMNDIHRHLKDNPGRPPKFEYDDQGDTLVMTY  
KSQRDYGELFGVIIKAAEFKKEKVRISSHEAGKGRTTARVTFIK

 $\beta$ 1 (1-385) de Homo sapiensHs. WT (1-385)

(SEQ ID NO:121)  
ATGTACGGATTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTATCCGAATTACGGCCCCGAGGTG  
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCACAGTAGATGAAGAAGGACAGTTCTGTCAGAATAAT  
ATATGATGACTCCAAAACCTATGATTGGTTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
TGGAGAAATCTCAAATGTTGGAGATGTTTCTGCTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT  
ACAATCTTGCCTGCTCTGGCTCTAATGTCAGAGAATTCTACAGAACCTGATGCTGCAC  
GACCACCTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTCCCTAGGTGCACTGATGCAGAA  
AAGGGCAAAGGACTCATTGCACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATT  
GGAATCATCAAAACAGTGGACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTATTCA  
GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTAAATTGAAGAAAAGAGTCAAAAGAAG  
AGGATTATGAAGATCTTGACAGATTGAAGAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC  
CATATACATTCTGCAAAGCTTTCTTTCATATAATATTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA  
GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGAAATTGAGCCTCTGTCT  
GCTTCTCGCTGGTCTCATATTGATATTAGTTCCATGGGATCTTCACATCAATAC  
TGTTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG  
AACTGACTGGACTGAGATCAGCTGCTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG  
CAGATAGCATACTTTCTATGTCACCAAGTGTCACTGAACCTGGACATTGACAAGGAGAG  
GGCTGTATCTAAGTGCACATCCCTCTGCATGATGCCACCGCGATCTGTTCTGGAGAAC  
AATTAGAGAGGAATACAAACTACCCAGAACTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC  
ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(SEQ ID NO:122)  
MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVNLNAGE  
ILQMFGKMFFVFCQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDALHDLATYPGMRAPSFRCDAEKKG  
LILHYYSEREGLQDIVIGIICKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF  
EENGQTQESRISPYTFCKAFTPFIIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPLQPGNCSSLVFSLVRPHIDISFHG  
ILSHINTVFVLRSKLEGLLDVEKLECEDELTGTEISCLRLKGQMIYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTR  
RGLYLSDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRQLTLRAED

FIG. 8O

Hs. B1(1-385) I145Y

(SEQ ID NO:123)

ATGTACGGATTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTATCCGAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGAAAGACATCAAAAAGAGGCACAGTAGATGAAGAAGGACAGTTCTGTCAAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTATGATTGGTGCTGCTGCAAGCAAAGTCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCAAATGTTGGAGATGTTTCGTCTTCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGCCTGCTCTGGCTCTAACATGTAGAGAATTCTACAGAACCTGATGCTGCAC  
 GACCACCTGCTACCATCTACCCAGGAATCGCTGCACCTCCTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAGGACTCATTTGCACTACTACTAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATTATGTCATT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTAAATTGAAGAAAAGAGTCAAAAGAAG  
 AGGATTATGAAGATCTTGACAGATTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC  
 CATATACATTCTGCAAAGCTTCTTCTTATATAATTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA  
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGATTGCAGCCTCTGTCT  
 GTCTTCTCGCTGGTCCTCATATTGATATTAGTTCCATGGGATCCTTCTCACATCAATAC  
 TGTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG  
 AACTGACTGGACTGAGATCAGCTGCTCACGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG  
 CAGATAGCATACTTTCTATGTTACCAAGTGTATGAACCTGGACGATTGACAAGGAGAG  
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACCGCGATCTGTTCTTGGAGAAC  
 AATTAGAGAGGAATACAAACTACCCAAGAACTGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC  
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(SEQ ID NO:124)

MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFGKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCDAEKKG  
 LILHYYSEREGLQDYVIGIJKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF  
 EENGQTQESRISPYTFCKAFPFHIIFDRLVVTQCGNAIYRVPQLQPGNCSSLVSLVRPHIDISFHG  
 ILSHINTVFVLRSKELLDVEKLECEDELGTGEISCLRLKGQMIYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTR  
 RGLYLSDIPLHDATRLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRQLTLRAED

FIG. 8P

***Hs. β1(1-385) I145H***

(SEQ ID NO:125)

ATGTACGGATTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
TGGGAAGACATAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTCTGTCAGAATAAT  
ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTGGTCTGCTGCAAGCAAAGTCTCAATCTCAATGC  
TGGAGAAATCCTCCAAATGTTGGAGATGTTCTGCTTCTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT  
ACAATCTTGTGTCTGGCTTAATGTCAGAGAATTCTACAGAACCTGATGCTCTGCAC  
GACCACCTTGTACCATCTACCCAGGAATGCGTGACCTCCTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
AAGGGCAAAGGACTCATTTGCACTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATCATGTCATT  
GGAATCATCAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGITATTCA  
GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTAAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG  
AGGATTATGAAGATCTGACAGATTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC  
CATATACATTCTGCAAAGCTTCTTCTATATAATATTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA  
GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTCTGTCT  
GTCTTCTCGCTGGTCTGCTCATATTGATATTAGTTCCATGGGATCTTCTCACATCAATAC  
TGTGTTGATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG  
AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG  
CAGATAGCATACTTTCTATGTCACCAAGTGTCTGAACCTGGACGATTGACAAGGAGAG  
GGCTGTATCTAAGTGAACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGCAGTTGTTGGGAGAAC  
AATTAGAGAGGAATACAAACTCACCAAGAACTGGAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC  
ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(SEQ ID NO:126)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
ILQMFGKMFVFQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPMRAPSFRCTDAEKKG  
LILHYYSEREGLQDHVIGIIKTVAAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF  
EENGTQESRISPYTFCKAFPFHIIFRDLVVTQCGNAIJYRVLQLQPGNCSSLVFSLVRPHIDISFHG  
ILSHINTVFVLRSKLEGLLDVEKLECEDELTEISCLRLKGQMIYLPEADSLFLCSPSVMNLDDLTR  
RGLYLSDIPLHATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRQLTLRAED

FIG. 8Q

Hs. β1(1-385) C78Y

(SEQ ID NO:127)

ATGTACGGATTGTAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTATCCGAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGGCACAGTAGATGAAGAAGGACAGTTCTGTCAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAATTATGATTGGGTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAATGTTGGAGATGTTTCGTCCTTACCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGCCTGCTGGCTTAATGTCAGAGAATTCTACAGAACCTGATGCTCTGCAC  
 GACCACCTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTCCTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAAGGACTCATTTGCACTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTATTCA  
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTAAATTGAAGAAAAGAGTCAAAAGAAG  
 AGGATTTTATGAAGATCTGACAGATTGAAGAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC  
 CATATACATTCTGCAAGCTTCTTTCATATAATATTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA  
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGATTGCAAGCCTCTGTCT  
 GTCTTCGCTGGTTCGTCCTATATTGATATTAGTTCCATGGGATCCTTCTCACATCAATAC  
 TGTTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG  
 AACTGACTGGACTGAGATCAGCTGCTACGTCTCAAGGGTAAATGATCTACTTACCTGAAG  
 CAGATAGCATACTTTCTATGTTACCAAGTGTATGAACCTGGACGATTGACAAGGAGAG  
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGCAGTITGTTCTGGAGAAC  
 AATTAGAGAGGAATACAAACTCACCAAGAACTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC  
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(SEQ ID NO:128)

MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFGKMFVFYQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATYPGMRAPSFRCTDAEKKG  
 LILHYYSEREGLQDIVIGIICKTVAAQQIHGTEIDMKVIQQRNEEDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF  
 EENGQTQESRISPYTFCKAFPFHIFDRDLVVTQCGNAIJYRVLPLQPGNCSSLVSFLVRPHDISFHG  
 ILSHINTVFVRLRSKEGLLDVEKLECEDELTGTEISCLRLKGQMFIYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTR  
 RGLYLSDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDLQLTLRAED

FIG. 8R

**Hs. B1 (1-385) H105F**

(SEQ ID NO:129)

ATGTACGGATTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTATCCGAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTCTGTCAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTGGTGTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAATGTTGGAGATGTTCTGCTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGCCTGGCTCTAATGTCAGAGAAATTCTACAGAACCTGATGCTCTGTTCG  
 ACCACCITGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTCCCTTAGGTGCACTGATGCAGAAA  
 AGGGCAAAGGACTCATTTGCACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATTG  
 GAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 CAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTAAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAGA  
 GGATTTATGAAGATCTTGACAGATTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCCC  
 ATATACATTCTGCAAAGCTTCTTCTTCTATATAATATTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCAG  
 TGTGGCAATGCTATATACAGAGTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGAAATTGAGCCTCTGCTG  
 TCTTCTCGTGGTCTGCTCATATTGATATTAGTTCCATGGGATCTTCTCACATCAATACT  
 GTTTTGATATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATGA  
 ACTGACTGGGACTGAGAGTCAGCTGCTCACGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAGC  
 AGATAGCATACTTTCTATGTTACCAAGTGTATGAACCTGGACGATTGACAAGGAGAGG  
 GCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCCGATCTGTTCTGGAGAAACA  
 ATTAGAGAGGAATACAAACTACCCAGAACTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTCA  
 CGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(SEQ ID NO:130)

MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFGKMFVFQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDAFDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKGKGL  
 ILHYYSEREGLQDIVIGIIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFE  
 ENGTQESRISPYTFCKAFPFHIFDRDLVVTQCGNAIYRVPQLQPGNCSSLVSLVRPHIDISFHGI  
 LSHINTVFVLRSKLEGLLDVEKLECEDELTGTEISCLRLKGQMIYLPEADSILFCSPSVMNLDDLRR  
 GLYLSDIPLHDA TRDLVLLGEQFREEYKL TQELEILTDRQLTLRAED

FIG. 8S

Hs. B1 (1-385) H105G

(SEQ ID NO:131)

ATGTACGGATTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGAAGCAGTTCTGTCAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTGGTGTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAATGTTGGGAAGATGTTTCTGCTTGTCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTGCGTGTCTGGCTCTAATGTAGAGAATTCTACAGAACCTTGATGCTCTGGGT  
 GACCACCTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTCACCTCCCTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAGGACTCATTTGCACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTITAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAGAAG  
 AGGATTTTATGAAGATCTGACAGATTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCAGCAGCAGCC  
 CATATACATTCTGAAAGCTTCTTATATAATATTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA  
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGATTGCAAGCCTCTGTCT  
 GTCTTCTCGCTGGTTCGCTCATATTGATATTAGTTCCATGGGATCCTTCTCACATCAATAC  
 TGTTTTGATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTTGGAGAAAATTAGAATGTGAGGATG  
 AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG  
 CAGATAGCATACTTTCTATGTTACCAAGTGTATGAACTGGACGATTGACAAGGAGAG  
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACCGCGCATTTGTTCTGGAGAAC  
 AATTAGAGAGGAATACAAACTCACCAAGAACCTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC  
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAAGATTGA

(SEQ ID NO:132)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFGKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALGDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKKG  
 LILHYYSEREGLQDIVIGIIKTVQQIHGEIDMKVIQQRNECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF  
 EENGQESRISPYTFCKAFPFHIIFDRDLVVTQCGNAIYRVLQLQPGNCSSLVSLVRPHIDISFHG  
 ILSHINTVFVLRSKEGLLDVEKLECEDELTGTEISCLRLKGQMIYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTR  
 RGLYLSDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRQLTLRAED

Hs. B1(1-194)

(SEQ ID NO:133)

ATGTACGGATTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGAAGCAGTTCTGTCAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTGGTGTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAATGTTGGGAAGATGTTTCTGCTTGTCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTGCGTGTCTGGCTCTAATGTAGAGAATTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC  
 GACCACCTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTCACCTCCCTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAGGACTCATTTGCACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTITAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAGAAG  
 AGGATTTTATGAAGATTGA

(SEQ ID NO:134)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFGKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKKG  
 LILHYYSEREGLQDIVIGIIKTVQQIHGEIDMKVIQQRNECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

FIG. 8T

Hs. β1(1-194) I145Y

(SEQ ID NO:135)

ATGTACGGATTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTATCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
TGGAAAGACATCAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTCTGTCAAATAAT  
ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
TGGAGAAATCTCCAATGTTGGGAAGATGTTTCGTCTTGCAGAAGAATCTGGTTATGAT  
ACAATCTTGCCTGCTGGCTTAATGTCAAGAGAATTCTACAGAACCTGATGCTCTGCAC  
GACCACCTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTCCTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
AAGGGCAAAGGACTCATTTGCACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATTATGTCATT  
GGAATCATCAAAACAGTGGCACAAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTAAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG  
AGGATTAAATTGAAGATTGA

(SEQ ID NO:136)

MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLAGE  
ILQMFGKMFVFQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDAHDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKKG  
LILHYYSEREGLQDYVIGIIKTVAAQQIHGEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

Hs. β1(1-194) L9W-I145Y

(SEQ ID NO:137)

ATGTACGGATTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTATCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
TGGAAAGACATCAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTCTGTCAAATAAT  
ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
TGGAGAAATCTCCAATGTTGGGAAGATGTTTCGTCTTGCAGAAGAATCTGGTTATGAT  
ACAATCTTGCCTGCTGGCTTAATGTCAAGAGAATTCTACAGAACCTGATGCTCTGCAC  
GACCACCTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTCCTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
AAGGGCAAAGGACTCATTTGCACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATTATGTCATT  
GGAATCATCAAAACAGTGGCACAAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTAAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG  
AGGATTAAATTGAAGATTGA

(SEQ ID NO:138)

MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLAG  
EILQMFGKMFVFQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDAHDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKKG  
LILHYYSEREGLQDYVIGIIKTVAAQQIHGEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

FIG. 8U

$\beta$ 1 (1-385) de *Rattus norvegicus**Rn. WT (1-385)*

(SEQ ID NO:139)

ATGTACGGTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTATCCGCAATTACGGTCCCAGGGTG  
 TGGGAAGACATAAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTGGTGGCTGCTGCAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC  
 TGGTGAATCTGCAGATGTTGGAAAGATGTTTCGTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGCCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTCCCTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAAGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACATTGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGATCATACCCATTAAATTGAAGAAAAGAATCAAAGAAG  
 AGGATTTTATGAAGATCTGGACAGGTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCGTATCAGCC  
 CGTACACCTCTGCAAAGCGTTCCCTTCACATATTGACCGGACTAGTAGTCACGCA  
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCCTCCAGCTCCAGGGAAAGTGCAGCCTCTGTC  
 TGTCTCTCTGCTGGCCCTCATATTGACATCAGTTCCACGGGATTCTTCACACATCAAT  
 ACCGTCTTGACTGAGAAAGCAAGGAAGGGTGCTGGATGTTGAGAAACTTGAATGTGAGGA  
 TGAAGTGAAGTGGGCAGAGATTAGCTGCCTCCGTCTAAAGGCCAATGATCTATTACCGGA  
 AGCAGATAGCATCCTCTGTCACCAAGTGTGATGAACITGGATGACCTAACAGAAG  
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGCTTTGGAGA  
 ACAGTCCGGGAGGAGTACAAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
 TCACACTGAGGGCTTGGAGGATTGA

(SEQ ID NO:140)

MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFKGKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATTYPGRAPSFRCTDAEKKG  
 LILHYYSEREGLQDIVIGIICKTVQQIHGTEIDMKVIQQRSEEDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFE  
 ENGTQDSRISPYTFCKAFFFHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHGI  
 LSHINTVFVLRSKLEGLLDVEKLECEDELTAEGAEISCLRLKGQMILPEADSILFLCSPSVMNLDDLTR  
 RGLYLSDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDLQLTLRAED

FIG. 8V

Rn. β1(1-385) I145Y

(SEQ ID NO:141)

ATGTACGGTTTGTGAACCAGCCTGGAGCTGCTGGTATCCGCAATTACGGTCCCAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTCGAGCAAAGTCCTAACCTCAATGC  
 TGGTGAATCTCGAGATGTTGGAGATGTTCTCGTCTCTGCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGCCTGGATCTAATGCAAGGAGTTTGAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTGCCACCATCTACCCAGGGATCGCGCACCTCCTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACTACGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTAAATTGAAGAAAAAGAATCAAAGAAG  
 AGGATTTATGAAGATCTGGACAGGTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCGTATCAGCC  
 CGTACACCTCTGCAAAGCGTTCCCTTCACATCATATTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA  
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGTCCAGCTCCAGCTGGAGTGCAGCCTCTGTC  
 TGCTTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTCCACGGGATTCTTCACACATCAAT  
 ACCGTCTTGACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAACTTGAATGTGAGGA  
 TGAAGCTGACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCCTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTACCGGA  
 AGCAGATAGCATCCTCTCCTGTCACCAAGTGTGATGACTGGATGACCTAACAGAAG  
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGCTTTGGAGA  
 ACAGTTCCGGGAGGAGTACAACACTGACACAAGAGCTGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
 TCACACTGAGGGCTTGGAGGATTGA

(SEQ ID NO:142)

MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRITYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFGKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKKG  
 LILHYYSEREGLQDYVIGIIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRSEEDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF  
 EENGTDQDSRISPYTFCKAHPFHIIIFDRDLVVTQCGNAIYRVLQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHG  
 ILSHINTVFVLRSKLEGKLDVEKLECEDELTGAEISCLRLKGQMIYLPEADSILFCSPSVMNLDDLTR  
 RGLYLSDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDLQLTLRAED

FIG. 8W

Rn. B1(1-385) I145H

(SEQ ID NO:143)

ATGTACGGTTTGTAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTATCCGCAATTACGGTCCCAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTCGAGCAAAGTCCTAACCTCAATGC  
 TGGTGAATCCTGCAGATGTTGGAGATGTTTCTGTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGCCTGTCCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTCCTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACCATGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTAAATTGAAGAAAAAGAATCAAAGAAG  
 AGGATTITATGAAGATCTGGACAGGTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCGTATCAGCC  
 CGTACACCTCTGCAAAGCGTTCCCTTCACATCATATTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA  
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGTCCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTCTGTC  
 TGTCTTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTCCACGGGATTCTTCACACATCAAT  
 ACCGTCTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAAACTGAAATGTGAGGA  
 TGAAGTGACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCCTCGTCAAAGGCAAATGATCTATTACCGGA  
 AGCAGATAGCATCCTCTCCTGTTACCAAGTGTGATGAACTGGATGACCTAACAGAAG  
 AGGCCTGTACCTGAGTACATCCCTCTCCATGATGCTACAGAGACCTGGCTTTGGAGA  
 ACAGITCCGGGAGGAGTACAACACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
 TCACACTGAGGGCTTGGAGGATTGA

(SEQ ID NO:144)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFGKMFVFQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDALHDHLATYPGMRAPSFRCTDAEKKG  
 LILHYYSEREGLQDHVIGIIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRSEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF  
 EENGTDQDSRISPYTFCKAFPFHIIFDRDLVVTQCGNAIYRVPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHG  
 ILSHINTVFVRSKEGLLDVEKLECEDELTAEGAEISCLRLKGQMITYLPHEADSILFLCSPSVMNLDDLTR  
 RGLYLSDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILDRLQLTLRAED

FIG. 8X

Rn. β1(1-385) C78Y

(SEQ ID NO:145)  
ATGTACGGTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTATCCGAATTACGGTCCCGAGGTG  
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCTTGAGAATAAT  
CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC  
TGGTGAATCCTGCAGATGTTGGAAAGATGTTTCTGTCTTCTATCAAGAGTCTGGCTATGAT  
ACCATCTGCGTGTCCCTGGATCTAATGTCAGGGAGTTTGAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
GACCACCTGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTCCCTCCGTGCACCGATGCAGAA  
AAAGGCAAAGGGCTATTCTGCACTACTCGGAAAGAGAGAGGGCTTCAGGACATTGTGAT  
CGGGATTATCAAGACTGTAGCTAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAAATTAAATTGAAGAAAAAGAATCAAAGAAG  
AGGATTTTATGAAGATCTGGACAGGTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCGTATCAGCC  
CGTACACCTCTGCAAAGCGTTCCCTTCACATCATATTGACCGGGACTAGTAGTCACGCA  
GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGTCCCCCAGCTCCAGCCTGGAAAGTGCAGCCTCTGTC  
TGTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTCCACGGGATTCTTCACACATCAAT  
ACCGCTTTGACTGAGAACGAAAGGAGTGTGGATGTTGAGAAACTGAATGTGAGGA  
TGAAGTGAAGTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCCGTCTCAAAGGCCAATGATCTATTACCGGA  
AGCAGATAGCATCCTTCCTGTGACCATCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGCCTTGGAGA  
ACAGTTCCGGGAGGAGTACAAACTGACACAAGAGCTGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
TCACACTGAGGGCTTGGAGGATTGA

(SEQ ID NO:146)  
MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLAGE  
ILQMFGKMFVFYQESGYDTILRVLGSNVRFLQNLDALHDHLATIYPMRAPSFRCTDAEKKGKG  
LILHYYSEREGLQDIVIGIICKTVAQQIHGEIDMKVIQQRSEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFE  
ENGTQDSRISPYTFCKAFPHIIFDRDLVVTQCGNAIYRVLQLQPGKCSLLSVSLVRPHIDISFHGI  
LSHINTVFVLRSKLEGLLDVEKLECEDELTAEGAEISCLRLKGQMIYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTR  
RGLYLSDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDLQLTLRAED

FIG. 8Y

***Rn. B1 (1-385) H105F***

(SEQ ID NO:147)

ATGTACGGTTTGTAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGT GATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAAGAGGCCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGITTCCTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGCTGCTGCAGC AAAGTCTCAACCTCAATGC  
 TGGT GAAATCCTGCAGATGTTGGAAAGATGTTTCTGTCTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGCCTGGATCTAATGTCAGGGAGTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGTTG  
 ACCACCTGCCACCATCTACCCAGGGATGCCGCACCTTCTCCGGTGCACCGATGCAGAAA  
 AAGGCAAAGGGCTATTCTGCACACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACATTGTGATC  
 GGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTAAATTGAAGAAAAAGAATCAAAGAAG  
 AGGATTTTATGAAGATCTGGACAGGTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCGTATCAGCC  
 CGTACACCTCTGCAAAGCGTTCTTACATCATATTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA  
 GTGTGAAATGCTACTACAGAGTGCCTCCAGCTCCAGCCTGGAAAGTGCAGCCTCTGTC  
 TGTCTTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTCCACGGGATTCTTCACACATCAAT  
 ACCGTCTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAAACTTGAATGTGAGGA  
 TGAAGTGACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCCGTCTCAAAGGCCAATGATCTATTACCGGA  
 AGCAGATAGCATCCTCTCTGTTACCAAGTGTGATGAACCTGGATGACCTAACAGAAG  
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACAGAGACCTGGTCTTTGGAGA  
 ACAGTTCCGGAGGGAGTACAAACTGACACAAGAGCTGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
 TCACACTGAGGGCTTGGAGGATTGA

(SEQ ID NO:148)

MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFGKMFFVFCQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDALFDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKGKGL  
 ILHYYSEREGLQDIVIGIJKTVAAQQIHGTIEIDMKVIQQRSEECDHQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFEE  
 NGTQDSRISPYTFCKAFFFHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPLQPGKCSLLSVSLVRPHIDISFHGIL  
 SHINTVFVLRSKEGLLDVEKLECEDELTGAEISCLRLKGQMIYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTRR  
 GLYLSDIPLHDA TRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRQLTLRAED

FIG. 8Z

Rn. B1 (1-385) H105G

(SEQ ID NO:149)

ATGTACGGTTTGTGAACCAGCCCTGGAGCTGCTGGTATCCGCATTACGGTCCCAGGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCAAACCTATGACTTGGTGGCTGTCGAGCAGAAAGTCCTAACCTCAATGC  
 TGGTGAATCCTGCAGATGTTGGGAAGATGTTCTCGTCTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGGTGTCTGGATCTAATGTCAGGGAGTTTGCAAGAACCTCGACGCCCTGGGG  
 GACCACCTGCCACCACATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTCCTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACATTGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTAAATTGAAGAAAAAGAATCAAAGAAG  
 AGGATTTTATGAAGATCTGGACAGGTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCGTATCAGCC  
 CGTACACCTCTGCAAAGCGTTCTTACATCATATTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA  
 GTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCAGCTCCAGCCTGGAAAGTGCAGCCTCTGTC  
 TGCTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTCCACGGGATTCTTACACATCAAT  
 ACCGCTTTGACTGAGAAGCAAGGAAGGGTGTGGATGTTGAGAAACTGAATGTGAGGA  
 TGAACGTACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCGCTCAAAGGCCAAATGATCTATTACCGGA  
 AGCAGATAGCATCCTCTCCTCTGTTACCAAGTGTGATGAACCTGGATGACCTAACAGAAG  
 AGGCCTGTACCTGAGTACATCCCTCTCATGATGCTACACGAGACCTGGCTTTGGGAGA  
 ACAGTTCCGGGAGGAGTACAAACTGACACAAGAGCTGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
 TCACACTGAGGGCTTGGAGGATTGA

(SEQ ID NO:150)

MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFGKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALGDHLATIYPGMRAPSFRCDAEKKG  
 LILHYYSEREGLQDIVIGIIKTVAAQQIHGTEIDMKVIQQRSEECDHQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFE  
 ENGTQDSRISPYTFCKAFPFHIFDRDLVVTQCGNATYRVLQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHGI  
 LSHINTVFVLRSKEGLLDVEKLECEDELTGAEISCLRLKGQMIYLPEADSLFLCSPSVMNLDDLTR  
 RGLYLSIDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDLQLTLRAED

Rn. B1(1-194)

(SEQ ID NO:151)

ATGTACGGTTTGTGAACCAGCCCTGGAGCTGCTGGTATCCGCATTACGGTCCCAGGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCAAACCTATGACTTGGTGGCTGTCGAGCAGAAAGTCCTAACCTCAATGC  
 TGGTGAATCCTGCAGATGTTGGGAAGATGTTCTCGTCTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGGTGTCTGGATCTAATGTCAGGGAGTTTGCAAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTGCCACCACATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTCCTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACATTGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTAAATTGAAGAAAAAGAATCAAAGAAG  
 AGGATTTTATGAAGATTGA

(SEQ ID NO:152)

MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFGKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCDAEKKG  
 LILHYYSEREGLQDIVIGIIKTVAAQQIHGTEIDMKVIQQRSEECDHQFLIEEKESKEEDFYED

FIG. 8AA

Rn. β1(1-194) I145Y

(SEQ ID NO:153)

ATGTACGGTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTATCCCAATTACGGTCCCAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCGAGCAAAGTCCTAACCTCAATGC  
 TGTTGAAATCTGCAGATGTTGGAGATGTTTCTGTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTGCGTGCCTGGATCTAATGTCAGGGAGTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTCCTCCGGTGACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTCGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACTACGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTITAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAG  
 AGGATTTTATGAAGATTGA

(SEQ ID NO:154)

MYGFVNHAELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLAGE  
 ILQMFGKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAHLHDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKKGK  
 LILHYYSEREGLQDYVIGIIKTVAAQQIHGTEIDMKVIQQRSEECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

Rn. β1(1-194) L9W-I145Y

(SEQ ID NO:155)

ATGTACGGTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTATCCCAATTACGGTCCCAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCGAGCAAAGTCCTAACCTCAATGC  
 TGTTGAAATCTGCAGATGTTGGAGATGTTTCTGTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTGCGTGCCTGGATCTAATGTCAGGGAGTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTCCTCCGGTGACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTCGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACTACGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTITAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAG  
 AGGATTTTATGAAGATTGA

(SEQ ID NO:156)

MYGFVNHA WELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLAG  
 EILQMFGKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAHLHDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKKGK  
 GLILHYYSEREGLQDYVIGIIKTVAAQQIHGTEIDMKVIQQRSEECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

FIG. 8BB

*β2 de Rattus norvegicus*

(SEQ ID NO:157)

ATGTATGGATTCATCAACACCTGCCCTGCAGTCTCTTGACAGAGAAATTGGTGAGGAGACA  
 TGGGAGAAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAGTCAAGATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGAT  
 GACATCATCACCATTAAGCTCATCCAAGAAGCCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGCC  
 ATTCTGAAGCTCTTGCAGAATACTCTTTAAGTTCTGTAAGATGTCTGGCTATGACAGGATGC  
 TGCGGACACTGGAGGAAATCTCACCGAGTTATTGAAAACCTAGATGCACTCCACAGTTACC  
 TGGCACTGTCTATCAGGAAATGAACGCACCACCTTCGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGGG  
 GCGATGCTCTCCACTACTCAGACAGACATGGTCTGTGTCACATTGATCAGGATCATTG  
 AAGCTGTGGCCAAGGACTCTTGCACACTGATGTGGCCATGAGTATCCTGGATATGAACGAAG  
 AGGTGGAAAGGACAGGGAAGAAAGAACATGTTGTCTGGTGTGAGAAGGCTCACAGA  
 CAGATAAGAGGAGCAAAGGCAAGCCGCCACAAGGCAGTGAGGACAGCCAGGCAGACAGG  
 AGGCTCTCCAGGGAACACTCCTCGGATGAAGGAGAGATATTAAACATCCCTGTTGCCCTG  
 GGGAGAAATCTCACTCACTGCTGTGAGGGCATCGGTCTTTGGAAAAGGGCCCTCAGGG  
 ACACCTTCCAGCCGCTATCTGAGAGACTATGGTCGAAGAGGAGGTCTGTGATGCTT  
 TTCCTTCCACATTGCTTGTGATGAAGCACTAAGGTCAAGCAAGCTGGAGTGAATATTCA  
 AGTATGTCCTGGAATCTAACCAAGATTGCACTAGATGAGTATTTCCATCATCCACCC  
 TCAAGTTACTTCAACATCTCAGCATCTGCAAGTTCTTAACAGTCAGTTGTCITGAAGACA  
 AGAAAAGAAATGATGCCAAAGCAAGGAAGAGCCAGCCGATGCTCAAACCTCGGGGTCA  
 TGATCTGGATGGAGTCTGTGAGGTGATCTGTCATGTGTTCCCAAACGTCCGCAGCCTGC  
 AAGAGCTGGAAGAGAGCAAGATGCATCTTCTGATATCGCTCCGCACGACACGACCAGGGAT  
 CTCATCTCCTCAACCAGCAGAGGCTGGCAGAGATGGAGCTGTCCTGCCAACTGGAAAAGAA  
 GAAGGAGGAGTTGCGTGTCTTCAATCACCTGCCATCGAGAAGAAGAACAGAGACACT  
 TGCTGTATGCCATGCTGCCTGAACATGTGCCAACCAACTCAAGGAGGGCAGAAAGGTGGCT  
 GCAGGAGAATTGAAACATGTACAATCTTCACTGCAGTGTGACATTACCAACATCTGT  
 GCAGCCTGTGAACCTATCCAAATCGTGAACATGCTGAATTCAATGTAUTCCAAGTTGACAGG  
 TTAACCACTGTCCATGATGTCACAAAGTAGAAACAATAGGGATGCTTACATGGTGGTGGGT  
 GGAGTACCACTGACCGCTTGAAGCCATGCTCAAAGAGTCGCCAATTGCTCTGGGATGAGA  
 ATTCTGCAAAAGAAGTGAATCCTGCACTGGGAACCTATCCAGATCAGAGTGGGAATC  
 CACACTGGACCAGTCTAGCAGGTGTTGGAGACAAGAGTCCTCGGTACTGCTGTTGGT  
 GACACTGTAACACAGCCTCTAGGATGAAAGTCACGGGCTCCCAGCAAAGTGCATCTGAG  
 CCCACAGCCCACAGAGCCCTGAAAAAACAAAGGGTTGAAATGTCAGGAGAGGCGAGATCG  
 AAGTGAAGGGGAAAGGAAAGATGACCACATACTTCTGATCCAGAACCTGAATGCCACCGAG  
 GATGAGATAATGGGGCGACCTCAGCCCCGCTGATGGAAAGAAGTATGTAUTCCGGAAA  
 CCAAGTCAGGAAGTCCCTGCTGTCGGAGGAACACAGACCATCAGCAACAAGTCTACAAAG  
 GAGACCCAGCAGACGCCCTTAATGAAGTCACACTGCTGGAGCCCAGTGGCAGGGCAGAAC  
 TCCACAGATGCACTAACCAGCCATCACCAGATGAGACCAAGACAAGTGTGCTGCTAG  
 TGGCCCTGTGCTGTGCTTCTGTGTTGTGCTGTGA

(SEQ ID NO:158)

MYGFINTCLQLSVTEKFGEETWEKLKAPAEVQDVFMYYVYDDIITIKLIQEACKVLDVSMEAILK  
 LFGEYFFKFCMSGYDRMLRTLGNLTFEINLDALHSYLAQSYQEMNAPSFRVEEGADGAMLLH  
 YYSDRHGLCHIVPGIIEAVALKDFDFTDVAMSILDMNEEVERTGKKEHVFLVVQKAHRQIRGAKA  
 SRPQGSEDSQADQEALQGTLLRMKERYLNIPVCPEKSHSTAVRASVLFKGKPLRDTFQPVYPERL  
 WVEEVFCDAFPFHIVFDEALRVKQAGVNQKYVPGILTQKFALDEYFSIHPQVTFNISICKFINSQ  
 FVLKTRKEMMPKARKSQPMLKLRGQMIWMESLRCMIFMCSPNVRSLQELESKMHLSDIAPHDT  
 TRDLILLNQQRLAEMELSCQLEKKKEELRVLNSHLAIIEKKKTETLLYAMLPEH VANQLKEGRKVA  
 AGEFETCTILFSDVVTFTNICAACEPIQIVNMLNSMYSKFDRLTSVHDVYKVETIDAYMVVGVP  
 VPVESHAQRVANFALGMRISAKEVMNPVTGEPIQIRVGHTGPVLAGVVGDKMPRYCLFGDTVNT  
 ASRMESHGLPSKVHLSPTAHRALKNGFEIVRRGEIEVKGKGKMTTYFLIQNLNATEDEIMGRPSA  
 PADGKEVCTPGNQVRKSPAVERNTDHQQVYKGDPADASNEVLAGSPVAGRNSTDAVNNQPSP  
 DETKTSVVASGPVLSAFCVVL

FIG. 8CC

**β2 (1-217) de *Homo sapiens***

(SEQ ID NO:159)

ATGTATGGATTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTTGTGACAGAGAAATTGGTGAGGAGACA  
 TGGGAGAAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAGTCAAGATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGAT  
 GACATCATCACCATTAAGCTCATCCAAGAACGCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGCC  
 ATTCTGAAGCTCTTGGCGAATACTTCTTAAGTTCTGTAAGATGTCTGGCTATGACAGGATGC  
 TCGGGACACTTGGAGGAAATCTCACCGAGTTATTGAAAACCTAGATGCACTCCACAGTTACC  
 TGGCACTGTCTTATCAGGAAATGAACGCACCATCCTTCGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGGG  
 GCGATGCTCTCCACTACTCAGACAGACATGGTCTGTGTACATTGTACCGGTATCATTG  
 AAGCTGTGGCCAAGGACTTGTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCCTGGATATGAACGAAG  
 AGGTGGAAAGGGACAGGGAAGAAAGAACATGTTGTTCTGGTGTGCAGAAGGCTCACAGA  
 CAGATAAGAGGAGCAAAGGCAAGCCGCCACAAGGCAGTGAGGACAGCCAGGCAGACCAGG  
 AGGCTCTCCAGGAACACTCCTT

(SEQ ID NO:160)

MYGFINTCLQLVTEKFGEEETWEKLKAPAEVQDVFMYTVDIITIKLIQEACKVLDVSMEAIIK  
 LFGEYFFKFCMSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSYLALSYQEMNAPSFRVEEGADGAMLLH  
 YYSDRHGLCHIVPGIIEAVAKDFFDTDVAMSILDNEEVERTGKKEHVVFLVVQKAHRQIRGAKA  
 SRPQGSEDSQADQEAQGTLL

**β2 (1-217) 1142Y de *Homo sapiens***

(SEQ ID NO:161)

ATGTATGGATTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTTGTGACAGAGAAATTGGTGAGGAGACA  
 TGGGAGAAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAGTCAAGATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGAT  
 GACATCATCACCATTAAGCTCATCCAAGAACGCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGCC  
 ATTCTGAAGCTCTTGGCGAATACTTCTTAAGTTCTGTAAGATGTCTGGCTATGACAGGATGC  
 TCGGGACACTTGGAGGAAATCTCACCGAGTTATTGAAAACCTAGATGCACTCCACAGTTACC  
 TGGCACTGTCTTATCAGGAAATGAACGCACCATCCTTCGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGGG  
 GCGATGCTCTCCACTACTCAGACAGACATGGTCTGTGTACATTGTACCGGTATCATTG  
 AAGCTGTGGCCAAGGACTTGTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCCTGGATATGAACGAAG  
 AGGTGGAAAGGGACAGGGAAGAAAGAACATGTTGTTCTGGTGTGCAGAAGGCTCACAGA  
 CAGATAAGAGGAGCAAAGGCAAGCCGCCACAAGGCAGTGAGGACAGCCAGGCAGACCAGG  
 AGGCTCTCCAGGAACACTCCTT

(SEQ ID NO:162)

MYGFINTCLQLVTEKFGEEETWEKLKAPAEVQDVFMYTVDIITIKLIQEACKVLDVSMEAIIK  
 LFGEYFFKFCMSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSYLALSYQEMNAPSFRVEEGADGAMLLH  
 YYSDRHGLCHIVPGIIEAVAKDFFDTDVAMSILDNEEVERTGKKEHVVFLVVQKAHRQIRGAKA  
 ASRPQGSEDSQADQEAQGTLL

FIG. 8DD