



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0714380-0 A2**

(22) Data de Depósito: 10/07/2007
(43) Data da Publicação: 05/03/2013
(RPI 2200)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/46

(54) **Título:** COMPOSIÇÕES ANTICOCAÍNA E TRATAMENTO

(30) **Prioridade Unionista:** 10/07/2006 US 60819569

(73) **Titular(es):** Columbia University

(72) **Inventor(es):** Chang-Guo Zhan, Daquan Gao, Diwahaar L. Sunahara, Donald Landry, James H. Woods, Joanne MacDonald, John J. Tesmer, Mei-Chuan Holden Ko, Roger Sunahara, Shi-Xian Deng, Tien-Yi Lee, Victor Yang, Young Min Kwon

(74) **Procurador(es):** Orlando de Souza

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007015762 de 10/07/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/008358de 17/01/2008

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÕES ANTICOCAÍNA E TRATAMENTO. Modalidade da invenção aqui reveladas geralmente relacionam-se a terapêuticos anticocaína. Especificamente, algumas modalidades da invenção relacionam-se a esterases de cocaína (COcE) mutante altamente eficientes, termoestáveis, e de longa duração que podem proteger contra os efeitos tóxicos e de reforço da cocaína em indivíduos. São aqui fornecidos polipéptidos de COcE mutante que apresentam atividade de esterase termoestável. São também fornecidos métodos de tratamento de condições induzidas por cocaína em um indivíduo em necessidade por meio da administração de CocE mutante bem como métodos para rastreamento de alto rendimento de polipéptidos de esterase candidatos.

COMPOSIÇÕES ANTICOCAÍNA E TRATAMENTO**Referência cruzada a pedidos relacionados**

Esse pedido reivindica prioridade de pedido provisório U.S. no. 60/819.569, depositado em 10 de julho de 2006, que
5 é aqui incorporado em sua totalidade por referência.

Declaração relacionada à pesquisa ou desenvolvimento com patrocínio federal

Essa invenção foi feita em parte com o apoio do Governo dos Estados Unidos sob "NIDA Grant No. DA021416". O
10 Governo dos Estados Unidos tem certos direitos na invenção.

Incorporação por referência de material submetido em um compact disc

A Listagem de Seqüência, que é uma parte da atual invenção, inclui forma de leitura em computador e uma
15 listagem de seqüência escrita que compreende seqüências de nucleotídeos e/ou aminoácidos da presente invenção. a informação de listagem de seqüência registrada em forma de leitura em computador é idêntica à listagem de seqüência escrita. O assunto da Listagem de Seqüência é aqui
20 incorporado em sua totalidade por referência.

Campo da invenção

A invenção aqui revelada relaciona-se de modo geral a terapêutica anticocaína.

Fundamento

25 A dependência de cocaína é um problema social e médico intratável que é resistente à cura através de farmacoterapia. Cocaína age bloqueando a captação de monoaminas, dopamina, norepinefrina, e serotina assim prolongando e intensificando os efeitos desses
30 neurotransmissores no sistema nervoso central (Benowitz NL

(1993) *Pharmacol Toxicol* 72, 3-12). A toxicidade de cocaína é marcada por convulsões e disfunção cardíaca (por exemplo, infarto do miocárdio, arritmias cardíacas, pressão arterial elevada, AVC, ou aneurisma dissecante, e demanda aumentada de oxigênio pelo miocárdio), devido a efeitos sobre os sistemas neurotransmissores e bloqueio do canal de sódio miocárdico (Bauman JL e DiDomenico RJ (2002) *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 7, 195-202; Wilson LD and Shelat C (2003) *J Toxicol Clin Toxicol* 41, 777-788; Knuepfer MM (2003) *Pharmacol Ther* 97, 181-222). Devido à capacidade da cocaína de cruzar facilmente a barreira hematoencefálica e seus efeitos disseminados sobre os sistemas nervosos central e periférico, overdose pode resultar em morte súbita (veja, Bauman JL e DiDomenico RJ (2002) *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 7, 195-202, para revisão).

Embora o mecanismo de ação da cocaína seja bem compreendido, essa informação ainda não resultou no desenvolvimento de um antagonista eficaz de cocaína que possa ser usado em situações de dependência de overdose. Os efeitos rápidos e pleiotrópicos da cocaína apresentam um problema complexo para o tratamento de toxicidade aguda por cocaína (Carroll FI, Howell LL and Kuhar M.J (1999) *J Med Chem* 42, 2721-2736). Os dois tipos de terapias que são disponíveis para o tratamento de dependência de opióide, antagonismo (por exemplo, naltrexona) e substituição (por exemplo, metadona), não têm paralelos no caso de cocaína, embora tenham sido consideradas tentativas no último (por exemplo, J. Grabowski e cols. (2004) *Addictive Behaviors* 29, 1439-1464). Uma abordagem é evitar ou reduzir que a cocaína atinja locais de ação por administração de

esterases endógenas, anticorpos específicos para cocaína, ou um anticorpo a catalítico.

Cocaína de ocorrência natural é hidrolisada no éster de benzoila por butirilcolinesterase sérica (BChE) um éster metílico de ecgonina não tóxico e ácido benzóico. No fígado, carboxilesterase hCE-2 hidrolisa o éster metílico para gerar benzoilecgonina e metanol (veja, por exemplo, Figura 1). A meia-vida de eliminação da cocaína no sangue varia de 0,5 a 1,5 hr (T. Inaba (1989) Canadian Journal of Physiology & Pharmacology 67, 1154-1157). Tem havido algumas tentativas de usar BChE de ocorrência natural ou BChE geneticamente construída para aumentar a quebra de cocaína (veja, por exemplo, Carmona e cols. (2000) Drug Metabolism & Disposition 28, 367-371; Xie e cols. (1999) Molecular Pharmacology 55, 83-91; Sun e cols. (2002a) Molecular Pharmacology; Sun e cols. (2002b) Pharmacology & Experimental Terapêuticos 302, 710-716; Duysen e cols. (2002) Journal of Pharmacology & Experimental Terapêuticos 302, 751-758; Gao Y and Brimijoin S (2004) Journal of Pharmacology & Experimental Terapêuticos 310, 1046-1052; Gao e cols. (2005) Molecular Pharmacology 67, 204-211). Outros pesquisadores utilizaram um anticorpo monoclonal, Mab 15A10, como um anticorpo catalítico para cocaína (veja, por exemplo, Landry e cols., 1993; Mets e cols., 1998; Baird e cols., 2000; Larsen e cols., 2004), enquanto outros exploram o uso de vacinas de cocaína (veja, por exemplo, Kosten e cols. (2002) Vaccine 20, 1196-1204).

Tabela 1: Cinética de várias enzimas de hidrólise de cocaína contra (-) cocaína.

Enzima	Kcat	Km (μM)	Eficiência	Referência
--------	------	----------------------	------------	------------

	(min ⁻¹)		(kcat/Km)	
BChE	4,1	4,5	$9,1 \times 10^8$	Sun e cols., 2002a
Ala328W/Y332A	154	18	$8,5 \times 10^8$	Sun e cols., 2002a
Mab15A10	2,2	220	1×10^4	Larsen e cols., 2004
AME 359	620	20	$3,1 \times 10^7$	Gao e cols., 2005
CocE	468	0,64	$7,2 \times 10^8$	Turner e cols., 2002

Uma bactéria, *Rhodococcus sp.* MB 1, nativa do solo que circunda a planta de coca, desenvolveu a capacidade de utilizar cocaína como sua única fonte de carbono e nitrogênio. A bactéria expressa uma esterase da cocaína (CocE) que age de modo similar a BChE para hidrolisar o éster de benzoila da cocaína, gerando éster metílico de ecgonina e ácido benzóico (veja, por exemplo, Figura 1) (Bresler e cols. (2000) *Appl Environ Microbiol* 66, 904-908; Turner e cols. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307; Larsen e cols. (2002) *Nature Struct Biol* 9, 17-21). O gene para CocE foi isolado e clonado (Bresler e cols. (2000) *Appl Environ Microbiol* 66, 904-908), e a estrutura de cristal de CocE foi determinada (Turner e cols. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307; Larsen e cols. (2002) *Nature Struct Biol* 9, 17-21). A estrutura de CocE (veja, por exemplo, Figura 2) revela uma clássica dobra de serina esterase em adição a dois outros domínios que se combinam para formar um bolso de ligação de cocaína. A alteração de qualquer um desses três aminoácidos (Asp, His, ou Ser) na tríade catalítica no

sítio ativo (para revisão, veja Dodson G and Wlodawer A (1998) Trends Biochem Sci 23, 347-352) inativa a atividade da esterase contra a cocaína. Além disso, mutação de resíduos que fazem contato com a porção benzoato da cocaína (por exemplo, Tyr44) também rompe a hidrólise da cocaína, presumivelmente através do dano à estabilização de oxiânion no estado de transição (Turner e cols. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307; Larsen e cols. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21). A enzima purificada (MW ~65kDa) catalisa a cocaína de modo muito eficaz com cinética de Michaelis-Menten $k_{cat} = 7,2 \text{ s}^{-1}$ e $K_m = 640 \text{ nM}$ (Turner e cols. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307; Larsen e cols. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21), quase três ordens de magnitude maior que as esterases endógenas e, mais provavelmente, podem agir rapidamente o suficiente para desintoxicar humanos que sofreram overdose de cocaína (Landry e cols. (1993) Science 259, 1899-1901; Mets e cols. (1998) National Academy of Sciences of the United States of America 95, 10176-10181). Adicionalmente, a esterase também metaboliza cocaetileno, um potente metabólito de cocaína e álcool, de forma quase tão eficiente como ela metaboliza a cocaína ($k_{cat} = 9,4 \text{ s}^{-1}$ e $K_m = 1.600 \text{ nM}$) (Turner e cols. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307; Larsen e cols. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21).

Portanto, seria desejável fornecer uma CocE estável para terapêutica anticocaína.

Sumário da invenção

Conseqüentemente, os presentes inventores tiveram êxito na descoberta de mutantes de esterase de cocaína altamente eficientes, termoestáveis, e de longa duração que

podem proteger contra os efeitos tóxicos da cocaína em indivíduos.

Um aspecto da invenção fornece polipeptídeos de esterase de cocaína mutante isolada (CocE) da seqüência de aminoácidos de CocE de tipo selvagem (por exemplo, Id. de Seq. N°: 1) mas com pelo menos um resíduo de aminoácido substituído. Os polipeptídeos de CocE mutante têm atividade de esterase com termoestabilidade aumentada a 37°C quando comparados à CocE de tipo selvagem.

Várias modalidades incluem polipeptídeos de CocE mutante com pelo menos duas, três, quatro, cinco ou mais substituições da seqüência de aminoácidos de CocE de tipo selvagem. Exemplos de polipeptídeos de CocE mutante dentro do escopo da invenção incluem aqueles com uma seqüência de aminoácidos de Id. de Seq. N°: 3 (L163V); Id. de Seq. N°: 7 (V225I); Id. de Seq. N°: 8 (I218L); Id. de Seq. N°: 9 (A310D); Id. de Seq. N°: 10 (A149S); Id. de Seq. N°: 11 (S159A); Id. de Seq. N°: 12 (S265A); Id. de Seq. N°: 13 (S56G); Id. de Seq. N°: 14 (W220A); Id. de Seq. N°: 16 (S140A); Id. de Seq. N°: 17 (F189L); Id. de Seq. N°: 18 (A193D); Id. de Seq. N°: 19 (T254R); Id. de Seq. N°: 20 (N42V); Id. de Seq. N°: 21 (V262L); Id. de Seq. N°: 22 (L508G); Id. de Seq. N°: 23 (Y152H); Id. de Seq. N°: 24 (V160A); Id. de Seq. N°: 25 (T172R); Id. de Seq. N°: 26 (Y532F); Id. de Seq. N°: 27 (T74S); Id. de Seq. N°: 28 (W285T); Id. de Seq. N°: 29 (L146P); Id. de Seq. N°: 30 (D533S); Id. de Seq. N°: 31 (A194R); Id. de Seq. N°: 32 (G173Q); Id. de Seq. N°: 33 (C477T); Id. de Seq. N°: 34 (K531A); Id. de Seq. N°: 35 (R41I); Id. de Seq. N°: 36 (L119A); Id. de Seq. N°: 37 (K46A); Id. de Seq. N°: 38

(F84Y), , T172R-G173Q (Id. de Seq. N°: 39); L169K (Id. de Seq. N°: 40); F189A (Id. de Seq. N°: 41), N197K (Id. de Seq. N°: 42), R182K (Id. de Seq. N°: 43), F189K (SEQ ID NO: 44), V190K (Id. de Seq. N°: 45), Q191K (Id. de Seq. N°: 46), and A194K (Id. de Seq. N°: 47), ou um fragmento funcional desses. Polipeptídeos de exemplo adicionais de CocE mutante incluem, F189A/T172R, T172R/A193D, T172R/G173Q-I175-G-GA186, T172R/G173Q-T176-G-G-D185, e outros. Devido às convenções de nomeação e seqüências de polipeptídeos aqui reveladas, uma pessoa habilitada na técnica pode determinar as seqüências de polipeptídeos para os polipeptídeos de CocE mutante acima nomeados.

Um outro aspecto da invenção fornece composições farmacêuticas que incluem entre outros componentes um polipeptídeo de CocE mutante dentro do escopo da invenção e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

Um outro aspecto da invenção fornece ácidos nucleicos isolados que codificam o polipeptídeo de CocE mutante aqui descrito. Em várias modalidades, os ácidos nucleicos incluem aqueles com seqüências que hibridizam ao ácido nucleico que codifica CocE de tipo selvagem (por exemplo, Id. de Seq. N°: 2), ou o complemento a ela, sob condições altamente controladas. Tal ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo de CocE mutante que tem atividade de esterase com termoestabilidade aumentada a 37°C quando comparado a CocE de tipo selvagem. Várias modalidades da seqüência de ácidos nucleicos isolados têm pelo menos cerca de 85% de identidade de seqüência com a seqüência de ácidos nucleicos de CocE de tipo selvagem (por exemplo, Id. de Seq. N°: 2). Por exemplo, a seqüência de ácidos nucleicos

isolados tem pelo menos cerca de 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, e 99% de identidade de seqüência de CocE de tipo selvagem (por exemplo, Id. de Seq. N°: 2).

5 Em várias modalidades, polipeptídeos de CocE mutante (ou polipeptídeos codificados por ácidos nucleicos dentro do escopo da invenção) têm temperaturas de fusão aumentadas quando comparados a CocE de tipo selvagem. Em várias modalidades, polipeptídeos de CocE mutante (ou
10 polipeptídeos codificados por ácidos nucleicos dentro do escopo da invenção) aumentam a termoestabilidade de polipeptídeo de CocE mutante sobre CocE de tipo selvagem em pelo menos cerca de 2,0 kcal/mol. Por exemplo, a termoestabilidade aumentada pode ser pelo menos cerca de
15 2,1 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,2 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,3 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,4 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,5 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,6 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,7 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,8 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,9 kcal/mol,
20 pelo menos cerca de 3,0 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,1 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,2 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,3 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,4 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,5 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,6 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,7 kcal/mol, pelo menos
25 cerca de 3,8 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,9 kcal/mol, pelo menos cerca de 4,0 kcal/mol, pelo menos cerca de 4,1 kcal/mol, pelo menos cerca de 4,2 kcal/mol, pelo menos cerca de 4,3 kcal/mol, pelo menos cerca de 4,4 kcal/mol, or pelo menos cerca de 4,5 kcal/mol.

30 Em várias modalidades, os polipeptídeos de CocE

mutante (ou polipeptídeos codificados por ácidos nucleicos dentro do escopo da invenção) têm imunogenicidade reduzida quando comparados a CocE de tipo selvagem.

Em algumas modalidades, os polipeptídeos de CocE mutante termoestáveis têm menos atividade de esterase que CocE de tipo selvagem. Por exemplo, mutantes de CocE termoestáveis podem ter cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, ou cerca de 99% da atividade de esterase de CocE de tipo selvagem. Em outras modalidades, os polipeptídeos de CocE mutante têm aproximadamente a mesma eficiência catalítica ou maior de Polipeptídeos de CocE de tipo selvagem. Por exemplo, mutantes de CocE termoestáveis podem ter cerca de 100%, cerca de 110%, cerca de 120%, cerca de 130%, cerca de 140%, cerca de 150%, ou mais da atividade de esterase de CocE de tipo selvagem.

Em várias modalidades, os polipeptídeos de CocE mutante são peguilados. Em várias modalidades, o polipeptídeo de CocE mutante é encapsulado em uma hemácea. Por exemplo, um polipeptídeo de CocE mutante(s) peguilado (ou uma composição farmacêutica que inclui um polipeptídeo de CocE mutante peguilado) pode ser encapsulado em uma hemácea.

Em algumas modalidades, os polipeptídeos de CocE mutante são estabilizados por um substrato, produto, e/ou inibidor.

Um outro aspecto da invenção fornece métodos de tratamento de condição induzida por cocaína. Em tais

métodos, uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo de CocE mutante(s) (ou uma composição farmacêutica que inclui um polipeptídeo de CocE mutante(s)) dentro do escopo da invenção é administrada a um indivíduo que dela necessita. Em várias modalidades, a condição induzida por cocaína inclui overdose de cocaína, toxicidade de cocaína, vício de cocaína, dependência de cocaína, e/ou alguma combinação desses.

Ainda um outro aspecto da invenção fornece um método de rastreamento de alto rendimento para identificação de polipeptídeos de CocE mutante termoestáveis. Em tal método de rastreamento, uma célula é estavelmente transformada com um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de CocE mutante candidato. O polipeptídeo de CocE mutante é expresso na célula. O polipeptídeo de CocE mutante expresso é isolado ou revelado. A atividade de esterase do polipeptídeo de CocE mutante isolado é medida em um ou mais temperaturas para determinar a termoestabilidade dos polipeptídeos de CocE mutante isolados. Tais temperaturas podem ser de cerca de 30°C a cerca de 50°C. Polipeptídeo de CocE mutante com atividade de esterase nas temperaturas predeterminadas são selecionados.

Em algumas modalidades do método de rastreamento, a medição da atividade de esterase dos polipeptídeos mutantes isolados pode ser realizada por contato do polipeptídeo de CocE mutante isolado com (i) cocaína e um indicador de pH ou (ii) um tio-derivado de cocaína e um indicador de tiol. Qualquer mudança no indicador de pH ou no indicador de tiol é então detectada. Tal mudança é correlacionada com a formação de ácido benzóico a partir da hidrólise de cocaína

ou derivado de cocaína pelo polipeptídeo de CocE mutante.

Algumas modalidades do método de rastreamento também incluem a condução de vários ciclos do procedimento de rastreamento em temperaturas aumentadas para medir a
5 atividade de esterase. Por exemplo, o primeiro ciclo pode empregar uma temperatura para medição da atividade de esterase de cerca de 30°C enquanto um ciclo subsequente pode empregar uma temperatura para medição da atividade de esterase de cerca de 45°C.

10 Em algumas modalidades do método de rastreamento, a expressão de polipeptídeo de CocE mutante ocorre em uma temperatura em que CocE de tipo selvagem substancialmente retém a atividade catalítica. Em outras modalidades do método de rastreamento, a expressão de polipeptídeo de CocE
15 mutante ocorre em uma temperatura em que o polipeptídeo de CocE de tipo selvagem substancialmente se divide em corpos de inclusão. Por exemplo, a temperatura de expressão pode ser pelo menos cerca de 35°C, pelo menos cerca de 36°C, pelo menos cerca de 37°C, pelo menos cerca de 38°C, pelo
20 menos cerca de 39°C, ou pelo menos cerca de 40°C.

Outros assuntos e características serão em parte aparentes e em parte apontadas a seguir.

Breve descrição dos desenhos

Aqueles habilitados na técnica compreenderão que os
25 desenhos, descritos abaixo, são para pbjectivos ilustrativos apenas. Os desenhos não devem limitar o escopo dos presentes ensinamentos de modo algum.

Figura 1 é um diagrama que ilustra o metabolismo de cocaína por várias reações enzimáticas.

30 Figura 2 é um diagrama em fita que ilustra a estrutura

de CocE. Domínio 1 (DOM1), domínio 2 (DOM2), e domínio 3 (DOM 3) são indicados, junto com o sítio ativo localizado na interseção dos três domínios. Uma molécula de ácido benzóico é mostrda no sítio ativo.

5 A Figura 3 é um gráfico em linha que mostra o perfil de eluição para CocE por FPLC (Q-Sepharose), em que a absorvência de UV e concentração de cloreto de sódio é mostrada sobre o tempo. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 1.

10 A Figura 4 é um gráfico em linha e de dispersão que mostra a degradação *in vitro* da cocaína na presença de CocE em plasma humano. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 2.

A Figura 5 é um gráfico de cinética de enzima de Michaelis-Menten para CocE de tipo selvagem, a CocE mutante T172R (Id. de Seq. N°: 26), e a a CocE mutante S159A (Id. de Seq. N°: 11) para reações realizadas a 30°C e 37°C. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 4.

20 A Figura 6 é um conjunto de fotografias da coloração de proteína total após separação por PAGE de CocE de tipo selvagem e mutante T172R com o uso de condições de desnaturação (SDS+(3Me) ou não desnaturação (Nativa) após incubação a 37°C por vários pontos de tempo. Para mais informação veja o Exemplo 4.

25 A Figura 7 é um gráfico em linha que mostra as temperaturas de fusão determinadas por dicroísmo circular de CocE de tipo selvagem e T172R. O espectro completo um é mostrado em A, o espectro próximo do UV é mostrado em B, e a temperatura de fusão estimada para cada mutante é mostrada em C. Para mais informação veja o Exemplo 4.

30

A Figura 8 contém (A) um desenho da hidrólise do derivado benzoiltioéster da cocaína (tio-1) e a des-carbometoxi cocaína (tio-2) seguido por reação dos tióis liberados (R-SH) com reagente de Ellman; e (B) um gráfico em linha que mostra a reação colorimétrica de células de controle BL21 e células BL21 que contêm CocE incubado com o derivado de benzoiltioéster (tio-1) e reagentwe de Ellman. Para mais informação veja o Exemplo 15.

A Figura 9 é um gráfico em linha e de dispersão que mostra o efeito de 1,0 mg CocE (círculos fechados) ou PBS (veículo, círculos abertos) em letalidade induzida por cocaína quando administrada um minuto após doses crescentes de cocaína (n = 6-7). Os dados apresentados são expressos como percentual e seu erro padrão. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 5.

A Figura 10 é um gráfico em barras que mostra o efeito de doses crescentes de CocE (CE) ou BChE humana (BChE), ou PBS, sobre a letalidade induzida por cocaína quando administrada um minuto antes de 180 mg/kg cocaína (n = 6-7). Os dados apresentados são expressos como percentual e sua média de erro padrão. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 5.

A Figura 11 é um gráfico em barras que mostra o efeito de mutantes de CocE S117A e Y44F, ou CocE tratada com PMSF em convulsões e letalidade induzidas por cocaína quando administrados 1 minuto antes de 180 mg/kg cocaína (n = 5-6). Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 5.

A Figura 12 é um gráfico em barras que mostra o efeito de 1,0 mg CocE ou PBS administrados um minuto após 560

mg/kg WIN-35065-2, a LD100 determinada do composto (n = 6-8). Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 5.

A Figura 13 é um gráfico em linha e de dispersão que mostra inativação dependente de tempo de CocE (125 ng/ml) *in vitro*. A deterioração exponencial $t_{1/2}$ foi calculada como 13.2. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 6.

A Figura 14 é um gráfico em barras que mostra efeitos protetores dependentes de tempo de 1 mg CocE quando administrada em vários momentos antes e depois de 100 mg/kg cocaína (n = 6-8). Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 6.

A Figura 15 é um gráfico em barras que mostra as concentrações de cocaína em plasma humano tratado com 0,8 μ M de esterase de cocaína ou veículo de esterase em zero e um minuto após a administração da esterase. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 6.

A Figura 16 é uma série de gráficos em linha e de dispersão que mostra o efeito de 0,32 mg de CocE (círculos fechados), 0,32 mg de CocE mutante T172R (triângulos fechados), ou PBS (veículo, círculos abertos) sobre a letalidade induzida por cocaína quando administrada um minuto após doses crescentes de cocaína (painel esquerdo) e minutos até a morte após administração de cocaína (painel direito). Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 7.

Figura 17 é um gráfico em linha e de dispersão que mostra o efeito de 0,32 mg/kg de CocE (círculos fechados) ou CocE mutante T172R (triângulos fechados) sobre a

letalidade induzida por cocaína quando administrada em 1, 10, 30, and 60 minutos antes da administração de 320 mg/kg cocaína (n=6). Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 7.

5 Figura 18 é uma série de gráficos em linha e de dispersão que mostra o efeito de 1 mg de hBChE (triângulo fechado), 0,32 mg CocE (círculo fechado), ou 1 mg de CocE (quadrado fechado) sobre a letalidade induzida por cocaína. Figura 18A mostra a letalidade como uma função da
10 concentração de cocaína. Figura 18B mostra os minutos até a morte após a administração de cocaína como uma função da concentração de cocaína. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 8.

15 A Figura 19 é um traço do espectro de massa MALDI-TOF de CocE peguilada. A diferença de massa entre os picos corresponde a ~5.500 Da; equivalente ao peso molecular de uma única cadeia de PEG. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 11.

20 A Figura 20 é uma imagem de SEM de hemáceas fixadas por gluteraldeído. A Figura 20A é RBC normal sem tratamento. A Figura 20B é hemácea de ruptura osmótica/re-selagem carregada com L-ASNase. A Figura 20C é RBC carregado com LMWPASNase. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 12.

25 A Figura 21 é um gráfico de dispersão que mostra a atividade percentual de Asperaginase no sangue como uma função do tempo (dias) para RBC/LMP-ASNase ou hemácea fantasma /ASNase. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 12.

30 Figura 22 é um gráfico em linha que mostra a

sobrevivência de camundongos DBA/2 que portam células de linfoma L5178Y. A enzima ou solução salina foram administradas no dia 5, em cujo tempo os sintomas estavam presentes. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 12.

A Figura 23 é um gráfico em linha e de dispersão que demonstra os efeitos protetores de CocE e seus mutantes contra a toxicidade induzida por cocaína. A Figura mostra a percentagem de camundongos que exhibe letalidade induzida por cocaína como uma função da concentração de cocaína injetada em camundongos administrados com CocE de tipo selvagem (0,3 mg), T172R (0,3 mg), T172R-G173Q (0,3 mg), ou L169K (1 mg). CocE ou mutantes (mg) foi administrado por via intravenosa 1 minuto antes da administração de cocaína (mg/kg, i.p.). Diferentes símbolos representam curvas dose-resposta de letalidade induzida por cocaína na ausência ou presença de CocE ou mutantes. Cada ponto de dado representa a percentagem de camundongos (n=8 para cada condição de dosagem) que exibem letalidade induzida por cocaína.

A Figura 24 é uma série de gráficos em linha e de dispersão que demonstram a duração de tempo dos efeitos protetores de CocE contra a toxicidade de cocaína. CocE ou mutantes (0,1, 0,3, e 1 mg, i.v.) foram administrados em diferentes pontos de tempo antes da administração de cocaína i.p. 180 mg/kg. Figura 24A mostra a percentagem de camundongos que exibem letalidade induzida por cocaína como uma função do tempo de administração de CocE de tipo selvagem (0,1 mg), T172R (0,1 mg), L169K (0,1 mg), ou T172R-G173Q (0,1 mg) antes da administração de cocaína i.p. 180 mg/kg. Figura 24B mostra a percentagem de camundongos

que exibem letalidade induzida por cocaína como uma função do tempo de administração de CocE de tipo selvagem (0,3 mg), T172R (0,3 mg), L169K (0,3 mg), ou T172R-G173Q (0,1 mg) antes da administração de cocaína i.p. 180 mg/kg.

5 Figura 24C mostra a percentagem de camundongos que exibem letalidade induzida por cocaína como uma função do tempo de administração de CocE de tipo selvagem (1 mg), T172R (1 mg), L169K (1 mg), ou T172R-G173Q (1 mg) antes da administração de cocaína i.p. 180 mg/kg. Cada ponto de dado

10 representa a percentagem de camundongos (n=8 para cada condição de dosagem) que exibem letalidade induzida por cocaína.

A Figura 25 é um gráfico em linha e de dispersão que demonstra a duração estimada de proteção para 50%

15 letalidade: a Figura mostra a duração estimada (horas) de proteção (50% letalidade) de mutantes de CocE em camundongos como uma função da dosagem (mg, i.v.) de T172R-G173Q, L169K, T172R, e CocE de tipo selvagem. O tempo necessário para atingir 50% letalidade foi determinado a

20 partir da Figura 24.

A Figura 26 é uma série de gráficos em linha e de dispersão que demonstram efeitos protetores de CocE, T172R-G173Q, e suas formas peguiladas contra toxicidade induzida por cocaína. Cada enzima (0,3 mg) foi administrada por via

25 intravenosa 1 min antes da administração de cocaína (mg/kg, i.p.). Diferentes símbolos representam curvas dose-resposta de letalidade induzida por cocaína na ausência ou presença da enzima. Cada ponto de dado representa a percentagem de camundongos (n=8 para cada condição de dosagem) que exibem

30 letalidade induzida por cocaína. A Figura 26A mostra a

percentagem de ocorrência de letalidade como uma função da dosagem de cocaína (mg/kg, i.p.) para Veículo/PBS, CocE de tipo selvagem (0,3 mg), e PEG-CocE de tipo selvagem (0,3 mg). A Figura 26B mostra a percentagem de ocorrência de letalidade como uma função da dosagem de cocaína (mg/kg, i.p.) para Veículo/PBS, T172R-G173Q (0,3 mg), e PEG-T172R-G173Q (0,3 mg).

A Figura 27 é uma série de gráficos em linha e de dispersão que mostra a estabilidade térmica de esterase de cocaína e de mutantes: (A) CocE de tipo selvagem, (B) T172R, (C) T272R/G173Q e L169K. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 17.

A Figura 28 É UM série de cromatogramas que mostra enzimas pré-incubadas a 37°C por 0 minuto ou 60 minutos e resolvidas por cromatografia de exclusão por tamanho (A) CocE de tipo selvagem, (B) T172R, (C) T172R/G173Q. Os padrões de peso molecular, BSA (66Kda) e AD (150Kda) são incluído em A. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 18.

Figura 29 é uma série de espectros de CD smoothed de CocE de tipo selvagem e de quatro mutantes que mostra fusão dependente de temperatura observada entre 200 e 250 nm. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 19.

A Figura 30 é uma série de espectros para CocE de tipo selvagem e quatro mutantes desconvolutos para 3 curvas por meio do algoritmo CCA que sugere que a fusão de CocE é pelo menos um processo de duas etapas que se move da curva original (curva 1) para uma etapa de desdobra intermediária (curva 2) a uma proteína totalmente desnaturada (curva 3).

Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 19.

Figura 31 é uma série de gráficos em linha e de dispersão que mostra a contribuição percentual de cada uma das temperaturas na descrição das 3 curvas CCA desconvolutas mostradas na Figura 30. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 19.

A Figura 32 é um gráfico em linha e de dispersão que mostra as temperaturas de fusão e formação para (1) as fusões de espectro inicial, (2) a formação e fusão do estado intermediário, e (3) o acúmulo da proteína totalmente fundida. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 19.

A Figura 33 é um retrato de um gel que mostra que a Cocaína (faixa de mM) evitou a formação induzida a 37°C de agregados de CocE de alto peso molecular (0,1mg/ml de concentrações de enzima). Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 20.

A Figura 34 é um gráfico em linha e de dispersão que mostra que a Cocaína (quantidades em uM) estabilizou a perda de atividade induzida a 37°C. Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 20.

Figura 35 é um retrato de um gel que mostra que Ácido benzóico (faixa de mM) evitou a formação induzida a 37°C de agregados de CocE de alto peso molecular (0,1mg/ml de concentrações de enzima). Para informação adicional de metodologia, veja o Exemplo 20.

A Figura 36 é um gráfico em linha e de dispersão que mostra que a Cocaína (quantidades em uM) estabilizou a perda de atividade induzida a 37°C. Para informação

adicional de metodologia, veja o Exemplo 20.

Descrição detalhada da invenção

São reveladas modalidades da invenção em que são fornecidas composições e métodos para uma abordagem de 5 degradação catalítica para terapêutica anticocaína. A tecnologia aqui descrita é baseada em parte na descoberta de mutantes de esterase de cocaína altamente eficientes, termoestáveis, e de longa duração que podem proteger contra os efeitos tóxicos e de reforço da cocaína em indivíduos. 10 Tais mutantes fornecem opções de tratamento para condições induzidas por cocaína como overdose de cocaína e dependência de cocaína.

Polipeptídeos de CocE mutante

A despeito da potência de CocE de tipo selvagem (veja, 15 por exemplo, Id. de Seq. N°: 1, N° de acesso AF173165) na metabolização de cocaína (veja, por exemplo, Exemplo 2; Exemplo 4; Exemplo 5), a aplicação de CocE de tipo selvagem como um agente terapêutico no tratamento de overdose de cocaína pode ser limitada por causa sua baixa estabilidade 20 térmica na temperatura fisiológica (se por exemplo, Exemplo 4; Exemplo 6). A Termo-instabilidade contribui para a meia-vida plasmática curta de CocE de tipo selvagem. Uma deterioração significativa (>50%) da atividade de CocE foi observada após incubação da enzima em plasma a 37°C, ou 25 após sua administração intravenosa em um camundongo. O $t_{1/2}$ de CocE a 37°C é de aproximadamente 15 minutos enquanto a 4°C o $t_{1/2}$ é maior que 6 meses. Estudos preliminares em ratos demonstraram um duração relativamente curta do efeito anticocaína de um pouco mais que 30 minutos para CocE.

30 Um aspecto da invenção fornece, portanto,

:
:
: polipeptídeos de CocE mutante purificados que exibem
estabilidade térmica e meia-vida plasmática aumentadas
quando comparados a CocE de tipo selvagem. Os polipeptídeos
de CocE mutante da invenção têm valor clínico significativo
5 por causa de sua capacidade de hidrolisar de modo eficaz a
cocaína, embora também exiba termoestabilidade e/ou meia-
vida plasmática aumentada.

A invenção fornece polipeptídeos de CocE mutante em
que pelo menos um resíduo de aminoácido da CocE de tipo
10 selvagem é substituído, em que a CocE mutante tem
termoestabilidade aumentada embora retenha eficiência
catalítica relativamente alta. Em algumas modalidades,
polipeptídeos de CocE mutante mantêm substancialmente a
atividade de esterase funcional de polipeptídeo de CocE de
15 tipo selvagem (ou seja, hidrólise de cocaína).
Polipeptídeos de CocE mutante têm uma seqüência de
peptídeos que difere de um polipeptídeo de CocE nativo em
um ou mais aminoácidos. A seqüência de peptídeos de tais
mutantes pode apresentar uma substituição, deleção, ou
20 adição de um ou mais aminoácidos de um polipeptídeo de CocE
nativo. Inserções de aminoácido são preferivelmente de
cerca de 1, 2, 3, e 4 a 5 aminoácidos contíguos, e deleções
são preferivelmente de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, e 9
a 10 aminoácidos contíguos. Em várias modalidades, o
25 polipeptídeo de CocE mutante pode conter pelo menos uma,
duas, três, quatro, ou mais substituições de aminoácido,
deleções, ou adições, em que o polipeptídeo de CocE mutante
resultante tem termoestabilidade aumentada.

O termo aminoácido, como aqui usado, deve incluir
30 aminoácidos de ocorrência natural bem como aminoácidos de

ocorrência não natural, incluindo análogos e derivados de aminoácidos. O último inclui moléculas que contêm uma porção de aminoácido. Uma pessoa habilitada na técnica reconhecerá que referência nessa a um aminoácido inclui, por exemplo, L-aminoácidos proteogênicos de ocorrência natural; D-aminoácidos; aminoácidos quimicamente modificados como análogos e derivados de aminoácido; aminoácidos não proteogênicos de ocorrência natural, e compostos quimicamente sintetizados que têm propriedades conhecidas na técnica como sendo características de aminoácidos. Para todos as seqüências de aminoácidos aqui reveladas, entende-se que nucleotídeos e aminoácidos equivalentes podem ser substituídos nas seqüências sem afetar a função das seqüências. Tal substituição está dentro da capacidade de uma pessoa de habilidade comum na técnica.

A invenção também fornece polipeptídeos de CocE mutante purificados com as seguintes substituições: L163V (Id. de Seq. N°: 3); V121D (Id. de Seq. N°: 4); S167A (Id. de Seq. N°: 5); Q123E (Id. de Seq. N°: 6); V225I (Id. de Seq. N°: 7); I218L (Id. de Seq. N°: 8); A310D (Id. de Seq. N°: 9); A149S (Id. de Seq. N°: 10); S159A (Id. de Seq. N°: 11); S265A (Id. de Seq. N°: 12); S56G (Id. de Seq. N°: 13); W220A (Id. de Seq. N°: 14); T122A (Id. de Seq. N°: 15); S140A (Id. de Seq. N°: 16); F189L (Id. de Seq. N°: 17); A193D (Id. de Seq. N°: 18); T254R (Id. de Seq. N°: 19); N42V (Id. de Seq. N°: 20); V262L (SEQ ID. NO: 21); L508G (Id. de Seq. N°: 22); Y152H (Id. de Seq. N°: 23); V160A (Id. de Seq. N°: 24); T172R (Id. de Seq. N°: 25); Y532F (Id. de Seq. N°: 26); T74S (Id. de Seq. N°: 27); W285T (Id.

de Seq. N°: 28); L146P (Id. de Seq. N°: 29); D533S (Id. de Seq. N°: 30); A194R (Id. de Seq. N°: 31); G173Q (Id. de Seq. N°: 32); C477T (Id. de Seq. N°: 33); K531A (Id. de Seq. N°: 34); R41I (Id. de Seq. N°: 35); L119A (Id. de Seq. N°: 36); K46A (Id. de Seq. N°: 37); F84Y (Id. de Seq. N°: 38), T172R-G173Q (Id. de Seq. N°: 39); L169K (Id. de Seq. N°: 40); F189A (Id. de Seq. N°: 41), N197K (Id. de Seq. N°: 42), R182K (Id. de Seq. N°: 43), F189K (Id. de Seq. N°: 44), V190K (Id. de Seq. N°: 45), Q191K (Id. de Seq. N°: 46), and A194K (Id. de Seq. N°: 47). Por exemplo, o polipeptídeo de CocE mutante T172R (Id. de Seq. N°: 25) tem termoestabilidade aumentada, Vmax e Km aumentadas a 37°C, temperatura de fusão aumentada (Tm), meia-vida plasmática aumentada, maior redução na letalidade devido à toxicidade de cocaína, e efeitos anticocaína de maior duração, quando comparados a CocE de tipo selvagem (veja, por exemplo, Exemplo 4, Exemplo 7).

O aumento resultante na termoestabilidade do polipeptídeo de CocE mutante é pelo menos cerca de 2 kcal/mol. A termoestabilidade de um dado polipeptídeo pode ser avaliada por vários métodos conhecidos na prática, incluindo, por exemplo, dicroísmo circular (CD) espectroscopia ou calorimetria de rastreamento diferencial. Por exemplo, o aumento resultante na termoestabilidade pode ser pelo menos de cerca de 2,1, pelo menos cerca de 2,2, pelo menos cerca de 2,3, pelo menos cerca de 2,4, pelo menos cerca de 2,5, pelo menos cerca de 2,6, pelo menos cerca de 2,7, pelo menos cerca de 2,8, pelo menos cerca de 2,9, pelo menos cerca de 3,0, pelo menos cerca de 3,1, pelo menos cerca de 3,2, pelo menos cerca de 3,3, pelo menos

:
:
cerca de 3,4, pelo menos cerca de 3,5, pelo menos cerca de
3,6, pelo menos cerca de 3,7, pelo menos cerca de 3,8, pelo
menos cerca de 3,9, pelo menos cerca de 4,0, pelo menos
cerca de 4,1, pelo menos cerca de 4,2, pelo menos cerca de
5 4,3, pelo menos cerca de 4,4, ou pelo menos cerca de 4,5
kcal/mol. Aumentos ainda maiores na termoestabilidade são
contemplados. Acredita-se que diminuindo a energia em cerca
de 2,1 a cerca de 4,5 kcal/mol pode-se estender o tempo de
meia-vida da proteína em cerca de 30 a cerca de 1.000 vezes
10 mais em temperatura ambiente.

Geralmente, os polipeptídeos de CocE mutante têm
atividade de esterase com termoestabilidade aumentada
quando comparados a CocE de tipo selvagem. Em algumas
modalidades, is polipeptídeos de CocE mutante termoestáveis
15 podem ter menos atividade de esterase que CocE de tipo
selvagem. Por exemplo, mutantes de CocE termoestáveis podem
ter cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%,
cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%,
cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%,
20 cerca de 95%, ou cerca de 99% da atividade de esterase de
CocE de tipo selvagem. Em outras modalidades, os
polipeptídeos de CocE mutante têm aproximadamente a mesma,
eficiência catalítica ou maior de polipeptídeos de CocE de
tipo selvagem. Por exemplo, mutantes de CocE termoestáveis
25 podem ter cerca de 100%, cerca de 110%, cerca de 120%,
cerca de 130%, cerca de 140%, cerca de 150%, ou mais da
atividade de esterase de CocE de tipo selvagem.

Variantes dos polipeptídeos de CocE mutante como
fragmentos, análogos, e derivados também fazem parte da
30 invenção. fragmentos de polipeptídeo de CocE que

:
:
: correspondem a um ou mais motivos e/ou domínios
particulares ou a tamanhos arbitrários, por exemplo, pelo
menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,
19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33,
5 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 200,
250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.150
e 1.200 aminoácidos de comprimento estão dentro do escopo
da invenção aqui revelada. Porções peptidil isoladas de
polipeptídeos de CocE podem ser obtidas por rastreamento de
10 peptídeos recombinantemente produzidos a partir do
fragmento correspondente do ácido nucleico que codifica
tais peptídeos. Em adição, os fragmentos podem ser
quimicamente sintetizados com o uso de técnicas conhecidas
na prática como química convencional de f-Moc ou t-Boc de
15 fase sólida de Merrifield. Por exemplo, um polipeptídeo de
CocE como aqui descrito pode ser arbitrariamente dividido
em fragmentos de comprimento desejado sem sobreposição dos
fragmentos, ou preferivelmente divididos em ed fragmentos
sobrepostos de um comprimento desejado.

20 Um outro aspecto da invenção aqui revelada refere-se a
formas recombinantes do polipeptídeo de CocE. Em algumas
modalidades, moléculas de ácido nucleico isolado da
invenção incluem aqueles polinucleotídeos que codificam os
polipeptídeos de CocE acima descritos. Em outras
25 modalidades, os polipeptídeos recombinantes da invenção
aqui revelados são codificados por um ácido nucleico que
tem pelo menos 85% de identidade de seqüência (por exemplo,
85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,
97%, 98%, e 99%) com a seqüência de ácidos nucleicos de Id.
30 de Seq. N°: 2, em que o polipeptídeo de CocE recombinante

:
:
: expresso retém substancialmente a mesma eficiência catalítica ou maior de polipeptídeo de CocE de tipo selvagem e tem termoestabilidade aumentada quando comparado a CocE de tipo selvagem.

5 Ácidos nucleicos que hibridizam sob condições de alto rigor a ácidos nucleicos de Id. de Seq. N°: 2 ou os complementos de Id. de Seq. N°: 2 também podem ser usados na invenção. Por exemplo, tais ácidos nucleicos que hibridizam a Id. de Seq. N°: 2 ou o complemento de Id. de
10 Seq. N°: 2 sob condições de baixo rigor, condições de rigor moderado, ou condições altamente controladas e também codificam um polipeptídeo de CocE mutante que têm atividade de esterase com termoestabilidade aumentada quando comparados a CocE de tipo selvagem, estão dentro da
15 invenção. Ácidos nucleicos preferidos são aqueles que têm uma seqüência de nucleotídeos que é o complemento de toda ou de uma porção de Id. de Seq. N°: 2. Outras variantes do gene de CocE nativo dentro da invenção são polinucleotídeos que partilham pelo menos 65% (por exemplo, 65%, 66%, 67%,
20 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, e 99%) de identidade de seqüência a Id. de Seq. N°: 2 ou ao complemento de Id. de Seq. N°: 2. Ácidos nucleicos que hibridizam sob condições
25 rigorosas ou partilham pelo menos 65% de identidade de seqüência com Id. de Seq. N°: 2 ou o complemento de Id. de Seq. N°: 2 podem ser obtidos por técnicas conhecidas na prática como por mutações no gene de CocE nativa, ou por isolamento de um organismo que expressa tal ácido nucleico
30 (por exemplo, uma variante alélica).

Moléculas de ácido nucleico que codificam proteínas de fusão de CocE mutante também estão dentro da invenção. Tais ácidos nucleicos podem ser feitos por preparação de uma construção (por exemplo, um vetor de expressão) que
5 expressa proteínas de fusão de CocE mutante quando introduzidos em um hospedeiro adequado. Por exemplo, tal construção pode ser feita por ligação de um primeiro polinucleotídeo que codifica proteína de CocE mutante fundida em estrutura com um segundo polinucleotídeo que
10 codifica uma outra proteína de modo que a expressão da construção em um sistema de expressão adequado gera uma proteína de fusão.

As moléculas de ácido nucleico da invenção podem ser modificadas em uma porção de base, porção de açúcar, ou na
15 estrutura de fosfato, por exemplo, para melhorar a estabilidade da molécula, hibridização e outros. Moléculas de ácido nucleico utilizadas nas modalidades da invenção aqui reveladas podem estar na forma de RNA ou na forma de DNA (por exemplo, cDNA, DNA genômico, e DNA sintético). O
20 DNA pode ser de filamento duplo ou de filamento único e se de filamento único pode ser o filamento de codificação (senso) ou o filamento de não codificação (anti-senso). A seqüência codificadora que codifica um polipeptídeo de CocE mutante pode ser idêntica à seqüência de nucleotídeos
25 reivindicada, ou ela pode também ser uma seqüência codificadora diferente que, como um resultado da redundância ou degeneração do código genético, codifica o mesmo polipeptídeo como os polinucleotídeos de Id de Seq.
N^o: 3-37.

Desenho de CocE mutante

As mutações de termoestabilização de CocE podem ser desenhadas para aumentar a estabilidade termodinâmica de um polipeptídeo através da diminuição de ΔG (desdobrado→
5 dobrado) ou taxa diminuída de desdobra através do aumento da energia livre de ativação do processo de desdobra. O ΔG (desdobrado→ dobrado) é a diferença de energia livre entre o estado desdobrado e dobrado. Para um polipeptídeo termodinamicamente estável, ΔG (desdobrado→ dobrado) deve
10 ser um valor negativo. Geralmente, quanto menor o valor de ΔG (desdobrado→ dobrado), mais estável o estado dobrado. A energia livre de ativação do processo de desdobra é a diferença de energia livre entre o estado desdobrado e o estado de transição de desdobra (Steipe, 1999).

15 Polipeptídeos de CocE mutante com termoestabilidade aumentada podem ser desenhados e gerados por vários métodos conhecidos na técnica que incluem, por exemplo, desenho racional, evolução direcionada (por exemplo, mutagênese aleatória, mutagênese do organismo hospedeiro de CocE), ou
20 uma combinação desses. A evolução direta pode ser realizada através de mutação e recombinação seguida por rastreamento pelo traço desejado ou por aplicação de uma pressão seletiva para obter o traço de interesse (veja, por exemplo, Lehmann and Wyss, 2001). Mutagênese podem ser
25 realizada no gene específico de interesse ou através de mutagênese e seleção de um organismo hospedeiro de modo que a propriedade construída seja conferida à proteína de interesse. Preferivelmente, as termoestabilidades de CocE mutante são construídas através de uma abordagem de três
30 pontas de (i) desenho racional através de mutagênese

direcionada a sítio guiada por computação (veja, por exemplo, Exemplo 3; Exemplo 4), (ii) mutagênese aleatória do gene de CocE e rastreamento de alto rendimento (veja, por exemplo, Exemplo 4; Exemplo 15); e (iii) mutagênese do organismo hospedeiro de CocE seguida por seleção genética (veja, por exemplo, Exemplo 14).

Vários conceitos de desenho racional são conhecidos por aqueles habilitados na técnica para realizar a diminuição de ΔG (desdobrado \rightarrow dobrado) e/ou aumento da energia livre de ativação do processo de desdobra (veja, por exemplo, Lehmann, 2001). Por exemplo, uma pessoa pode: diminuir a entropia do estado desdobrado por introdução de pontes adicionais de dissulfeto pi por mutações X \rightarrow Pro; aumento da tendência de α -hélice por substituições Gly \rightarrow Ala ou por estabilização de macrodipolos de α -hélice; melhorar interações eletrostáticas entre resíduos de superfície carregados por introdução de pontes de sal adicionais ou mesmo redes de ponte de sal, ou por mutações de termoestabilização com base nos cálculos de potenciais eletrostáticos.

A modelagem molecular, com base em simulações de dinâmica molecular adequada (MD), pode guiar racionalmente a mutagênese direcionada a sítio de modo a desenhar polipeptídeos de CocE mutante que possuam termoestabilidade aumentada. A simulação clássica de MD permite o estudo de evolução de tempo de um grande sistema tomando várias pequenas etapas de tempo sucessivas sob forças atômicas determinadas por um conjunto de funções de interação parametrizadas (campo de força), incluindo interações em ponte (ligações, ângulos, e ângulos diedros), interações de

van der Waals não ligadas, e cargas com base em interações eletrostáticas ou atômicas net. Devido à forma simples do campo de força, a simulação de MD pode ser realizada por um tempo de simulação suficientemente longo para gerar propriedades medianas em conjunto significativas, mesmo para um sistema muito grande que envolve outras centenas de milhares de átomos. Portanto, para CocE e cada mutante proposto, a simulação de MD pode levar a uma estrutura 3D razoável, dinamicamente mediana do polipeptídeo simulado em água.

Uma abordagem usada de forma bem sucedida nessa concentra-se no desenho racional de mutações de termoestabilização que diminuem o valor de ΔG (desdobrado \rightarrow dobrado) do polipeptídeo (veja, por exemplo, Exemplo 3). Tal abordagem requer apenas o cálculo de ΔG (desdobrado \rightarrow dobrado), sem realização de uma computação que demanda tempo na estrutura e energética do estado de transição da desdobra. Portanto, para aumentar a termoestabilidade de um polipeptídeo antes da peguilação, uma pessoa pode usar um método implementado em um programa de desenho racional (por exemplo, RosettaDesign) que usa uma função de energia para avaliação da adequação de uma seqüência particular para uma dada dobra e um algoritmo de pesquisa de Monte Carlo para amostragem de espaço de seqüência. Tal abordagem é conhecida para produzir termoestabilidade aumentada de outras enzimas sem redução na eficiência catalítica (veja, por exemplo, Korkegian, 2005). Por exemplo, a dobra usada na computação pode corresponder àquela da estrutura disponível em cristal de raios X de CocE.

O programa de desenho racional permite a previsão de

:
:
: um conjunto de seqüências de aminoácidos modificadas que têm potencialmente energias menores (por exemplo, os valores de ΔG (desdobrado \rightarrow dobrado)) e, portanto, maior termoestabilidade. Assim, uma pessoa pode usar o desenho
5 computacional aqui descrito para prever mutações no núcleo do polipeptídeo de CocE que possam levar a termoestabilização do polipeptídeo sem perda da eficiência catalítica. Essa abordagem minimiza o tempo de teste experimental e aumenta muito o sucesso dos resultados
10 experimentais. As mutações de termoestabilização previstas podem ser testadas individualmente por mutagênese direcionada a sítio e então em combinação, em um processo iterativo (veja, por exemplo, Exemplo 15).

Evolução direcionada também pode ser usada para gerar
15 mutantes de CocE termoestáveis. Evolução direcionada engloba uma série de técnicas experimentais que produzem diversidade acelerada e adaptação através de mutação e recombinação seguida por rastreamento pelo traço desejado ou por aplicação de uma pressão seletiva para obter o traço
20 de interesse (Lehmann & Wyss (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12, 371-375). Portanto, evolução direcionada envolve tanto um processo para gerar diversidade quanto um rastreamento eficiente ou método de seleção para a detecção ou enriquecimento do traço desejado. Evolução direcionada
25 foi previamente aplicada de forma bem-sucedida à produção de proteínas termoestáveis, e a geração de diversidade foi atingida através, por exemplo, de PCR propensa a erro, mutagênese de saturação, embaralhamento de DNA, mutagênese química, e combinações desses. PCR propensa a erro
30 amplifica o gene de interesse com polimerases não

proofreading e condições de estresse desenhadas para gerar aleatoriamente mutações únicas de par de base. Depois de cada ciclo os melhores mutantes são selecionados e usados como seqüências parentes no próximo ciclo de mutagênese.

5 Essa técnica tem sido usada para gerar inúmeras variantes de proteína termoestável, incluindo propil endopeptidase (Uchiyama ma., e cols. 2000), betaglicuronidase (Flores, H. and A. D. Ellington (2002) *Journal of Molecular Biology* 315, 325-337) e xilanases de família 10 (Andrews e cols.

10 (2004) *J Biol Chem* 279, 54369-79). Mutagênese por saturação também amplifica o gene de interesse mas incorpora bases universais durante a amplificação para gerar um número muito maior de mutações. Essa técnica tem sido usada para gerar termoestabilidade em uma enzima psicrofílica

15 (Miyazaki e cols. (2000) *Journal of Molecular Biology* 297, 1015-1026). Embaralhamento de DNA envolve um ou mais ciclos de recombinação entre um conjunto de seqüências homólogas para obter melhores variantes de uma dada enzima. Essa técnica também pode ser usada *in tandem* com PCR propensa a

20 erro, em que os melhores mutantes obtidos por PCR propensa a erro são combinados por embaralhamento de DNA para gerar um novo subconjunto de mutantes. Embaralhamento de DNA tem sido implementado para gerar variantes termoestáveis de beta-glicuronidase (Flores, H. and A.D. Ellington (2002)

25 *Journal of Molecular Biology* 315, 325- 337). Mutagênese química envolve o tratamento de DNA de plasmídeo com agentes químicos que introduzem mutações em ponto na seqüência como hidroxilamina, nitrosaminas ou dimetil sulfato. O tratamento de plasmídeo com hidroxilamina tem

30 sido usado para gerar mutantes termoestáveis de beta-

:
:
: glicosidase A de *Bacillus polymyxa* (Lopez-Camacho e cols. (1996) *Biochemistry Journal* 314, 833- 838) e luciferase de vagalume (White e cols. (1996) *Biochemistry Journal* 319 (Pt 2), 343-350).

5 Mutagênese do organismo hospedeiro de CocE também pode ser usada para gerar mutantes de CocE termoestáveis. Um método simples e rápido para a produção de variantes de CocE termoestáveis podem ser atingidas por utilização da capacidade da enzima de conferir metabolismo de cocaína
10 como a única fonte de carbono e seu organismo hospedeiro. O gene de CocE foi originalmente seqüenciado a partir de *Rhodococcus* MB1 por subclonagem de fragmentos do gene em *Rhodococcus erythropolis* CW25, uma bactéria incapaz de metabolizar cocaína mas capaz de crescer nos subprodutos de
15 esterase de cocaína, éster metílico de ecgonina e benzoato (Bresler e cols. (2000) *Applied & Environmental Microbiology* 66, 904-908). Um outro organismo que mostrou previamente metabolizar subprodutos da cocaína é
20 *Pseudomonas fluorescens* (MBER), que foi capaz de crescer em uma relação simbiótica com uma outra bactéria capaz de metabolizar cocaína por meio da esterase *Comamonas acidovorans* (MBLF).

Embora de difícil transformação com plasmídeos em altas eficiências, essas cepas bacterianas podem ser
25 transformadas de forma relativamente fácil com o gene de CocE nativo clonado em vetores adequados e então mutagênese bacteriana tradicional podem ser realizada (veja, por exemplo, Exemplo 14). Pelo fato de essa bactéria crescer normalmente apenas a 25-30°C em produtos da hidrólise de
30 cocaína, a seleção por mutantes capazes de metabolizar a

cocaína de modo eficaz a 37°C pode selecionar mutante de CocE altamente ativos que são estáveis a 37°C.

A exposição das bactérias a radiação ou agentes químicos para a produção de mutantes que portam novos fenótipos é bem conhecida na técnica (veja, por exemplo, Maron, D.M. and Ames, BN (1983) Mutation Research 113, 173-215). Mutagênese por irradiação por envolver radiação de ionização e não ionização; no entanto, radiação de não ionização é a amplamente usada, e radiação de UV a 260 nm é mais eficaz como um agente letal. A mutagênese é causada pela indução de dímeros de pirimidina, aumento da probabilidade de incorporação de descombinações durante a replicação. As células são expostas a radiação UV em uma dose predeterminada para matar 90-95% da população de células, e mutantes são então buscados entre os sobreviventes. A mutagênese química inclui o uso de análogos de base como 5-bromouracil e 2-aminopurina que aumenta o erro de cópia durante a replicação, ou o uso de agentes que reagem diretamente com DNA como hidroxilamina ou nitrosoguanidina que induz mutações em uma frequência maior que os análogos de base.

Geração de polipeptídeos de CocE mutante

Modalidades da invenção também pertencem aos métodos de produção dos polipeptídeos de CocE mutante. Por exemplo, uma célula hospedeira transfectada com um vetor de ácido nucleico que direciona expressão de uma seqüência de nucleotídeos que codifica os polipeptídeos de CocE mutante pode ser cultivada sob condições adequadas para permitir que ocorra a expressão do peptídeo. As células podem ser coletadas, lisadas, e a proteína isolada. Um polipeptídeo

de CocE mutante pode ser isolado de células hospedeiras com o uso de técnicas conhecidas na prática para purificação de proteínas que incluem cromatografia de troca iônica, cromatografia de filtração de gel, ultrafiltração, eletroforese, e purificação por imunoafinidade com anticorpos específicos para tal proteína (veja, por exemplo, Exemplo 1).

Por exemplo, depois de um polipeptídeo de CocE mutante ter sido expresso em uma célula, ele pode ser isolado com o uso de qualquer cromatografia por imunoafinidade. Mais especificamente, um anticorpo anti-CocE pode ser imobilizado em uma matriz de cromatografia em coluna, e a matriz pode ser usada para cromatografia por imunoafinidade para purificar o polipeptídeo de CocE mutante de lisados de células por métodos padrão (veja, por exemplo, Sambrook and Russel (2006) Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0879697717;). Depois de cromatografia por imunoafinidade, o polipeptídeo de CocE mutante pode ser também purificado por outras técnicas padrão, por exemplo, cromatografia líquida de alta performance. Em uma outra modalidade, um polipeptídeo de CocE mutante é expresso como uma proteína de fusão que contém um rótulo de afinidade (por exemplo, Hisx6) que facilita sua purificação (veja, por exemplo, Exemplo 1).

Peguição de polipeptídeos de CocE mutante

A CocE mutante pode ser peguilada de modo a aumentar a duração de ação e estabilidade ao calor, e diminuir a imunogenicidade. A peguição também pode melhorar a termoestabilidade da CocE mutante da invenção e aumentar a

meia-vida sérica por diminuição do clearance renal, proteólise, absorção de macrófago, e resposta imunológica.

A peguilação é o processo de anexação de unidades repetição de etileno glicol (ou seja, polietileno glicol, ou PEG) a um polipeptídeo para reduzir a imunogenicidade do polipeptídeo e sua taxa de clearance renal (veja, geralmente (Veronese, FM and Harris, JM (2002b) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 457-606, Veronese, FM and Harris, JM (2002c) *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 1259-1345, reviewing PEGylation technology). Cada unidade de etileno glicol pode se ligar a duas ou três moléculas d água, que aumenta de modo eficaz o tamanho do peptídeo, e pode proteger o peptídeo de respostas imunes, degradação enzimática, e/ou rápido clearance renal. O polietileno glicol também pode estabilizar contra mudanças na temperatura e pH. O resultado é que o polipeptídeo terapêutico pode ser mantido por mais tempo no sangue, e induz uma menor resposta imune (Harris, JM and Chess, RB (2003) *Nature Reviews. Drug Discovery* 2, 214-221). PEG possui um conjunto único de propriedades, incluindo ausência de toxicidade, antigenicidade, e imunogenicidade, uma diminuição dependente de massa do clearance renal, e uma alta flexibilidade e solubilidade em água. Ele transmite essas características às proteínas às quais ele é ligado (Veronese, FM and Harris, JM (2002b) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 457-606).

Um polímero de PEG pode ser primeiramente ativado com um grupo funcional que encoraja ligação covalente a um aminoácido da proteína. o grupo hidroxil terminal do PEG pode ser modificado por um carbonato ativo, éster ativo,

aldeído ou derivado de tresilato. O PEG pode ser anexado a lisinas ou a resíduos de cisteína introduzidos da CocE mutante. Unidades de repetição de óxido de etileno podem ser construídas em várias configurações que têm diferentes
5 comprimentos, com ou sem ramificação, e com vários pesos moleculares. Meios de incorporação podem incluir mutagênese direcionada a sítio ou uso de derivados de maleimida de transglutaminase.

PEG é aprovado pelo FDA para uso como um veículo ou
10 base em fármacos, incluindo formulações injetáveis, tópicas, retais e nasais (Harris and Chess, 2003). E drogas peguiladas foram aprovadas para uso clínico (veja, por exemplo, PEG-interferon alfa-2a (Hamidi, M and Tajerzadeh, H (2003) Drug Delivery 10, 9-20; PEG-interferon alfa-2b
15 (Reddy e cols. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 571-586).

Devido à mobilidade dinâmica espacial não paralela de PEG, a modificação da superfície de uma CocE mutante pelo polímero de PEG pode defender a enzima revestida de ações
20 pelas enzimas proteolíticas e reconhecimento pelo sistema imune; assim reduzindo a imunogenicidade e prolongando a meia-vida circulante da CocE mutante peguilada. O sucesso das estratégias de peguilação inclui lipossomos modificados por PEG, ou seja, lipossomos de reserva, assim denominados
25 devido a sua capacidade de desviar da detecção imune e clearance renal para gerar um tempo de circulação significativamente estendido (Lasic, DD (1997) Journal of Controlled Release 48, 203-222), bem como asparaginase peguilada cuja meia-vida *in vivo* foi drasticamente
30 melhorada de 26 horas observadas para asparaginase livre

para 15 dias (Avramis e cols. (2002) Blood 99, 1986-1994). Além disso, é reconhecido na técnica que a peguilação pode melhorar significativamente a estabilidade térmica de uma enzima (Kazan, D. and Erarslan, A. (1997) Applied Biochemistry & Biotechnology 62, 1-13; Efremova e cols. (1998) Biochemistry (Moscow) 63, 441-447) e reduzir a ativação do sistema de complemento (Chang e cols. (2005) Bioconjugate Chemistry 16, 147-155). Portanto, a tecnologia de peguilação é vem adequada para melhorar os efeitos farmacológicos e farmacêuticos da CocE mutante da invenção (veja, por exemplo, Exemplo 11). Peguilação de CocE mutante também pode ser usada junto com a encapsulação de RBC.

Encapsulação de CocE mutante em RBC

A CocE mutante pode ser encapsulada em hemáceas (RBC) de modo a aumentar a duração da ação e estabilidade ao calor, e diminuir a imunogenicidade. A cocaína cruza rapidamente a barreira hematencefálica, também transita rapidamente a membrana plasmática das hemáceas, e essa absorção foi demonstrada em um estudo de administração intravenosa de cocaína em homens (Javaid e cols. (1978) Journal of Chromatography 15, 105-113). Além disso, as concentrações de cocaína em hemáceas excede as concentrações no plasma (Javaid e cols. (1978) Journal of Chromatography 15, 105-113). Como tal, a encapsulacao em hemáceas pode ser utilizada para proteger formas termoestáveis de CocE do clearance.

Eritrócitos têm sido explorados extensivamente por suas aplicações potenciais como veículos de drogas (Wang e cols. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). Sendo as células mais abundantes do corpo humano, as

hemáceas oferecem vantagens únicas para funcionar como um veículo de drogas. Primeiramente, os eritrócitos são completamente biocompatíveis e biodegradáveis, particularmente quando as células autólogas são usadas para
5 carga de droga. Em adição, o formato de disco bicôncavo dos eritrócitos fornece a maior superfície para a proporção de volume ($1,9 \times 10^4$ cm/g) (Guyton, AG & Hall, JE (1996) Textbook of Medical Physiology, 425-433) usável para encapsulação de drogas. A encapsulação em hemáceas também
10 evita a inativação da droga carregada por fatores endógenos bem como protege os organismos dos efeitos tóxicos da droga encapsulada (Wang e cols. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). Além disso, a encapsulação em hemáceas evita as respostas imunes indesejáveis (ou seja,
15 antigenicidade e imunogenicidade) que possam ser ativadas por corpos estranhos (Wang e cols. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). E, os eritrócitos possuem meia-vida de circulação mais longa em comparação a outros veículos sintéticos. Por exemplo, a expectativa de vida
20 normal de um eritrócito na circulação sistêmica é relatada como sendo cerca de 120 dias (Guyton, AG & Hall, JE (1996) Textbook of Medical Physiology, 425-433).

A encapsulação de CocE mutante em eritrócitos pode ser de acordo com várias técnicas conhecidas na prática,
25 incluindo eletroporação, endocitose induzida por drogas (por exemplo, primaquina), e osmose (veja, por exemplo, Green, R. and Widder, KJ (1987) Methods In Enzymology, Vol. 149). Esses métodos podem incluir inchaço e rompimento da membrana celular, liberando o conteúdo interior incluindo
30 primariamente hemoglobina e também citoesqueleto,

aprisionando a droga, e então re-selagem da membrana para gerar a hemácea de forma em taça esférica, de cor rosa ou branca (geralmente denominada "hemaácea-fantasma").

Alternativamente, peptídeos que penetram a membrana
5 podem ser empregados para encapsular CocE mutante em eritrócitos (veja, por exemplo, Exemplo 12). Os peptídeos que penetram a membrana, ou peptídeos de domínio de transdução de proteína (PTD) são uma família de pequenos peptídeos (normalmente consiste em 10-15 resíduos de
10 aminoácidos) incluindo TAT, LMWP, e outros peptídeos catiônicos ricos em arginina (veja, Dietz, GPH and Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131). É conhecido na técnica que, por ligação covalente de PTD a quase qualquer tipo de espécies moleculares incluindo
15 proteínas (peso molecular >150 kDa; mais de 60 diferentes proteínas já foram testadas (Dietz, GPH and Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131) e nano-veículos (por exemplo lipossomos), PTD pode transportar as espécies anexadas através da membrana celular de todos os tipos de
20 órgãos incluindo o cérebro (Schwarze e cols. (1999) Science 285, 1569-1572). PTD não é tóxico nem imunogênico (Schwarze e cols. (1999) Science 285, 1569-1572), e a internalização celular mediada por PTD não induz a perturbação ou alteração da membrana celular dos eritrócitos (Suzuki e
25 cols. (2002) Journal of Biological Chemistry 25, 2437-2443). PTD tem sido usado de modo bem-sucedido em hemáceas de carga de proteína, e resulta em eritrócitos com atributos físicos e químicos inalterados (veja, por exemplo, Li e cols. (2003) American Pharmaceutical Review
30 6, 22-26). Portanto, a conjugação do peptídeo PTD a CocE

mutante pode facilitar a encapsulação em hemáceas. A encapsulação em hemáceas também pode ser realizada pelo uso de CocE mutante peguilada.

Estabilização de CocE mutante

5 Um outro aspecto da invenção é direcionado à estabilização de polipeptídeos de CocE mutante com o uso de substratos, produtos, e/ou inibidores de cocaína. Substratos e produtos úteis nas modalidades aqui reveladas incluem, por exemplo, mas não são limitados a, cocaína; 10 derivados de cocaína, como, por exemplo, (-)-cocaína, (+)-cocaína, tropococaína, e outros; derivados de tio-cocaína, como, por exemplo, Tiol-1, Tiol-2, e outros; derivados de amida-cocaína; derivados de provitamina-cocaína, como PABA cocaína, Niacina cocaína, e outros; ácido benzóico; 4- 15 nitrofenil acetato (4NPA); 4-nitrofenol (4NP); e outros. Inibidores de exemplo incluem, sem limitação, análogos de substrato, como, fosfo-fluorcocaína, O-Fosfo-cocaína, O-metilfosfococaína, S-Metilfosfococaína, e outros; análogos de produto, como, Ecgonina e derivados de Ecgonina, como, 20 análogo de éster metílico de ácido ecogonina borônico; ácido fenilborônico; derivados de ácido benzóico, como, ácido 4-terc-Butil benzóico, ácido 1-Naftóico, éster metílico de ácido 2,3,4-trimetil- benzóico, e outros. Agentes químicos adicionais incluem, por exemplo, sem 25 limitação, SDS, glicerol, PEG, e outros.

Preferivelmente, os substratos, produtos, e/ou inibidores estabilizam a desnaturação térmica dos polipeptídeos aqui revelados. Em algumas modalidades, os substratos, produtos e/ou inibidores também evitam a 30 agregação termicamente induzida em eletroforese de gel.

Geralmente, o uso de um substrato, produto, e/ou inibidor resulta em pelo menos cerca de a 10% de aumento na estabilidade e/ou inibição, respectivamente. Por exemplo o aumento pode ser de cerca de 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 5 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 120%, 150%, 200%, 300%, ou mesmo 500% ou maior. Portanto, substratos, produtos, e/ou inibidores são bem adequados para estabilizar os polipeptídeos de CocE mutante aqui revelados (veja, por exemplo, Exemplo 20).

10 Em uma modalidade, pequenas moléculas são usadas para termoestabilizar os polipeptídeos de CocE mutante aqui revelados. Em uma modalidade preferida, tais moléculas não ocupam o sítio ativo do polipeptídeo.

Em algumas modalidades, os polipeptídeos aqui 15 revelados podem ser co-infundidos com uma molécula de estabilização. Em outras modalidades, as moléculas de estabilização podem ser usadas para estabilizar o polipeptídeo durante a manufatura. Ainda em outras modalidades, as moléculas de estabilização podem ser usadas 20 para estabilizar os polipeptídeos de CocE mutante até estarem prontos para uso.

Métodos de tratamento

Um outro aspecto da invenção é direcionado à abordagem de degradação catalítica para terapêuticos anticocaína. São 25 fornecidos tratamentos, profiláticos e terapêuticos, de condições induzidas por cocaína através da administração de polipeptídeos de CocE mutante termoestáveis, ativos em esterase a um indivíduo que necessita. As variantes de esterase de cocaína da invenção têm um valor clínico 30 significativo por causa de sua termoestabilidade aumentada

e maior meia-vida plasmática que a CocE conhecida de ocorrência natural. É esse aumento na termoestabilidade e meia-vida plasmática que permite uma resposta muito mais rápida aos sintomas que ameaçam a vida da toxicidade por cocaína que coloca as variantes de CocE da invenção separadas de outras opções de tratamento.

Uma determinação da necessidade por tratamento será tipicamente avaliada por uma história e exame físico consistentes com a condição induzida por cocaína. Condições induzidas por cocaína incluem, sem limitação, overdose de cocaína, toxicidade por cocaína, e dependência à cocaína e/ou vício. Por exemplo, o diagnóstico de toxicidade por cocaína pode incluir convulsões, convulsões tipo grande mal, ataque cardíaco, infarto do miocárdio, arritmias cardíacas, pressão arterial aumentada, AVC, psicose induzida por drogas, aneurisma dissecante, e demanda miocárdica aumentada de oxigênio. Como um outro exemplo, no caso de dependência à cocaína e/ou vício, os sintomas de retirada incluem sensações subjetivas de disforia leve a severa, depressão, ansiedade, ou irritabilidade. Indivíduos com uma necessidade identificada de terapia incluem aqueles com uma condição induzida por cocaína diagnóstica, uma indicação de uma condição induzida por cocaína, e indivíduos que foram tratados, estão sendo tratados, ou serão tratados para uma condição induzida por cocaína. O indivíduo é preferivelmente um animal, incluindo, sem limitação, mamíferos, répteis, e aves, mais preferivelmente cavalos, vacas, cães, gatos, carneiros, porcos, e galinhas, e mais preferivelmente humanos.

Uma quantidade eficaz dos polipeptídeos de CocE

mutante aqui descritos é geralmente aquele que pode reduzir a toxicidade por cocaína ou a severidade de uma condição induzida por cocaína. A redução na severidade inclui, por exemplo, uma interrupção ou uma diminuição nos sintomas, indicadores fisiológicos, marcadores bioquímicos, ou indicadores metabólicos. Quando usada nos métodos de invenção, a quantidade terapeuticamente eficaz de polipeptídeo de CocE mutante aqui descrito pode ser empregada em forma pura ou, quando tais formas existirem, em forma de sal farmacologicamente aceitável e com ou sem um excipiente farmacologicamente aceitável. Por exemplo, os polipeptídeos de CocE mutante da invenção podem ser administrados em uma proporção risco/benefício razoável aplicável a qualquer tratamento médico, em uma quantidade suficiente para reduzir substancialmente a concentração de cocaína no sangue e/ou tecidos do indivíduo.

A toxicidade e eficácia terapêutica dos polipeptídeos de CocE mutante podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas de células e/ou animais experimentais para a determinação da LD50 (a dose letal para 50% da população) e a ED50, (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A proporção de dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico que pode ser expresso como a proporção LD50/ED50, em que grandes índices terapêuticos são preferidos.

A quantidade de polipeptídeo de CocE mutado que pode ser combinada com um veículo farmacologicamente aceitável para produzir uma forma de dosagem única irá variar dependendo do hospedeiro tratado e do modo particular de administração. Deve ser percebido por aqueles habilitados

na técnica que o conteúdo unitário de agente contido em uma dose individual de cada forma de dosagem não precisa em si constituir uma quantidade terapeuticamente eficaz, uma vez que a quantidade terapeuticamente eficaz necessária pode ser atingida pela administração de inúmeras doses individuais. A administração do agente pode ocorrer como um evento único ou pela duração do tempo de tratamento. Por exemplo, um agente pode ser administrado diariamente, semanalmente, a cada duas semanas, ou mensalmente. Para algumas condições, o tratamento pode ser estendido de várias semanas a vários meses ou mesmo um ano ou mais.

O nível de dose específica terapeuticamente eficaz para qualquer indivíduo em particular será depende de uma variedade de fatores incluindo a condição induzida por cocaína sendo tratada e da severidade da condição induzida por cocaína; atividade do polipeptídeo de CocE mutante empregado; a composição específica empregada; da idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do paciente; do tempo de administração; da via de administração; da meia-vida plasmática do polipeptídeo de CocE mutante; da taxa de excreção do polipeptídeo de CocE mutante empregado; da duração do tratamento; drogas usadas em combinação ou coincidência com o polipeptídeo de CocE mutante empregado; e fatores semelhantes bem conhecidos em medicina (veja, por exemplo, Koda-Kimble e cols. (2004) Applied Therapeutics: The Clinical Use de Drugs, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781748453; Winter (2003) Basic Clinical Pharmacokinetics, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781741475; Shame! (2004) Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, McGraw-Hill/Appleton & Lange, ISBN

0071375503). Será entendido por um profissional que o uso diário total do polipeptídeo de CocE mutante para uso nas modalidades da invenção aqui reveladas será decidido pelo profissional médico dentro do escopo de julgamento médico seguro.

Os polipeptídeos de CocE mutante aqui descritos também podem ser usados em combinação com outras modalidades terapêuticas. Portanto, em adição às terapias aqui descritas, pode-se fornecer outras terapias ao indivíduo conhecidas como sendo eficazes para condições induzidas por cocaína particulares.

Os polipeptídeos de CocE mutante aqui descritos podem ser formulados por qualquer maneira convencional com o uso de um ou mais veículos e/ou excipientes farmacologicamente aceitáveis (veja, por exemplo, Gennaro (2005) Remington the Science and Practice of Pharmacy 21st ed. Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781746736). Tais formulações terão uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipeptídeo de CocE mutante, preferivelmente em forma purificada, JUNTO COM Uma quantidade adequada de veículo de modo a fornecer a forma para administração adequada ao indivíduo. A formulação deve ser conveniente ao modo de administração. Polipeptídeos de CocE mutante de uso com a atual invenção podem ser formulados por métodos conhecidos para administração a um indivíduo que usa várias vias que incluem, sem limitação, parenteral, pulmonar, oral, tópica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, epidural, oftálmica, bucal, e retal. O polipeptídeo de CocE mutante também pode ser administrado em combinação com um ou mais agentes

adicionais aqui revelados e/ou junto com outros agentes biologicamente ativos ou biologicamente inertes. Tais agentes biologicamente ativos ou inertes podem estar em comunicação de fluido ou mecânica com o agente ou anexado ao agente(s) por força iônica, covalente, Van der Waals, hidrofóbica, hidrofílica ou outras forças físicas.

Polipeptídeos de CocE mutante aqui descritos podem ser administrados por via parenteral, incluindo injeções intravenosa, intramuscular, subcutânea, e intraperitoneal.

Excipientes, comumente usados na liberação parenteral de pequenas moléculas de medicamento, incluindo intensificadores de solubilidade, agentes osmóticos, tampões, e conservantes, também podem ser incluídos em formulações de biomolécula. A inclusão de agentes anti-agregação e anti-adsorção, como tensoativos e albumina, quando da formulação e liberação de biomoléculas pode adicionar estabilidade aumentada e diminuir o risco de interação da biomolécula ativa com uma interface, que pode levar à desdobra, agregação, e/ou precipitação. O polipeptídeo de CocE mutante pode ser liofilizado para melhor estabilidade durante a estocagem, e re-processado antes da administração parenteral.

Preferivelmente, o polipeptídeo de CocE mutante é peguulado, assim fornecendo estabilidade aumentada e imunogenicidade diminuída (veja acima).

A liberação pulmonar de macromoléculas, como polipeptídeos de CocE mutante, fornece uma administração relativamente fácil, não invasiva ao sistema circulatório para distribuição sistêmica (veja, por exemplo, Cryan (2004) AAPS J. 7(1) artigo 4, E20-41, que fornece uma

revisão de tecnologia de liberação pulmonar). As vantagens da liberação pulmonar incluem não invasividade, grande área de superfície para absorção (~75 m²), epitélio alveolar fino (~0,1 a 0,5 µm) que permite rápida absorção, ausência de metabolismo de primeira passagem, atividade proteolítica diminuída, rápido surgimento de ação, e alta biodisponibilidade. Vários dispositivos de liberação por inalação, como inaladores de dose medida, nebulizadores, e inaladores de pó seco, que podem ser usados para liberar as biomoléculas aqui descritas são conhecidos na técnica (por exemplo, AErx (Aradigm, CA); Respimat (Boehringer, Germany); AeroDose (Aerogen Inc., CA)). Dispositivos de inalação de pó seco são particularmente preferidos para liberação pulmonar de agentes com base em proteína (por exemplo, Spinhaler (Fisons Pharmaceuticals, NY); Rotohaler (GSK, NC); Diskhaler (GSK, NC); Spiros (Dura Pharmaceuticals, CA); Nektar (Nektar Pharmaceuticals, CA)).

Preparações de liberação controlada (ou de liberação sustentada) podem ser formuladas para estender a atividade do polipeptídeo de CocE mutante e reduzir a frequência de dosagem. Preparações de liberação controlada também podem ser usadas para efetuar o momento do surgimento da ação ou outras características, como níveis sanguíneos do agente, e conseqüentemente afetar a ocorrência de efeitos colaterais. Preparações de liberação controlada podem ser desenhadas para liberar inicialmente uma quantidade of polipeptídeo de CocE mutante que produz o efeito terapêutico desejado, e gradualmente e continuamente libera outras quantidades para manter o nível de efeito terapêutico por um período de tempo estendido. Para manter um nível quase constante de

polipeptídeo de CocE mutante no corpo, o agente pode ser liberado a partir da forma de dosagem em uma taxa que substituirá a quantidade de agente sendo metabolizada e/ou excretada do corpo. A liberação controlada de um agente
5 pode ser estimulada por vários indutores, por exemplo, mudança no pH, mudança na temperatura, enzimas, água, ou outras condições fisiológicas ou moléculas.

Sistemas de liberação controlada podem incluir, por exemplo, uma bomba de infusão que pode ser usada para
10 administrar o agente em uma maneira similar àquela usada para liberar insulina ou quimioterapia a órgãos específicos ou tumores. Os agentes da invenção podem ser administrados por outros meios de liberação controlada ou dispositivos de liberação que são bem conhecidos por aqueles de habilidade
15 comum na técnica, incluindo, por exemplo, hidropilmetil celulose, outras matrizes poliméricas, géis, membranas permeáveis, sistemas osmóticos, depósitos, revestimentos de multicamadas, micropartículas, lipossomos, microesferas, ou outros, ou uma combinação de qualquer um dos acima para
20 fornecer o perfil de liberação desejado em proporções variáveis. Outros métodos de liberação controlada de agentes serão bem conhecidos do profissional habilitado e estão dentro do escopo da invenção.

Polipeptídeos de CocE mutante podem ser encapsulados e
25 administrados em uma variedade de sistemas de liberação de veículo. Sistemas com base em veículo para liberação de agente biomolecular podem: fornecer liberação intracelular; adaptar taxas de liberação de biomolécula/agente; aumentar a proporção de biomolécula que atinge seu local de ação;
30 melhorar o transporte da droga a seu local de ação;

permitir o depósito localizado com outros agentes ou excipientes; melhorar a estabilidade do agente *in vivo*; prolongar o tempo de residência do agente em seu local de ação por redução do clearance; diminuir a liberação não específica do agente a tecidos não visados; diminuir a irritação causada pelo agente; diminuir a toxicidade devido a doses iniciais altas do agente; alterar a imunogenicidade do agente; diminuir a frequência da dosagem, melhorar o sabor do produto; e/ou melhorar a vida-útil do produto.

Exemplos de sistemas de liberação de veículo para polipeptídeos de CocE mutante aqui descritos incluem microesferas (veja, por exemplo, Varde & Pack (2004) *Expert Opin. Biol.* 4(1) 35-51), hidrogéis (veja, de modo geral, Sakiyama e cols. (2001) *FASEB J.* 15, 1300-1302), implantes poliméricos (veja, de modo geral, Teng et al (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3024-3029), veículos poliméricos *smart* (veja, de modo geral, Stayton e cols. (2005) *Orthod Craniofacial Res* 8, 219-225; Wu e cols. (2005) *Nature Biotech* (2005) 23(9), 1137-1146), e lipossomos (veja, por exemplo, Galovic e cols. (2002) *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 441-448; Wagner e cols. (2002) *J. Liposome Res.* 12, 259-270). Preferivelmente, o polipeptídeo de CocE mutante é encapsulado em hemáceas (veja acima; Exemplo 12).

25 **Métodos de rastreamento**

Um outro aspecto da invenção é direcionado a métodos de rastreamento para a geração, identificação, e purificação de polipeptídeos de CocE mutante termoestáveis. Geralmente, polipeptídeos de CocE mutante podem ser inicialmente desenhados de acordo com as abordagens acima

descritas. Tais polipeptídeos desenhados podem ser então rastreados para características preferidas, como retenção de eficiência hidrolítica, termoestabilidade aumentada, meia-vida plasmática aumentada, e/ou antigenicidade reduzida. Também, polipeptídeos de CocE mutante aleatórios podem ser rastreados para as características desejadas.

Métodos de detecção para rastrear mutantes termoestáveis englobam uma ampla variedade de técnicas. A seguir está um resumo de exemplo de um protocolo genérico.

10 Ácido nucleico que codifica os polipeptídeos de CocE mutante (gerados, por exemplo, através de desenho racional, mutagênese aleatória, ou mutagênese de hospedeiro) é transformado em um hospedeiro de expressão adequado (por exemplo, células de *E. coli* como *E. coli* BL21 Gold
15 (Stratagene)), e a expressão do polipeptídeo mutante é induzida de acordo com protocolos padrão (por exemplo, por IPTG). A expressão é realizada em temperaturas para produzir expressão ótima da proteína (por exemplo, 16°C para CocE, veja, por exemplo, Exemplo 1) por um período de
20 tempo predeterminado (por exemplo, de 30 minutos a 24 horas ou mais). Alternativamente, a expressão é realizada em uma temperatura elevada (por exemplo, a temperatura elevada pode ser pelo menos cerca de 35°C, pelo menos cerca de 36°C, pelo menos cerca de 37°C, pelo menos cerca de 38°C,
25 pelo menos cerca de 39°C, pelo menos cerca de 40°C, ou ainda maior). Preferivelmente, a temperatura elevada em que polipeptídeo de CocE mutado é expresso é 37°C. Por volta dessa temperatura, o polipeptídeo de CocE de tipo selvagem divide-se quase exclusivamente em corpos de inclusão.
30 Células que contêm os polipeptídeos mutantes expressos são

rastreadas para a presença de variantes termoestáveis de CocE.

Rastreamento para a presença de variantes termoestáveis de CocE geralmente envolve a medição direta em células cultivadas, em lisados de células, ou após rompimento celular e isolamento do polipeptídeo de CocE mutante. O rompimento celular pode incluir choque osmótico, lise química, sonificação, e/ou homogeneização, e a isolamento do polipeptídeo mutante pode ser obtida através de numerosos métodos que incluem absorção direta a uma matriz ou absorção por afinidade através do uso de anticorpos anticocaína ou sistemas de captura específicos de proteína de fusão. Matriz adequada para absorção inclui papel de nitrocelulose, filtros, placas de microtítulo não tratadas ou tratadas por afinidade, resinas de agarose ou sefarose, e/ou pontas revestidas por afinidade.

A atividade de esterase das células cultivadas ou polipeptídeo mutante isolado pode ser subsequente medida em uma ou mais temperaturas para determinar a termoestabilidade dos mutantes. A temperatura em que o ensaio de atividade é realizado determina o grau de detecção de termoestabilidade. Portanto, embora os mutantes finais tenham preferivelmente a temperatura de fusão de 45°C ou maior (como determinado, por exemplo, por dicroísmo circular), freqüentemente, o rastreamento inicial a 45°C não encontrará enzimas ativas. Ao contrário, vários ciclos de mutagênese e rastreamento em temperaturas subsequentemente crescentes podem ser realizados para atingir mutantes termoestáveis. Assim, o rastreamento inicial pode ser realizado a 30°C, e depois de ciclos de

mutagênese adicionais, rastreamento pode ser realizado com temperaturas crescentes (por exemplo, 34°C, 37°C, 40°C, 42,5°C, 45°C etc.), até que um mutante de termoestabilidade adequada seja atingido. Os aumentos da temperatura são
5 determinados empiricamente durante o procedimento, e são afetados pelo número de acertos em temperaturas particulares e a T_m determinada dos mutantes gerados.

Embora sob nenhuma obrigação de assim o fazer, e não desejando estar atado por teoria, aqui se segue o que
10 acredita-se ser uma explicação mecanicista da fusão de várias modalidades de polipeptídeos de CocE mutante aqui descritos. Os dados de espectro CD ilustram que a fusão CD de esterase de cocaína e mutantes é irreversível, uma vez que o resfriamento a 0 grau não restaura o espectro
15 original (veja, por exemplo, Exemplo 19). Embora parâmetros termodinâmicos não possam ser verificados, o espectro de CD pode ser usado para determinar comparativamente se os mutantes são mais ou menos estáveis, se eles têm diferentes estruturas secundárias ou propriedades de agregação.
20 Acredita-se que os polipeptídeos de CocE aqui descritos se fundam por meio de uma etapa intermediária, ou seja, os polipeptídeos passam por um processo de fusão de 2 etapas.

A detecção da atividade de esterase pode ser realizada com o uso de uma variedade de métodos, em que substratos
25 são ligados a um sistema de detecção específico. Substratos adequados para uso na determinação da atividade de esterase podem incluir cocaína, cocaína tritiada (^3H), derivados de substrato de cocaína como um derivado de tio cocaína (veja, por exemplo, Figura 6), e/ou substratos que têm atividade
30 de esterase geral como 4-nitrofenil acetato. O sistema de

detecção pode ser diretamente ligado ao substrato, por exemplo: a clivagem cocaína não modificada pode ser detectada por monitoração de mudanças na absorvência da cocaína a 240 nm (veja, por exemplo, Exemplo 4), ou por 5 monitoramento de mudanças do pH que resultem do acúmulo do produto ácido de ácido benzóico (veja, por exemplo, Exemplo 15), ou através do uso de aptâmeros de cocaína (veja, por exemplo, Stojanovic, M. N., de Prada, P. & Landry, D. W. (2001) J Am Chem Soc 123, 4928-4931; Stojanovic, M. N. & 10 Landry, D. W. (2002) J Am Chem Soc 124, 9678-9679) por monitoramento de mudanças na fluorescência após degradação de cocaína (veja o exemplo 15); clivagem de cocaína tritiada (³H) pode ser detectada por acidificação e detecção de produto de ácido benzóico tritiado através de 15 separação por cromatografia (veja os exemplos 1 e 15); clivagem de derivados de cocaína como tio-cocaína pode ser monitorada pela detecção de grupos sulfidril reativos, através da adição de reagente de Ellman e determinação de mudanças de absorvência a 412 nm (veja, por exemplo, 20 Exemplo 15), ou pela adição e visualização de sulfidril em precipitação que reage com metais pesados; clivagem de 4-nitrofenil acetato pode ser detectada por monitoramento de mudanças na absorvência a 420 nm (veja, por exemplo, Halgasova, N. e cols. (1994) Biochem J 298 Pt 3, 751-755; 25 O'Conner, C.J. & Manuel, R.D. (1993) J Dairy Sci. 76, 3674-3682).

Polipeptídeos de CocE mutante identificados através dos procedimentos acima, ou um ensaio similar de alto rendimento, podem ser também avaliados com o uso de 30 procedimentos *in vitro* aqui descritos (por exemplo, valores

de Kcat e Km, estabilidade a 37°C, temperatura de fusão (Tm), níveis de endotoxina, capacidade de degradar cocaína em plasma). Polipeptídeos de CocE mutante com atividade de esterase termoestável e/ou imunogenicidade reduzida, podem ser também avaliados com o uso de procedimentos *in vivo* aqui descritos (por exemplo, potência, duração de ação, efeitos com dosagem repetida, e/ou avaliação imunológica). Preferivelmente, a diminuição na magnitude dos polipeptídeos de CocE mutante de toxicidade por cocaína é examinada primeiramente (veja, por exemplo, Exemplos 5, 7, e 8), e aqueles mutantes que reduzem a toxicidade em pelo menos cerca de 5-10 vezes podem ser também avaliados para duração da ação (veja, por exemplo, Exemplo 6). Polipeptídeos de CocE mutante candidatos podem ser também estabilizados, por exemplo, por peguilação e/ou encapsulação em hemáceas e re-avaliados nos procedimentos acima descritos.

Tendo descrito a invenção em detalhes, estará aparente que modificações, variações, e modalidades equivalentes são possíveis sem fugir do escopo da invenção definida das reivindicações em apêndice. Além disso, deve-se perceber que todos os exemplos na presente revelação são fornecidos como exemplos não limitantes.

EXEMPLOS

Os exemplos não limitantes a seguir são fornecidos para também ilustrar várias modalidades da invenção aqui reveladas. Deve ser percebido por aqueles habilitados na técnica que as técnicas reveladas nos exemplos que se seguem representam abordagens que os inventores acreditam funcionar bem na prática da invenção, e assim podem ser

consideradas como exemplos de modos para sua prática. No entanto, aqueles habilitados na técnica devem, em vista da presente revelação, perceber que várias mudanças podem ser feitas nas modalidades específicas que são reveladas e
5 ainda obter um resultado parecido ou similar sem fugir do espírito e escopo da invenção.

Exemplo 1: Expressão de CocE

Um método para expressão e purificação de CocE foi estabelecido, em que CocE é expressa em *E. Coli* como uma
10 proteína de fusão com um terminal carboxil Hisx6-tag. O gene de esterase de cocaína foi subclonado no vetor de expressão de *E. coli* pET-22b(+) e altos níveis de enzima esterase de cocaína contendo um rótulo de histidina C-terminal foram induzidos após a adição de IPTG a 23°C. A
15 proteína recombinante acumulou a aproximadamente 10-15% da proteína total. CocE foi enriquecida em uma coluna de cobalto-quelato (Talon™ Clontech) ou uma coluna de agarose níquel-quelato (Pierce) em virtude do rótulo Hisx6. A proteína eluída era aproximadamente 95% pura por SDS-PAGE e
20 coloração de azul Coomassie, e foi subsequenteemente resolvida por cromatografia de troca iônica em coluna FPLC (Q-Sepharose) usando um gradiente de NaCl. A proteína eluiu como um único pico e era aproximadamente 99% pura, como indexado por SDS-PAGE e coloração de azul Coomassie (veja,
25 por exemplo, Figura 3).

A atividade da enzima foi determinada através de dois ensaios: um ensaio de atividade de radioligante em que cocaína tritiada foi hidrolisada e então após acidificação, o produto de ácido benzóico foi tritiado a partir de
30 cloridrato de cocaína tritiada por cromatografia; e um

ensaio espectrofotométrico sob condições similares como descrito por Turner e cols. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307. O espectro único de absorção de cocaína (coeficiente de extinção 6,7 L/mmol/cm, a 240 nm) permite a observação de cocaína remanescente após a clivagem enzimática. As taxas lineares iniciais de deterioração da cocaína, que representam velocidade, foram determinadas em um leitor de placa SpectraMax 190 (Molecular Devices) usando SOFTmax Pro software (v1.13). A reação foi iniciada pela adição de 150 μ L de uma solução 2x enzima aos 150 μ L de uma solução 2x cocaína. As concentrações finais de CocE variaram de 100 ng/mL a 20 ng/mL. As concentrações finais de cocaína eram como se segue: 250, 126, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81, 3,91, and 1,95 μ M. Para a cinética de todas as enzimas, o tampão foi solução salina tamponada por fosfato, pH 7,4. As taxas iniciais foram ajustadas à equação de Michaelis-Menten, com k_{cat} e K_m como parâmetros ajustáveis (GraphPad; PRISM, v4).

Como determinado como o uso do ensaio espectrofotométrico de cocaína, o polipeptídeo de CocE de tipo selvagem purificado hidrolisa cocaína com uma K_{cat} de aprox. 500 min^{-1} e uma K_m de aprox. 2 μ M, eu é consistente com valores relatados previamente (veja, por exemplo, Turner e cols. 2000).

Tais procedimentos de expressão podem ser utilizados para os polipeptídeos de CocE mutante aqui descritos.

Exemplo 2: Atividade plasmática ex vivo de CocE

A determinação ex vivo dos níveis de cocaína após esterase de cocaína foi examinada em plasma humano (banco de sangue do hospital da Universidade de Michigan). Cocaína foi obtida do "The National Institute of Drug Abuse"

(Bethesda, MD, USA). Cocaína foi dissolvida em água estéril. Alíquotas (3 ml) de plasma humano foram mantidas a 37°C em um banho de água por 10 minutos antes do início e pela duração do experimento. Após equilibrar o plasma em
5 banho de água, a cocaína foi adicionada a uma concentração final de 300 µM e rotacionada por 30 segundos. As amostras de plasma foram removidas e colocadas em um tubo de microcentrífuga contendo o padrão interno e uma solução de fluoreto de sódio saturada para evitar metabolismo
10 adicional da cocaína. Imediatamente após tomar a primeira amostra do plasma (cocaína isoladamente), 0,05 mg/ml de CocE ou veículo de CocE foi adicionado e rotacionado. As amostras de plasma foram coletadas a 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 45, 60, e 120 minutos após a adição de CocE. Níveis de
15 cocaína foram medidos com o uso de espectrometria de massa tandem de cromatografia líquida de alta performance.

Cromatografia líquida foi realizada com a utilização de um sistema Surveyor HPLC (ThermoElectron Corp., Franklin, MA) com uma bomba quaternária e *autosampler*
20 configurado com uma alça de injeção de 10 µl. A separação foi realizada com o uso de uma coluna Phenomex C18 3 µm 30 x 4,6 mm com coluna guardiã correspondente (Waters Corp., Milford, MA) em uma taxa de fluxo de 600 µL/min. Solvente A consistiu em uma solução de ácido fórmico a 0,1%, e
25 solvente B era ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila (alto grau de pureza; Burdick and Jackson, Muskegon, MI). Um gradiente balístico de 3 minuto foi usado com cocaína e a co-eluição interna padrão a 2,3 min.

Para a detecção e quantificação por espectrometria de
30 massa, um espectrômetro de massa de quatro pólos triplo

Finnigan TSQ Quantum Ultra AM equipado com uma fonte de ionização de eletrospray IonMax (ThermoElectron Corp., Franklin, MA) foi usado em íon positivo, modo de monitoramento de reação selecionada. Nitrogênio serviu como o gás nebulizante e argônio como o gás de colisão. As taxas de fluxo de gás, voltagens de spray, e energias de colisão foram otimizadas. Curvas de calibragem foram determinadas para cocaína com 50 nM cocaína deuterada (cocaína D₃) como o padrão interno em amostras de plasma não tratadas. Amostradas desconhecidas foram também receberam cocaína D₃. todas as amostras foram avaliadas em triplicata. As curvas padrão e desconhecidas foram analisadas por programa Quan Browser em programa Xcalibur versão 1.4 (ThermoElectron Corp., Franklin, MA). As curvas calibragem foram construídas com o uso de regressão linear da proporção da área de pico da cocaína/área de padrão interno como uma função da concentração padrão com um fator de peso de 1/x. Os valores adequados de curva padrão foram aceitos em um valor que é maior que 0,99, e os valores de RSD para amostras em réplica estão entre 0-10%.

Os resultados demonstram que CocE é capaz de degradar cocaína muito rapidamente quando as duas são misturadas brevemente em plasma humano (veja, por exemplo, Figura 4). O primeiro ponto de tempo indica a concentração de cocaína antes da adição de esterase de cocaína ou veículo de esterase. Antes do tratamento com esterase, os níveis de cocaína foram similares, mas em 1 minuto de administração de esterase de cocaína, os níveis de cocaína foram diminuídos em pelo menos 100 vezes a aproximadamente 2 µM quando comparados com a amostra de plasma tratada com

veículo. Os níveis de cocaína continuaram a diminuir nas amostras de plasma tratada com esterase, caindo abaixo de 1 microM por volta do 2° minuto.

A eficiência terapêutica da enzima foi demonstrada pela dose crescente de cocaína necessária para produzir efeitos tóxicos após uma única injeção intravenosa de CocE. A enzima de tipo selvagem demonstrou rápida cinética para a degradação de cocaína *ex vivo* em soro de rato e humano. Dois mutantes inativos de CocE falharam em proteger os ratos dos efeitos tóxicos da cocaína, confirmando que os efeitos protetores são devidos à atividade hidrolítica. Além disso, CocE não mudou a letalidade de WIN-35065-2, um análogo da cocaína que é desprovido da porção de éster de benzoila direcionado por CocE. A caracterização *in vivo* e *ex vivo* de CocE sustenta o papel da enzima como um antídoto adequado para toxicidade em humanos.

Exemplo 3: CocE mutante termoestável prevista

Desenho racional de CocE mutante aqui descrita foi baseado em simulações de dinâmica molecular (MD). Um modelo computacional de CocE foi construído com o uso da estrutura de CocE de tipo selvagem em cristal publicada (veja, por exemplo, Figura 2). Tais modelos podem ser usados para identificar certas modificações de aminoácido que aumentam a temperatura de fusão teórica da proteína sem romper a estrutura no sítio ativo. Simulação clássica de MD permite o estudo de evolução de tempo de sistema grande tomando várias pequenas etapas de tempo sucessivas sob forças atômicas determinadas por um conjunto de funções de interação parametrizadas (campo de força), incluindo interações ligadas (ligações, ângulos, e ângulos diedros),

interações de van der Waals não ligadas, e cargas com base em interações eletrostáticas ou atômicas net. Devido à forma simples do campo de força, a simulação de MD pode ser realizada por um tempo de simulação suficientemente longo para gerar propriedades medianas em conjunto significativas, mesmo para um sistema muito grande que envolve outras centenas de milhares de átomos. Portanto, para CocE e cada mutante proposto, a simulação de MD pode levar a uma estrutura 3D razoável, dinamicamente mediana do polipeptídeo simulado em água.

Com base na estrutura em cristal de raios X (PDB código 1JU3) da esterase de cocaína bacteriana (CocE) (Larson e cols. (2002) Nature 9, 17), um modelo em 3D completo de ligação de CocE com (-)-cocaína adequado para modelagem computacional de sua estabilidade termodinâmica foi construído. Para aumentar a termoestabilidade de CocE, um método computacional foi implementado em programa RosettaDesign (Kuhlman and Baker (2000) PNAS 97, 10383) capaz de prever mutações de termoestabilização em uma dada dobra enquanto minimiza qualquer torção na estrutura que pode romper estruturalmente a estrutura do sítio ativo ou extinguir sua flexibilidade. O método implementado no programa RosettaDesign usa um função de energia para avaliação da adequação de uma seqüência em particular para uma dada dobra e um algoritmo de pesquisa Monte Carlo para amostragem do espaço da seqüência. Um método similar foi usado de forma bem sucedida por outros pesquisadores para aumentar a termoestabilidade de uma enzima sem redução na eficiência catalítica (Korkegian e cols. (2005) Science 308, 857). As cargas atômicas parciais para os átomos de

resíduo não padrão foram calculadas pelo uso do protocolo padrão RESP implementado no módulo de Antecâmara do pacote de programa Amber7 (ou 8) (Case, 2002). A modelagem computacional que usa o programa RosettaDesign permitiu a
5 previsão de um conjunto de mutações de CocE calculadas como tendo uma menor energia e, portanto, termoestabilidade aumentada (veja, por exemplo, Tabela 2). Para esse exemplo, a computação considerou apenas as mutações possíveis nos resíduos de aminoácidos que têm uma distância entre 6-25 Å
10 da molécula de substrato de cocaína.

Polipeptídeos de CocE de mutação única identificados calculados para estabilizar CocE em cerca de 2,1 a cerca de 4,5 kcal/mol incluíam: L163V (Id. de Seq. N°: 3); V121D (Id. de Seq. N°: 4); S167A (Id. de Seq. N°: 5); Q123E (Id. de Seq. N°: 6); V225I (Id. de Seq. N°: 7); I218L (Id. de Seq. N°: 8); A310D (Id. de Seq. N°: 9); A149S (Id. de Seq. N°: 10); S159A (Id. de Seq. N°: 11); S265A (Id. de Seq. N°: 12); S56G (Id. de Seq. N°: 13); W220A (Id. de Seq. N°: 14); T122A (Id. de Seq. N°: 15); S140A (Id. de Seq. N°: 16);
20 F189L (Id. de Seq. N°: 17); A193D (Id. de Seq. N°: 18); T254R (Id. de Seq. N°: 19); N42V (Id. de Seq. N°: 20); V262L (Id. de Seq. N°: 21); L508G (Id. de Seq. N°: 22); Y152H (Id. de Seq. N°: 23); V160A (Id. de Seq. N°: 24); T172R (Id. de Seq. N°: 25); Y532F (Id. de Seq. N°: 26);
25 T74S (Id. de Seq. N°: 27); W285T (Id. de Seq. N°: 28); L146P (Id. de Seq. N°: 29); D533S (Id. de Seq. N°: 30); A194R (Id. de Seq. N°: 31); G173Q (Id. de Seq. N°: 32); C477T (Id. de Seq. N°: 33); K531A (Id. de Seq. N°: 34); R41I (Id. de Seq. N°: 35); L119A (Id. de Seq. N°: 36); K46A (Id. de Seq. N°: 37); e F84Y (Id. de Seq. N°: 38).

Tabela 2: Sumário de modelagem computacional com o uso do programa RosettaDesign com abordagem de consenso

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Mutação de consenso	Mudança de energia (kcal/mol)
163	163	163	163	163	163	163	163	163	163	L163V	-4,5
121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	V121D	-3,9
167	167	167	167	167	167	167	167	167	167	S167A	-3,9
123	123	123	123	123	123	123	123	123	123	Q123E	-3,8
225	310	310	225	225	225	225	310	225	218	V225I	-3,6
218	225	218	218	218	218	218	225	218	225	I218L	-3,5
310	218	225	310	310	310	310	218	310	152	A310D	-3,4
149	149	152	149	149	149	149	149	149	310	A149S	-3,3
159	159	140	159	159	159	159	159	159	149	S159A	-3,3
189	265	149	265	265	265	265	265	189	265	S265A	-3,3
265	140	265	56	56	56	56	220	265	159	S56G	-3,2
56	220	159	220	220	220	220	122	56	220	W220A	-3,2
220	122	220	122	122	122	122	140	220	56	T122A	-3,1
122	189	122	140	140	140	140	189	122	122	S140A	-3,1
140	193	189	189	189	189	189	193	140	140	F189L	-3,1
254	42	193	193	193	193	193	42	254	189	A193D	-3,1
262	262	42	254	254	254	254	254	42	193	T254R	-3,1
508	508	262	42	42	42	42	262	262	262	N42V	-3,0
152	152	508	262	262	262	262	508	508	508	V262L	-3,0
160	160	198	508	508	508	508	152	152	198	L508G	-2,9
74	198	160	152	152	152	152	160	160	254	Y152H	-2,9
172	74	74	160	160	160	160	198	198	74	V160A	-2,8
193	172	172	198	198	74	198	74	172	160	T172R	-2,8

532	532	532	532	74	172	74	172	74	172	Y532F	-2,7
146	146	56	74	172	532	172	532	193	532	T74S	-2,7
285	285	285	172	532	146	532	146	532	285	W285T	-2,6
533	290	146	285	146	285	146	285	285	290	L146P	-2,6
173	254	533	146	285	533	285	533	146	146		
194	533	173	533	533	173	533	173	533	533	D533S	-2,5
477	56	194	173	194	194	173	194	173	173	A194R	-2,4
531	173	200	194	200	290	194	200	194	194	G173Q	-2,4
42	194	477	200	290	477	200	290	200	200	C477T	-2,4
119	200	531	290	477	531	477	477	290	477	K531A	-2,4
200	477	305	477	531	200	531	531	477	531		
41	531	41	41	41	41	41	41	531	42	R41I	-2,2
46	41	119	119	119	119	119	119	41	119	L119A	-2,2
84	119	46	46	173	46	46	46	119	41	K46A	-2,1
305	46	84	84	46	84	84	56	46	46	F84Y	-2,1
478	57	158	478	84	478	305	84	84	57		
57	84	307	57	478	57	478	307	478	84		
87	478	478	142	57	87	57	478	57	158		
142	87	57	263	87	142	87	57	142	478		
263	142	142	307	142	263	142	142	263	142		
307	263	263	78	263	307	263	263	307	263		
78	307	78	257	307	78	307	78	78	78		
257	78	257	531	48	257	78	257	257	257		
290	257	290	49	78	49	257	49	49	49		
291	201	49	201	257	305	201	201	201	201		
49	49	201	305	45	291	290	412	305	307		
176	291	291	412	49	176	291	291	412	291		
45	305	412	291	201	45	49	176	291	176		
54	176	176	176	305	54	176	45	45	305		

406	45	254	45	291	406	45	413	176	45		
50	54	45	413	176	50	54	54	413	54		
	406	54	54	54		406	305	54	406		
	50	413	50	406		50	406	406	50		
		406	406	50			50	50			
		50									

Exemplo 4: parâmetros cinéticos de CocE mutante T172R e S159A

CocE de tipo selvagem e os polipeptídeos de CocE mutante T172R e S159A foram testados para eficiência catalítica.

Mutagênese direcionada a sítio (QuickChange™, Invitrogen) de CocE foi realizada para gerar o polipeptídeo de CocE mutante S159A (Id. de Seq. N°: 11). Técnicas de clonagem e expressão usadas para produzir S159A foram as mesmas que no Exemplo 1, exceto quando indicado em contrário. O gene de CocE foi amplificado através de Reação em cadeia de Polimerase (PCR) na presença de iniciadores que contêm a mutação específica necessária (Integrated DNA Technologies, Inc.). A mutação específica foi subclonada de volta no plasmídeo de expressão e a seqüência de nucleotídeos desses plasmídeos determinada para verificar a presença da mutação.

Mutante T172R foi gerado por sobreposição de PCR com o uso dos iniciadores 5' e 3' contendo a mutação T172R específica, bem como um sítio de enzima de restrição adicional Sac II para facilitar a detecção do gene mutado. Pares de iniciadores CocE 20-5'F-Nde I (5' GATATACATATGGTGGACGGGAATTAC 3') e T172R3'R (5' CAGACCTCGACGTGATGAGCCCGCGGCCTATGAGAGCTGACCAGC 3') bem como

CocE-1800-3'R (5' GTGGTGCTCGAGTCGCTTGATAATCG 3') e T172R-5'F (5' GCTGGTCAGCTCTCATAGGCCGCGGGCTCATCACGTCGAGGTCTG 3') foram amplificados por PCR com o uso da enzima de alta fidelidade Pfu (Stratagene) com uma temperatura de anelamento de 55°C. Os produtos resultantes de PCR foram combinados e re-amplificados, gerando um gene de CocE de comprimento total que codifica a mutação T172R. O gene foi digerido com Nde I e Xho I; subclonado no vetor de expressão, e seqüenciado em sua totalidade para verificar a presença da mutação e a ausência de mutações de erro adicionais de cópia de PCR.

Plasmídeos que contêm as mutações foram transformados em células de *E. coli* BL21 e enzima induzida por IPTG foi purificada em Ni-Agarose. As proteínas expressas foram então testadas para atividade enzimática e para termoestabilidade a 37°C. A atividade da enzima foi medida com o uso do ensaio espectrofotométrico como descrito no Exemplo 1. A termoestabilidade foi também testada por meio do ensaio espectrofotométrico por pré-incubação de tipo selvagem e mutante a 37°C por várias vezes. Adicionalmente, a natureza da termo-instabilidade de T172R de tipo selvagem e mutante foi analisada por eletroforese de gel de poliacrilamida gel sob condições de desnaturação e não desnaturação. Resumidamente, enzima mutante e de tipo selvagem 0,1 mg/ml foram incubadas a 37°C por vários pontos de tempo, resfriadas a 4°C, misturadas com corante SDSLoading contendo 8-mercaptoetanol e passadas em gel de SDS-PAGE 10% (condições de desnaturação) ou passadas em géis de poliacrilamida nativa 10% (condições de não desnaturação) a 4°C. Os géis foram fixados com 10% metanol,

7% ácido acético por 30 minutos, e então corados com corante em gel de proteína Sypro-Ruby (Molecular Probes, Invitrogen) por 3 horas. A coloração da proteína foi visualizada sob luz UV com o uso de Alphamager™ 3400 (Alpha Innotech). Finalmente, a temperatura de fusão exata de T172R de tipo selvagem e mutante foi determinada por dicróismo circular com o uso de um espectropolarímetro JASCO-810 dirigido por um programa de análise JASCO V500/FP-750 para Windows. Os espectros de CD foram medidos em miligraus e normalizados contra tampão PBS.

Os resultados do ensaio espectrofotométrico mostraram que T172R tinha uma V_{max} e K_m aumentadas em temperatura ambiente e uma V_{max} e K_m muito aumentadas a 37°C quando comparadas a CocE de tipo selvagem (veja, por exemplo, Tabela 3; Figura 5). De fato, a V_{max} e K_m de T172R a 37°C foi comparável à V_{max} e K_m de CocE de tipo selvagem em temperatura ambiente. A CocE mutante S159A mostrou uma V_{max} e K_m levemente aumentadas a 37°C, mas uma V_{max} e K_m diminuídas em temperatura ambiente, quando comparadas a CocE de tipo selvagem. Eletroforese sob condições de desnaturação (Figura 6a) indicou uma banda única de proteína para T172R e de tipo selvagem de aproximadamente 6.5000 Da, sem levar em consideração a temperatura da incubação, indicando que a degradação proteolítica não descreve adequadamente o mecanismo para a termoinstabilidade. Os géis não desnaturados (Figura 6b) mostraram uma banda única de proteína para a enzima de tipo selvagem antes da a 37°C, no entanto após incubação a 37°C espécies de maior peso molecular são observadas à medida que a banda original desaparece. Esses agregados de

proteína supostos também podem ser observados para o mutante T172R, no entanto o tempo para agregação sob incubação a 37°C é maior, e nesse procedimento o mutante T172R foi aproximado para ter uma meia-vida 8 vezes maior a 37°C que o tipo selvagem. A análise da temperatura de fusão da proteína por dicroísmo circular (Figura 7) indicou que as mudanças sensíveis à temperatura na estrutura terciária da proteína ocorreram na faixa próxima de UV do espectro (entre 260 nm e 320 nm). O ajuste da curva de mudanças sensíveis à temperatura nessa região do espectro indicou que a CocE de tipo selvagem tem uma temperatura de fusão de 36,15°C, com desnaturação detectável iniciando em aproximadamente 30°C. O mutante T172R foi determinado para ter uma temperatura de fusão de 41,43°C, com desnaturação detectável iniciando em aproximadamente 28°C. Portanto a mudança de aminoácido único de Tirosina para Arginina no Aminoácido 172, com um aumento estimado de 2,8 kCa/mol na termoestabilidade, foi determinada como tendo uma temperatura de fusão aumentada em 5 graus comparada à CocE de tipo selvagem.

Tabela 3: parâmetros cinéticos para T172R, S159A, e CocE de tipo selvagem.

	S159A	S159A (40 min @ 37°C)	T172R	T172R (40 min @ 37°C)	CocE de tipo selv.	CocE de tipo selv. (40 min@ 37°C)
Vmax	876,6	130,7	1466	1267	1264	94,06
Km	43,65	15,69	88,20	78,80	71,81	12,30

Exemplo 5: prevenção por CocE de tipo selvagem in vivo de letalidade por cocaína em ratos

Para determinar a atividade esterática de CocE *in vivo*, um modelo de toxicidade aguda por cocaína em roedor foi implementado. Quando tratado com altas doses de cocaína, os ratos primeiramente exibiram convulsões seguidas por cessação da respiração e movimento. A menor dose tóxica de cocaína, quando administrada por via intraperitoneal, produzirá fatalidade em 15 minutos de tratamento.

A proteção contra letalidade induzida por cocaína por CocE de tipo selvagem foi determinada e comparada aos efeitos protetores de BchE humana. A atividade esterática de CocE foi estabelecida por avaliação da atividade de duas enzimas mutantes, cada uma desprovida de três aminoácidos no sítio ativo. Adicionalmente, a atividade de uma enzima de tipo selvagem modificada por uma modificação covalente de Ser17 no sítio ativo, por fenilmetil sulfonato fluoreto (PMSF) foi determinada. A degradação estérica de cocaína foi mostrada como sendo o mecanismo de efeitos protetores da CocE por verificação de se a enzima protegeu contra toxicidade induzida por WIN 35065-2 (Madras e cols. (1989) *J Pharmacol Exp Ther* 251, 13 -141), um análogo de cocaína que é desprovido da ponte de éster no sítio proposto de hidrólise enzimática.

Machos de ratos Sprague-Dawley (300 gramas) (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) foram abrigados em grupos de três por gaiola. Após implante cirúrgico de um cateter na jugular, todos os ratos foram abrigados individualmente até o término do experimento. Os ratos foram mantidos em um ciclo de 12-h de luz/escuridão, com as luzes ligadas às 7:30 a.m. e alimento e água eram disponíveis *ad libitum*.

Depois dos ratos serem anestesiados com cloridrato de quetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.), os cateteres intravenosos (tubo Micro-renetano, 15 cm, MRE-040, Braintree Scientific Inc., Braintree, MA) foram implantados na veia jugular direita. Aproximadamente 3 cm do cateter foram inseridos na veia; o tubo restante foi passado por via subcutânea ao dorso, em que ele saía de uma incisão entre os ombros. O tubo exposto foi coberto com um pedaço de 1 cm de aço inoxidável (0,28 de diâmetro, Small Parts Inc., Miami, FL). Os cateteres foram aspergidos diariamente com 0,5 ml de solução salina heparinizada (50 U/ml) para manter a patência do cateter. Após a cirurgia, os ratos foram deixados por uma semana em recuperação. Cada rato foi usado para um único experimento, e todos os grupos experimentais consistiram em 6-8 ratos.

Para determinar a menor dose eficaz de CocE que bloqueou as convulsões induzidas por cocaína e morte, 0,1, 0,32, ou 1,0 mg de CocE ou veículo (solução salina tamponada por fosfato, PBS) foi administrada por via intravenosa um minuto após 180 mg/kg de cocaína (i.p.). Para determinar os limites catalíticos de CocE, doses crescentes de cocaína foram administradas (100, 560, 1000 mg/kg, i.p.) um minuto antes de 1,0 mg de CocE (i.v.). CocE mutantes e bloqueadas por PMSF foram administradas (1 mg, i.v.) um minuto antes de 180 mg/kg de cocaína (i.p.). CocE (1,0 mg, i.v.) foi também administrada um minuto após a menor dose de WIN-35065-2 (560 mg/kg, i.p.). CocE (1,0 mg, i.v.) foi dada antes e depois da cocaína (100 mg/kg, i.p.) para determinar a meia-vida *in vivo* da esterase. Todas as injeções intravenosas foram seguidas por um fluxo de

solução salina heparinizada (0,5 ml). Após o tratamento, os ratos foram observados para convulsão e morte. O número de episódios de convulsão, duração de cada episódio, e tipo de convulsão foram registrados. A morte foi definida como a
5 cessação de movimento observado e respiração. O percentual de animais em cada grupo experimental que exibe convulsões e letalidade foram calculados. A média de erro padrão percentual foi então calculada para cada ponto de dado.

Os resultados mostraram que, no modelo de roedor de
10 toxicidade aguda, a dose dependente de cocaína induziu convulsões e morte em ratos; a morte foi observada em menos que 15 minutos após a administração em 100% dos animais que receberam 100 mg/kg cocaína (veja, por exemplo, Figura 9). CocE (1,0 mg) infundida após a administração de cocaína
15 produziu uma mudança de dez vezes na curva de efeito de dose sobre a toxicidade da cocaína (veja, por exemplo, Figura 9), de modo que 1.000 mg/kg de cocaína foram necessários para superar as propriedades protetoras, catalíticas de CocE. Esse regime de tratamento é muito
20 similar a situações de toxicidade humana, quando o antídoto para overdose é dado apenas após a cocaína ter sido ingerida, inalada, ou injetada.

CocE de tipo selvagem mostrou eficiência catalítica superior sobre BchE humana. Dada um minuto antes de 180
25 mg/kg de cocaína, 1 mg de CocE ofereceu 100% de proteção contra a letalidade induzida por cocaína (veja, por exemplo, Figura 10), enquanto uma dose equivalente molar de 10 vezes de BChE humana (13 mg) não ofereceu proteção, similar a uma dose dez vezes menor de CocE (0,1 mg) (veja,
30 por exemplo, Figura 10).

Ambas mutações de CocE (Ser117Ala ou Tyr44Phe) são desprovidas de atividade *in vivo* e, portanto, não tiveram efeitos protetores (Figura 11 b). Além disso, enzima tratada com PMSF também eliminou o efeito protetor de CocE
5 contra cocaína (Figura 11 b). Adicionalmente, o efeito letal do análogo não hidrolisável de cocaína g, WIN 35065-2, não foi superado pelo tratamento com CocE (Figura 12). Com base em estudos de proteção *in vivo* realizados com preparações cataliticamente inativadas da enzima (mutantes
10 tratados com PMSF e inativos de CocE), é claro que os efeitos protetores da enzima são devidos a sua capacidade de hidrolisar cocaína. Juntos, esses dados estão de acordo com as avaliações *in vitro* da atividade esterática de CocE e confirmam o mecanismo de proteção da enzima contra a
15 letalidade induzida por cocaína *in vivo*.

Exemplo 6: efeitos dependentes de tempo da CocE de tipo selvagem

Os efeitos da administração de CocE de tipo selvagem antes da dosagem de cocaína foi examinado. O modelo de
20 toxicidade de rato foi como descrito no Exemplo 5. CocE de tipo selvagem foi administrada 100, 30, 10, 3, e 1 minuto antes e 1 e 6 minutos após a administração de cocaína. Extrações de composto de amostras de plasma humano foram realizadas em 100% acetonitrila (3x volume), incubadas por
25 aproximadamente 15 minutos, centrifugadas a 13.000 rpm por 4,5 min, e o sobrenadante resultante foi coletado. Os extratos foram concentrados em um Savant Speed Vac (ThermoElectron Corp., Franklin, MA) para remover a acetonitrila. As amostras extraídas foram reconstituídas em
30 água e também diluídas 10-1000 vezes.

Amostras de plasma humano receberam 300 μ M cocaína e foram mantidas a 37°C. Uma alíquota de plasma foi retirada antes da adição de esterase de cocaína ou veículo de esterase, e uma outra alíquota foi coletada 1 minuto após a administração da esterase. Alíquotas de plasma foram misturadas imediatamente com o padrão interno (cocaína-D3) e uma solução saturada de fluoreto de sódio para prevenir metabolismo adicional de cocaína. As extrações de tecido foram realizadas e os níveis de cocaína e padrão interno foram quantificadas por HPLC com espectrometria de massa tandem.

Para inativação dependente de tempo de CocE *in vitro*, enzima CocE purificada (a 250 ng/ml) foi incubada em tampão de ensaio na ausência de cocaína a 37°C por vários tempos. Após incubação a 37°C as amostras foram colocadas em gelo. Para avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade de CocE, amostras foram incubadas com (-) cocaína em várias concentrações como indicado em uma concentração final da enzima de 125 ng/ml. A taxa de deterioração da (-)-cocaína a A240 foi medida em um leitor de multiplaca. Os dados foram ajustados a uma deterioração exponencial única com o uso de KaleidagraphTM (Synergy software) gerando um $t_{1/2}$ de 13,2.

Constatou-se que CocE de tipo selvagem tem efeitos protetores dependentes de tempo; 100% dos ratos foram salvos quando tratados com CocE (1 mg) 1 minuto antes da cocaína, enquanto apenas 66% e 32% dos ratos sobreviveram quando tratados com CocE 30 e 1 minuto antes da cocaína, respectivamente (veja, por exemplo, Figura 14). Os efeitos protetores da CocE foram eliminados quando os ratos foram

tratados 100 minutos antes da cocaína. Esse efeito dependentes de tempo é mais provavelmente devido à desativação térmica da enzima *in vivo*. Em plasma de rato, CocE tem uma meia-vida marcadamente curta (cerca de 10 minutos, Figura 13), mais provavelmente devido à sensibilidade a mudanças no pH e temperatura. Adicionalmente, dados preliminares *in vitro* com a enzima purificada sugerem que CocE sofre uma inativação dependente de temperatura com um $t_{1/2}$ de aproximadamente 15 minutos a 10 37°C.

Com esses dados, pode-se afirmar que uma dose de 1 mg de CocE administrada 30 minutos antes da cocaína, deteriorará aproximadamente 3 meias-vidas, deixando 0,25 mg da enzima de tipo selvagem na circulação geral quando a 15 cocaína for administrada.

Estudos prévios sugeriram que as concentrações sangüíneas letais de cocaína no rato variam entre 50-128 μM (Mets B and Virag L (1995) *Anesth Analg* 81, 1033-1038; Mets e cols. (1999) *Life Sci* 65, 1317-1328), e níveis plasmáticos d'épico de cocaína ocorrem cerca de 13 minutos após uma 20 injeção intraperitoneal (Sun e cols. (2002) *J Pharmacol Exp Ther* 302, 710-716). Com base na cinética relatada de administração intraperitoneal de cocaína (Sun e cols. (2002) *J Pharmacol Exp Ther* 302, 710-716), estima-se que 25 100 e 320 mg/kg de cocaína geraram concentração sangüínea de pico de cocaína de 35 μM e 113 μM , respectivamente. As concentrações letais da cocaína são de uma magnitude similar em humanos (20-200 μM) (Finkle BS and McCloskey KL (1978) *J Forensic Sci* 23, 173-189; Wetli and Wright (1979) 30 *J Am Med Assoc* 241, 2519-2522). Uma vez que 1 mg de CocE de

tipo selvagem salvou ratos tratados com essas doses de cocaína (Figura 9), pode ser justificável prever que a enzima pode proteger contra toxicidade por cocaína em humanos. Além disso, níveis de cocaína medidos com o uso de espectrometria de massa andem de cromatografia líquida de alta performance em plasma humano com 300 μM cocaína, uma concentração que excede os níveis tóxicos relatados da cocaína, e então tratados com CocE (um equivalente molar de nossa dose *in vivo* de 1,0 mg), reduziu a concentração de cocaína a aproximadamente 2 μM em menos que um minuto (Figura 10).

Proteção contra uma dose LD50 de cocaína em ratos requer um tratamento de 10 mg/kg de BChE (Lynch e cols. (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 145, 363-371), assumindo que a enzima seja distribuída de modo similar em humanos, uma pessoa de 70 kg deve requerer uma dose de 700 mg de BChE exógena para proteger contra uma overdose. Além disso, não há evidência de que BChE possa agir para reverter a toxicidade por cocaína quando administrada após a cocaína, uma característica necessária de um antídoto para toxicidade por cocaína.

É assim demonstrado que uma dose de 1 mg CocE de tipo selvagem em um rato de 300 gramas é suficiente para proteger contra uma dose de cocaína que exceda a LD100 (Figura 9). Adicionalmente, a enzima dada antes, e mais importante, até 6 minutos após a dose LD100 de cocaína, forneceu proteção da toxicidade (Figura 14). CocE metabolizou as concentrações de cocaína no soro em 150 vezes em menos que um minuto (Figura 15).

Apresentados esses dados, prevê-se que 250 mg de CocE

administrados a uma pessoa de 70 kg após ingestão tóxica de cocaína deve salvar o indivíduo da morte certa. O acima demonstra que CocE de tipo selvagem é uma molécula anticocaína eficiente mas que o tempo de atividade curto da enzima sob condições fisiológicas limita seu valor terapêutico. Tais resultados apontam para a importância da extensão da termoestabilidade de CocE de tipo selvagem.

Exemplo 7: prevenção *in vivo* de CocE mutante T172R da letalidade por cocaína em ratos

10 A atividade hidrolítica de CocE de tipo selvagem e CocE mutante T172R foi caracterizada e confirmada *in vivo* por avaliação de sua capacidade de prevenir letalidade induzida por cocaína em ratos.

O tratamento de animais foi como descrito no Exemplo 15 5. Doses crescentes de cocaína foram administradas (i.p.) a ratos, e um minuto após, CocE de tipo selvagem (0,32 mg), CocE mutante T172R (0,32 mg), ou veículo foram administrados por via intravenosa. Todas as injeções intravenosas foram seguidas por uma dose de heparina (0,5 20 ml). Após o tratamento, os ratos foram observados para morte. O tempo até a morte foi registrado pela dosagem de 1g/kg de cocaína. CocE de tipo selvagem e T172R (0,32 mg) foi administrada em vários momentos precedendo (1, 10, 30, e 60 minutos) a administração de 320 mg/kg i.p. de cocaína, 25 com os ratos então monitorados para morte.

Os resultados demonstram a capacidade de CocE intravenosa e, especialmente, CocE mutante de reverter ou prevenir os efeitos letais produzidos por cocaína. CocE de tipo selvagem administrada um minuto após a administração 30 de cocaína evitou a letalidade e dosagens de cocaína que

mataram os ratos de controle e 100% de letalidade não ocorreu até as dosagens de cocaína de 1g/kg (veja, por exemplo, Figura 16). Os ratos tratados com CocE mutante T172R foram capazes de tolerar doses ainda maiores, com 5 1g/kg de cocaína resultando em apenas cerca de 70% de letalidade. E os efeitos profiláticos de CocE mutante T172R foi de maior duração que a CocE de tipo selvagem (veja, por exemplo, Figura 17).

Exemplo 8: dose de CocE repetida in vivo em camundongos

10 Estudos adicionais foram feitos sobre o efeito de CocE sobre a toxicidade no camundongo, particularmente com relação a doses repetidas.

O modelo de toxicidade em animal foi similar àquele descrito previamente, exceto como descrito. Machos de 15 camundongos NH Swiss foram usados. Para injeção intravenosa na cauda, os camundongos são colocados em uma câmara pequena restrita que expõe sua cauda. Uma lâmpada de calor com um bulbo de 250w de infravermelho é colocada cerca de 10 cm da cauda, e deixada por alguns minutos. A cauda é 20 então limpa com lenço de álcool e uma agulha de precisão de 30G 1/2 (Fisher Scientific), é inserida em uma das veias laterais para infusão. Para verificar se a agulha está na veia uma pequena quantidade de droga é infundida, se na localização correta a solução deve infundir facilmente sem 25 qualquer indicação de um localização subcutânea incorreta, o que aparece branco no local da injeção. Para cateterização intravenosa, machos de camundongos NIH Swiss são anestesiados com quetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg co-administradas i.p. quando os camundongos não são 30 mais responsivos à pressão na pata, o pescoço é raspado e

preparado por alternância de Betadina e lenços de álcool. Sob condições limpas, uma incisão no pescoço transversa direita é feita e a veia jugular externa é isolada. Um cateter é inserido na veia com a ajuda de um microscópio de dissecção ao nível do átrio direito, e é preso à veia com suturas de nylon, 4-0 e adesivo de tecido, 3M Vetbond (3M Animal Care Products, St. Paul, MN). Os cateteres são um comprimento curto de tubos Tygon com um diâmetro interno de 0,025 cm e um diâmetro externo de 0,076 cm. (Small Parts, Inc., Miami Lakes, FL). Uma incisão pequena é feita no meio do dorso do animal, e um trocar inserido por via subcutânea para sair no local de incisão ventral. O cateter é então puxado através do trocar e trazido para fora do dorso do animal onde ele é mantido no lugar com material de sutura de nylon e o adesivo de tecido. Um pequeno pedaço de fio de aço com um diâmetro de 0,028 cm (Small Parts, Inc., Miami Lakes, FL) é inserido no final do cateter. A incisão ventral é fechadas com um material de sutura 4-0 de Vicryl e o camundongo colocado sob uma lâmpada de calor para recuperação. Aproximadamente uma hora depois, o camundongo é devolvido a sua gaiola.

Camundongos que sobreviveram a uma primeira administração da combinação de 0,32 mg CocE e 320 mg/kg de cocaína receberam essa combinação novamente, 14 dias após a administração inicial. Todos os camundongos sobreviveram a essa segunda administração. Todos os camundongos também sobreviveram a uma terceira administração 21 dias após a primeira combinação de dose. A eficácia da administração repetida sugere que uma forte resposta imune não está sendo montada a CocE nessa preparação, talvez por causa de seu

rápido clearance.

Os resultados mostraram que um deslocamento dramático para a direita na potência da cocaína na produção de morte foi gerada por 0,32 e 1,0 mg/kg cocaína (veja, por exemplo, 5 Figura 18). A latência até a morte foi marcadamente estendida por CocE: após 180 mg/kg i.p. de cocaína, os camundongos tipicamente morreram em cerca de 3 minutos. Depois de uma dose de 1,0 gm/kg de cocaína mais 1,0 mg de CocE, a morte ocorreu em 28 minutos em média. Os dados 10 também foram examinados para a capacidade de hBChE de bloquear a toxicidade de cocaína. Em uma dose de 1 mg, hBChE produziu um leve aumento na dose de cocaína necessária para matar os camundongos (veja, por exemplo, Figura 18). Essa enzima é marcadamente menos eficaz que 15 CocE. Embora doses maiores de cocaína tenham sido necessárias para matar os camundongos após administração de hBChE, o tempo até a morte não foi modificado por essa enzima.

Exemplo 9: meia-vida *in vivo* e testes de biodistribuição

20 A meia-vida *in vivo* e biodistribuição dos polipeptídeos de CocE mutante são examinados em camundongos BALB/c. Resumidamente, ^{125}I é rotulado aos resíduos de tirosina de CocE mutante pelo uso do método de iodinação bem estabelecido cloramina-T (Hunter, WM and Greenwood, FC 25 (1962) Nature 194, 495-496). Os camundongos BALB/c são injetados por meio das veias da cauda com 0,1 mL de CocE mutante rotulado com 0,5 μCi ^{125}I ou os conjugados CocE mutante-PEG. Cada grupo experimental consiste em 24 camundongos. Três camundongos são sacrificados por 30 deslocamento cervical nos intervalos de tempo de 15-, 30-,

90-minutos, 3-, 12-, 24-, 48-, e 72-horas após a injeção da droga. Amostras de sangue bem como amostras de tecido de fígado, pulmão, coração, rim, e baço são coletadas, pesadas e medidas para radioatividade usando um contador gama. As amostras de sangue são também centrifugadas, e os sobrenadantes serão coletados e contados para estimativa de radiolabels associados ao plasma. A proporção do pico para aquela do padrão interno é usada como o parâmetro do ensaio. Parâmetros PK são calculada pelo uso do programa de computador de quadrados mínimos não linear KINFT (Kaltenbach, ML and Vistelle, R (1994) Anticancer Research 14, 2375-2377) por ajuste dos dados de radioatividade do plasma a uma equação biexponencial (Gibaldi, M. and Perrier, D. (1982) Pharmacokinetics):

15

$$A(t) = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t}$$

Em que $A(t)$ = %ID/mL plasma e ID = dose injetada. k_2 será usado para calcular o tempo de eliminação de primeira ordem $t_{1/2}$. A área sob a curva (AUC) a curva concentração plasmática-tempo, o volume de estado estável de distribuição (V_{ss}), clearance plasmático total (CI), e the o tempo de residência médio (MRT) são calculados de A_1 , A_2 , k_1 , k_2 , e o peso corporal (kg) do camundongo como descrito por Gibaldi e Perrier, 1982). O produto da área de permeabilidade- superfície do órgão (PS) é calculado como:

25

$$PS = [V_d - V_o] C_{p(60min)} / AUC_{(0-60min)}$$

Em que $C_{p(60min)}$ é a concentração plasmática terminal (dpm/ μ L) a 60 minutos após injeção, V_d é o volume de distribuição de tecido determinado a partir da proporção de

30

desintegrações por minuto por grama de tecido para $CP_{(60min)}$, e V_0 é o volume plasmático do órgão. A liberação pelo órgão das amostras é determinada como:

$$\%ID/g = PS \times AUC_{(0-60min)}$$

5

Em que %ID/g é a dose percentual injetada tomada por grama de órgão.

Exemplo 10: imunologia

CocE pode ser usada em adjuvante incompleto de Freund (IFA) para imunizar camundongos (veja Tabela 4). Um ELISA direto específico para anticorpos de CocE foi estabelecido por um protocolo padrão. CocE foi usada (1 ug/ml) para cobrir uma placa de microtítulo de 96 cavidades com o uso de solução salina tamponada por borato (1,5 M NaCl, 0,5 M H_3BO_3 , 1,0 M NaOH) para ressuspender a esterase de cocaína (50 uL/cavidade). As placas cobertas foram deixadas de um dia para o outro a 4°C. O tampão de cobertura foi removido e manhã seguinte e as placas bloqueadas com 2% soro de cabra normal em PBS por 1 hora a 37°C e lavadas três vezes. Soro dos vários grupos de camundongos foi serialmente diluído em 50 µL de PBS nas cavidades em uma faixa de 10^2 a 10^1 e passado em duplicata. As placas foram cobertas e incubadas por 30 minutos a 37°C. Subseqüentemente, as placas foram lavadas 3 vezes e 50 µL/cavidade de anticorpo rotulado com peroxidase de IgG anti-camundongo de cabra diluído a 1:400. As placas foram então lavadas 3 vezes e 100 µL de solução de substrato de peroxidase (OPD dissolvida em tampão de citratelfosfato) foram adicionados a cada cavidade. Depois de uma incubação de 5-10 minutos (baseada no desenvolvimento de cor nos controles positivos)

30

a reação foi interrompida com o uso de 3M H₂SO₄ (50 μL/cavidade). As placas foram lidas a 490 nm e os títulos determinados pela maior diluição que mostrou aumentos sobre a absorvência de base. Controles positivos foram derivados por imunização de camundongos Balb/c com 100 μg em 100 μL de Esterase de cocaína emulsificada em adjuvante incompleto de Freund (IPA) por injeção intraperitoneal (IP). No grupo positivo 1 o soro foi isolado de camundongos imunizados de 2 semanas. No grupo positivo 2 os camundongos imunizados receberam reforço com o uso de 100 μg em 100 μL por injeção IP 2 semanas após a imunização primária e o soro coletado após mais uma semana (3 semanas após primária).

Altos títulos foram derivados dos dois grupos de controle positivo imunizados com CocE, 10⁵ e 10⁶, respectivamente. Os títulos de anticorpo de animais que receberam CocE i.v. durante as administrações de cocaína demonstraram títulos detectáveis mas relativamente baixos comparados aos animais de controle positivo imunizados por CocE mais IFA. Soro coletado de animais imunizados uma vez com CocE/IFA demonstraram maior título de 10⁵, enquanto soro de animais que receberam uma dose de reforço adicional tiveram um título maior de 10⁶ (3 camundongos/grupo). O soro coletado desses animais servirá como controles positivos para todos os experimentos subsequentes de titulação.

Tabela 4: títulos de CocE de camundongos imunizados

Grupo	Protocolo	Título(log ₁₀ diluição +1- SE
Positivo 1 (n=3) 2 semanas	Imunizado (IFA/IP)	5

Positivo 2 (n=3) 3 semanas	Imunizado / reforço (IFA/IP)	6
Administrado e tratado (3x)	CocE dada com cocaína	3,33 ± 0,333
Administrado e tratado (4x)	CocE dada com cocaína	3,5 ± 0,5

Exemplo 11: peguilação de CocE

A conjugação de um a dois polímeros de PEG por molécula de enzima é geralmente suficiente para gerar os efeitos protetores desejados (Avramis e cols. (2002) Blood 99, 1986-1994). Pelo fato de que cada molécula de CocE de tipo selvagem ser relatada como contendo 8 resíduos de lisina, com nenhum no sítio ativo ms apenas 2 sendo próximos ao sítio ativo (Turner e cols. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307), é improvável que o direcionamento de lisina para peguilação inative a enzima. A CocE mutante é misturada com vários polímeros de monometoxi-PEG (m-PEG) (peso molecular variando de 3-12 KDa); todos contêm um grupo hidroxisuccinil éster funcional de N-extremidade ativada (mPEG-NHS; de Shear Water Inc., Birmingham, AL). PEG com um peso molecular de 5,5 KDa será a primeira tentativa, porque os resultados dos inventores e aqueles de outros investigadores (veja, por exemplo, Veronese, FM and Harris, JM (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 453-456; Avramis e cols. (2002) Blood 99, 1986-1994) demonstraram que esse peso molecular gera a proteção benéfica. Diferentes proporções molares de $[NH_2]:[mPEG]$ (a primeira é calculada com base nos moles totais de resíduos de lisina de CocE mutante) variando de 1:2 a 1:10 são testados para obter condições ótimas. A conjugação

prosegue por cerca de 40 minutos a 4°C com leve agitação. Os produtos da reação são então purificados por ultrafiltração (MWCO 10.000) at 4°C. As atividades dos produtos de CocE mutantes peguilados são determinadas por
5 medição das taxas iniciais de hidrólise de cocaína com o uso do procedimento previamente estabelecido (Turner e cols. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307). Em adição, espectrofotometria de massa MALDi-TOF é realizada nesses produtos para analisar o grau de peguilação e seu peso
10 molecular. Os produtos peguilados são estocados a -40°C e descongelados imediatamente antes de seus usos.

A caracterização padrão, incluindo determinação do pH, temperatura, força iônica ótimos, bem como parâmetros cinéticos (por exemplo Km, Vm), dos conjugados de CocE
15 mutante-PEG são conduzidas em PBS. Além disso, a estabilidade térmica dos produtos peguilados e sua estabilidade contra degradação proteolítica são examinadas na presença de plasma ou sangue humano. Testes funcionais
20 *in vivo* dos produtos de CocE mutante-PEG são conduzidos como acima descrito. A meia-vida *in vivo* e biodistribuição dos conjugados de CocE mutante-PEG, quando comparados a CocE livre são conduzidas como acima descrito (veja o Exemplo 9).

Análise estatística é realizada nos resultados obtidos
25 dos experimentos de peguilação. ANOVA de duas vias de bloqueio aleatório com pós-teste de Dennett é realizada em conjuntos de dados com duas variáveis com o uso de GraphPad (San Diego, CA) Prism para Windows e Software GraphPad. Teste t pareado é realizado para experimentos com duas
30 condições.

A conjugação de CocE mutante a PEG ramificado de alto peso molecular (por exemplo, até 60 KDa) pode ser também realizado (veja, por exemplo, Reddy e cols. (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 571-586).

5 Adicionalmente, peguilação específica a sítio pode ser uma alternativa viável para reduzir heterogeneidade funcional e estrutural. A remoção de resíduos de cisteína próximos ao sítio ativo ou incorporação dos resíduos de cisteína na superfície da proteína pode servir como melhor
10 substrato de peguilação (através de ligação de maleimida). De modo similar, a ligação a amina de PEG a CocE pode ser empregada através, por exemplo, da substituição conservadora de resíduos de arginina por qualquer um dos de CocE mutante (nove lisinas no total em CocE de tipo
15 selvagem, sete das quais são lisinas de superfície).

Achados preliminares mostraram que CocE de tipo selvagem (WT) foi ligada de forma bem-sucedida com polímeros de monometoxi-PEG (m-PEG) (peso molecular: 5,5 KDa) contendo um grupo funcional an succinimidil ativado em
20 uma extremidade, com o uso dos procedimentos acima descritos. Um alto rendimento da atividade inicial de CocE (>70%) foi recuperado depois da reação de peguilação. Espectros de massa MALDI-TOF revelaram quatro picos primários para os produtos PEG-CocE, indicando a presença
25 de uma mistura heterogênea dos conjugados que contêm diferentes números das cadeias de PEG (variando de 1 a 4, respectivamente) (veja, por exemplo, Figura 19). Foi sugerido na literatura que a conjugação de apenas 1-2 cadeias de PEG por molécula de proteína seria capaz de
30 gerar efeitos protetores induzidos por PEG (Veronese, FM

and Harris, JM (2002b) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 457-606; Avramis e cols. (2002) *Blood* 99, 1986-1994). Nesse aspecto, o método de peguilação aqui empregado aparentemente satisfaz tal requisito.

5 Exemplo 12: encapsulação em hemáceas

A encapsulação em hemáceas de CocE pode ser realizada por meio de um peptídeo PTD ligado. LMWP é selecionado como o peptídeo PTD para transportar CocE mutante ns hemáceas, por causa de sua potência nas proteínas de translocação por toda a membrane celular (Park e cols. (2005) *FASEB Journal*, in press) e de sua ausência de toxicidade (Chang e cols. (2001) *AAPS Journal* 3, Artigo #17, #18 e #19). Para assegurar que a CocE mutante encapsulada seja permanentemente incorporadas na hemácea, a ligação entre CocE e LMWP pode degradar automaticamente e rapidamente uma vez que os conjugados de CocE mutante-LMWP entram na hemácea. Um ligante como uma ligação de dissulfeto (S-S) que será degradada rapidamente dentro da hemácea devido à presença de atividade citosólica elevada de glutathione e redutase (Trouet e cols. (1982) *Proceeding of the National Academy of Science* 79, 626-629), assegura que a CocE permanecerá na hemácea.

Para produzir conjugados de CocE mutante-LMWP ligados com ligações S-S, o grupo amina na N-extremidade de LMWP (esse é o único grupo $-NH_2$ em LMWP) é primeiramente ativado com SPDP, e a LMWP ativada então é misturada com CocE mutante na presença de ditionitrotol (DTT) para permitir a formação da ligação S-S com um dos resíduos de cisteína livres (quatro em de tipo selvagem) em CocE mutante (Turner e cols. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307); de acordo com

um procedimento modificado previamente desenvolvido (Liang e cols. (2000) AAPS Pharmaceutical Science 2, Artigo 7). CocE é estável quando sendo estocada em DTT (Turner e cols. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307), sugerindo que o uso
5 desses grupos de cisteína livre para conjugação não deve prejudicar a atividade catalítica dessa enzima (mutação já realizada de cada cisteína em CocE de tipo selvagem para uma serina resultou em diminuição da atividade). Os produtos finais LWMP-CocE são então purificados via uma
10 coluna de heparina, e são estocados por liofilização.

A encapsulação é realizada por incubação de hemáceas com CocE mutante-LMWP por 30-60 minutos. Pelo fato de a entrada na célula mediada por PTD ser independente de temperatura (Schwarze e cols. (1999) Science 285, 1569-
15 1572), a encapsulação é conduzida a 4°C para preservar a funcionalidade de hemáceas. O processo e extensão do aprisionamento de CocE mutante em hemáceas é monitorado por microscopia confocal e análise de citometria de fluxo com o uso de CocE mutante rotulada por FITC. A morfologia de
20 CocE mutante aprisionada em hemáceas é também examinada por SEM.

A caracterização básica, incluindo avaliação da funcionalidade de hemáceas (por exemplo atividade de transferência de oxigênio) e de CocE mutante (por exemplo
25 atividade de hidrólise de cocaína, propriedades cinéticas como K_m , V_m etc.), escapamento de CocE mutante de hemáceas (ou seja, por incubação de hemáceas carregadas com CocE mutante em tampão então medição da atividade da enzima no sobrenadante), e estabilidade d CocE mutante aprisionada
30 contra degradação proteolítica, é conduzida em tampão ou em

plasma. S resultados obtidos para a CocE mutante encapsulada em hemáceas são comparados com aqueles obtidos para a enzima livre. Testes funcionais *in vivo* da CocE mutante-encapsulada em hemáceas são conduzidos como acima
5 descrito.

Hemáceas humanas (da Cruz Vermelha Americana, Detroit, MI) são usadas para estudos *in vitro*. Para estudos animais *in vivo* incluindo os testes funcionais e estudos de farmacocinética, no entanto, hemáceas autólogas da mesma
10 espécie animal são usadas para evitar incompatibilidade celular e possíveis efeitos tóxicos.

A meia-vida de circulação ($t_{1/2}$) de CocE mutante-aprisionada em hemáceas é determinada por injeção de CocE mutante rotulada com ^{125}I (ou seja, antes de sua carga nas
15 hemáceas) em camundongos, de acordo com os mesmos procedimentos acima descritos. Cada conjunto de experimentos consiste em 24 camundongos. Os camundongos (3) são sacrificados em intervalos de tempo de 3-, 6-, 12-, 24- horas e 3-, 6-, 10-, e 15 dias. Amostras de sangue e
20 amostras de tecido são coletadas, pesadas e medidas para radioatividade. Os parâmetros de PK incluindo a $t_{1/2}$ de eliminação, em como distribuição de tecido são calculadas pelo uso do programa KINFT como acima descrito. os resultados de farmacocinética obtidos para a CocE mutante
25 encapsulada em hemáceas são comparados com aqueles obtidos para CocE mutante livre.

Análise estatística é realizada nos resultados obtidos dos experimentos de encapsulação em hemáceas. ANOVA de duas vias de bloqueio aleatório com pós-teste de Dennett é
30 realizada em conjuntos de dados com duas variáveis com o

uso de GraphPad (San Diego, CA) Prism para Windows e Software GraphPad. Teste t pareado é realizado para experimentos com duas condições.

Para examinar se o previamente sugerido pode cumprir os dois últimos requisitos, estudos preliminares de encapsulação em hemáceas mediada por PTD foram conduzidos usando L-asparaginase como uma enzima modelo. LMWVP, um peptídeo de PTD previamente desenvolvido no laboratório de Dr. Yang (Chang e cols. (2001) AAPS Journal 3, Artigo #17, #1, e #19) com atividade provada, potente de penetração em membrana (Park e cols. (2005) FASEB Journal, em impressão), foi ligado a asparaginase com o uso de um procedimento similar àquele acima descrito. Os conjugados LMWP-ASNase foram então incubados com hemáceas (coletadas de camundongos DBA/2) por 2 horas a 4°C. Para comparação, hemáceas fantasmas contendo ASNase encapsuladas foram também preparadas de acordo com os procedimentos previamente estabelecidos (Updike e cols. (1976) Science 193, 681-683). Resultados preliminares demonstraram que a eficiência de carga do método mediado por LMWP foi pelo menos comparável, se não melhor, à técnica convencional, de ruptura célula com base em osmose. Uma vantagem principal do método mediado por PTD, entretanto, é que ele apenas requer uma única etapa para processamento; diferente dos outros métodos de entrada em célula que requerem todos múltiplas etapas dos procedimentos de carga e lavagem.

A Figura 20 apresenta imagens de microscopia de rastreamento de elétrons (SEM) feitas a partir de amostras de hemáceas normais, hemáceas fantasmas carregadas com ASNase, e hemáceas carregadas com LMWP-ASNase. Como

observado, embora as hemáceas carregadas com ASNase do método de ruptura osmótica/re-selagem (ou seja hemácea fantasma) exibissem mudança significativa no formato e morfologia, as hemáceas carregadas com LMWP-ASNase 5 mostraram formato e morfologia praticamente indistinguíveis (ou seja disco bicôncavo) daquele de hemáceas normais. Esses achados estão de acordo com aqueles relatados por vários outros investigadores de que a encapsulação celular mediada por PTD não causa qualquer perturbação 10 significativa ou alteração da membrana celular (Dietz, GPH and Bahr, M (2004) *Molecular Cell Neurosciences* 27, 85-131; Schwarze e cols. (1999) *Science* 285, 1569-1572; Suzuki e cols. (2002) *Journal of Biological Chemistry* 25, 2437-2443).

15 Para também avaliar esses dois sistemas de encapsulação em hemáceas, fora realizados estudos preliminares de clearance. A meia-vida da atividade de ASNase em plasma foi avaliada após injeção intravenosa de: (1) hemácea fantasma carregada com ASNase, and (2) hemácea 20 carregada com LMWP-ASNase. Cada grupo de animais consistiu em 4 camundongos DBA-2, e cada camundongo recebeu 8 unidades de atividade de ASNase carregada. As amostras de sangue foram retiradas em diferentes intervalos de tempo da vaia da cauda, e a quantidade de atividade de ASNase no 25 sangue total foi medida por Nesslerization direta de amônia produzida (Ho e cols. (1970) *Journal of Biological Chemistry* 245, 3708-15). Os resultados demonstraram que havia quase um aumento de duas vezes na meia-vida de circulação para as hemáceas encapsuladas com LMWP-ASNase 30 ($t_{1/2}$: 9,2 dias) comparada àquela ($t_{1/2}$: 5,9 dias) para a

hemácea fantasma (veja, por exemplo, Figura 21). É atualmente desconhecida qual é diferença entre as meias-vidas das hemáceas encapsuladas e as hemáceas normais, não tratadas. Não obstante, esses resultados de aumento de 2 vezes de $t_{1/2}$ sobre hemácea fantasma demonstram o mérito dessa abordagem, uma vez que foi relatado na literatura que mesmo por utilização do método de encapsulação em hemácea fantasma, a atividade *in vivo* de ASNase já foi prolongada de 26 horas para a ASNase livre para 29 dias para a ASNase encapsulada em hemácea fantasma (Kravtsoff e cols. (1996) *European Journal of Clinical Pharmacology* 49, 465-470): já um aumento de 10 vezes. Portanto, um outro aumento de 2 vezes dessa $t_{1/2}$ pelo método de encapsulação aqui descrito é particularmente eficaz.

Para confirmar que a ASNase encapsulada em hemáceas ainda retém suas funções biológicas originais, efeitos antitumor pela ASNase de hemácea fantasma e hemácea-ASNase foram examinados em camundongos que portam tumor. células de linfoma de camundongo L5178Y foram cultivadas, e a cada camundongo DBA/2 7×10^5 de células de câncer foram injetadas por via intraperitoneal. Cinco dias depois do implantate do tumor, os camundongos com pesos corporais similares foram selecionados e divididos em três grupos: (1) grupo de controle recebeu solução salina apenas; (2) hemáceas fantasmas carregada com ASNase; e (3) hemáceas carregada com LMWP-ASNase. Cada grupo consistiu em 5 camundongos, e cada camundongo experimental recebeu 0,1 mL da hemácea encapsulada com droga (ou fantasma). Os resultados mostraram que os tempos de sobrevivência médios para os grupos de controle não tratado, tratado com ASNase-hemácea

fantasma, e tratado com hemácea LMWP-ASNase foram 10,0, 12,6, e 14,4 dias, respectivamente (veja, por exemplo, Figura 22). Deve ser observado que embora o tempo de sobrevivência entre os três grupos tenha diferido em apenas
5 cerca de 2 dias, os efeitos do tratamento pala ASNase encapsulada em hemáceas foi ainda bastante dramáticos; considerando o fato de que apenas 0,1 mL da suspensão de hemáceas, que foi equivalente a apenas 5% do volume total de sangue do camundongo, foi dada a cada camundongo para o
10 tratamento antitumor. No geral, esses achados com o modelo de enzima ASNase demonstram que a enzima encapsulada em hemáceas era ainda terapeuticamente ativa. Deve-se notar que a cocaína é mais permeável através da membrana da hemácea que o substrato de asparaginase.

15 Portanto, a utilização de CocE encapsulada em hemáceas no tratamento de condições relacionadas à cocaína é uma abordagem eficaz porque a cocaína cruza facilmente a membrana da hemácea (e realmente se concentra na hemácea) (Javaid e cols. (1978) Journal of Cromatografia 15, 105-
20 113), a encapsulação mediada por PTD não altera as propriedades físicas e/ou químicas das hemáceas, e a enzima encapsulada em hemáceas funciona como se fosse livre.

EXEMPLO 13: REMOÇÃO DE ENDOTOXINA

A descontaminação por endotoxina de mutantes de CocE
25 pode ser realizada de várias formas. Idealmente, a descontaminação de endotoxina diminui a concentração a níveis de menos de 10 EU/mg proteína. Métodos de descontaminação incluem condições alternativas de cromatografia em coluna de troca iônica, de exclusão de
30 tamanho polietilenoimina (PEI) e cromatografia em coluna

hidrofóbica, ultrafiltração e extração de detergente. Um sistema de detecção de endotoxina (PYROGENT 5000, Cambrex) é usado para determinar o teor de endotoxina de preparações. O ensaio é baseado no fator anti-LPS de lisado de *Limulus ameobocyte* (LAL). A sensibilidade do ensaio é entre 0,01 e 100 EU/ml, dentro dos níveis de necessários. O ensaio espectrofotométrico é projetado em um formato de placa de microtitulação de 96 poços. O fracionamento da endotoxina e da CocE e/ou mutante de CocE pelos procedimentos seguintes pode ser testado tanto quanto ao nível de endotoxina quanto à atividade de esterase de cocaína. A atividade de esterase de cocaína é medida utilizando-se um ensaio espectrofotométrico que se beneficia da absorção intrínseca de cocaína a 240 nm. Mediante hidrólise, os espectros de absorção revelam uma redução dramática no pico a 240 nm (Turner e cols. (2002) *Biochemistry* 41, 12.297-12.307).

Cromatografia de troca aniônica: as condições atuais envolvem o uso de cromatografia líquida performance rápida (FPLC) em uma coluna Q-Sefarose em pH 8,0 para descontaminação de endotoxina. As condições de tamponamento (pH) podem ser otimizadas para maximizar tanto a adsorção de CocE e/ou de mutante de CocE quanto a separação de endotoxina. Fluted frações são testadas por medida da atividade de CocE ou atividade de mutante de CocE (ensaio espectroscópico da hidrólise de cocaína, absorção a 240 nm). Os níveis de endotoxina são avaliados usando PYROGENT 5000 (acima).

Cromatografia por exclusão de tamanho e ultrafiltração: a endotoxina pode existir como formas

monoméricas (PM $\sim 1-2 \times 10^4$) ou em forma micelar (PM $\sim 4 \times 10^5$ a 1×10^6), dependendo das condições de tamponamento. A presença de detergentes como colato favorece a forma monomérica, enquanto cátions divalentes (por exemplo, Ca^{2+}) favorece a forma micelar (Hirayama, C. e Sakata, M. (2002) *Journal of Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Science* 781, 419-432). Essa propriedade da endotoxina é usada para separar a forma micelar (ou seja, na presença de cátions divalentes como Mg^{2+} ; ou Ca^{2+}) da CocE e/ou mutante de CocE por cromatografia de filtração de gel usando uma resina de coluna Sefadex 75 ou Sefadex 200 (Pharmacia). A endotoxina micelar não deve ser retida na coluna e deve passar através do espaço vazio, enquanto CocE e/ou mutante de CocE deve eluir como uma proteína monodispersa que corresponde a uma proteína de 65 kDa. Similarmente, a capacidade de unidades de ultrafiltração para separar as formas micelares de endotoxina de CocE e/ou mutante de CocE será avaliada. Unidades de ultrafiltração são agora disponíveis com valores de corte de peso molecular de 3×10^5 a 1×10^6 , dentro da faixa necessária para reter a endotoxina micelar, mas não a própria CocE.

Cromatografia em polietilenoimina: Mitzner e cols. (1993) e Morimoto e cols. (1985) utilizaram PEI imobilizado em glóbulos de celulose ou em fibra de celulose, respectivamente, para remove endotoxina de preparações de BSA. A cromatografia coluna PEI é uma permutadora de anions muito fraca que pode, na verdade, se beneficiar de algumas propriedades hidrofóbicas da endotoxina e, dessa forma, absorvê-la preferencialmente. Várias preparações de glóbulos de PEI-sílica são disponíveis por Sigma,

dependendo do tamanho do glóbulo. Embora glóbulos de sílica estejam mais classicamente associados às aplicações de HPLC, nos compactaremos as colunas para um funcionamento em uma pressão menor e selecionaremos tamanhos de trama de 200
5 μm .

Extração com Triton X-114: a separação de fase com Triton X-114 tem sido usada com sucesso para separar endotoxina de albumina e catalase (Aida, Y. e Pabst, M.J. (1990) *J. Immunological Methods* 132, 191-195). Adia e Pabst
10 relatam uma diminuição de 1.000 vezes na concentração de endotoxina após uma única etapa de extração Triton X-114. Amostras de CocE e de mutante de CocE são incubadas com volumes iguais de Triton 114 e, são incubadas primeiramente no gelo, e depois a 37°C por 15 minutos. A fase Triton X-
15 114 que contém a endotoxina é removida por centrifugação. Como observado anteriormente, foi demonstrado que CocE é consideravelmente termolábil, mas pode ser um pouco protegida pela presença do substrato, cocaína. Caso a incubação de CocE com Triton X-114 a 37°C resulte em uma
20 inativação significativa de CocE, a enzima será estabilizada por inclusão de substrato em excesso durante a extração.

EXEMPLO 14: MUTAGÊNESE DO ORGANISMO HOSPEDEIRO DE CocE

Há várias cepas bacterianas que exibem crescimento
25 sensível à temperatura em subprodutos de esterase de cocaína, incluindo várias cepas de *Pseudomonas*, e esses organismos podem ser adaptados para crescimento sensível à temperatura em cocaína por adição do gene de CocE codificado dentro de vetores de plasmídeo adequados. Por
30 exemplo, o gene CocE foi originalmente seqüenciado a partir

de *Rhodococcus* MBI por subclonagem de fragmentos gênicos em *Rhodococcus erythropolis* CW25, uma bactéria incapaz de metabolizar cocaína, mas capaz de crescer nos subprodutos de esterase de cocaína éster metílico e benzoato de ecgonina (Bresler e cols. (2000) *Applied & Environmental Microbiology* 66, 904-908). O gene CocE foi subclonado em vetores shuttle pJAK-14 e pMMB67EH (veja, por exemplo, o Exemplo 1). Esses plasmídeos são capazes de expressão em qualquer bactéria gram-negativa, incluindo *Pseudomonas*, e adicionalmente o plasmídeo pMMB67EH permite altos níveis de expressão e facilidade de transformação por conjugação bacteriana com o uso do plasmídeo auxiliar pRK2013. A transformação do plasmídeo em bactérias que exibem crescimento sensível à temperatura em subprodutos de esterase de cocaína (por exemplo, cepas de *Pseudomonas*), permite o crescimento sensível à temperatura em placas que contêm cocaína como a única fonte de carbono. A mutagênese tanto do *Rhodococcus* MBI original quanto das cepas de *Pseudomonas* que contêm CocE plasmídeo é realizada usando radiação com luz UV a 260 nm. A exposição é administrada de tal forma que 90-95% das células sejam mortas. As células restantes são recuperadas em meios nutrientes por 1 hora a 26°C, coletadas e enriquecidas na presença de cocaína, como descrito previamente (Britt, e cols. (1992) *Journal of Bacteriology* 174, 2.087-2.094). O enriquecimento é realizado a 37°C para a seleção de variantes termoestáveis da CocE. Finalmente, as células são plaqueadas em placas de ágar com meio mínimo contendo cocaína 10 mM, e incubadas a 37°C. Colônias únicas se desenvolvem e são testadas quanto à atividade de CocE a 37°C. A amplificação por PCR do gene

CocE é realizada nos mutantes encontrados para produzir CocE ativa e solúvel a 37°C, e os produtos de amplificação são subclonados no plasmídeo pET-22B(+) para caracterização adicional. Como um prelúdio da mutagênese de CocE, pode ser
5 necessário efetuar a mutagênese das cepas nativas de *Pseudomonas* a fim de pré-selecionar nenhuma sensibilidade à temperatura a 37°C quando desenvolvidas em produtos da hidrólise de cocaína, e que depois demonstrem sensibilidade à temperatura em cocaína a 37°C após clonagem em CocE.

10 **EXEMPLO 15: MÉTODO DE RASTREAMENTO DE ALTO RENDIMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTANTES DE CocE TERMOESTÁVEIS**

Vários métodos de rastreamento de alto rendimento para identificação de variantes de CocE termoestáveis foram implementados. Como a enzima de tipo selvagem é conhecida
15 por ter instabilidade térmica em temperaturas acima de 30°C, após transformação em células de *E. coli* BL21, as colônias são subcultivadas e a expressão de proteína induzida a 16°C. As proteínas expressas são então testadas quanto à atividade de esterase em temperaturas 30°C e
20 acima. Após várias rodadas de mutagênese e testes em temperaturas crescentes, são obtidos mutantes termoestáveis. Cada mutante de CocE individual é então preparado, purificado e testado quanto à atividade e termoestabilidade a 37°C, como descrito acima (veja os
25 Exemplos 1 e 4).

Colônias bacterianas contendo polipeptídeos mutantes são rastreadas diretamente das placas de ágar por impressão em filtro de nitrocelulose de réplicas de placas, seguida por lise das bactérias e fixação de proteína. A
30 determinação da enzimática atividade em várias temperaturas

é obtida por monitoramento do acúmulo de ácido benzóico, o subproduto ácido de (-)cocaína. Uma impressão úmida de nitrocelulose é colocada sobre um papel de filtro seco previamente saturado com uma mistura de cocaína em pH 7,4, 5 sem tampão, e um indicador de pH que apresenta uma transição de incolor a cor mediante acidificação, por exemplo, vermelho metil. A enzima ativa é identificada por mudança de cor, e as colônias são adequadamente coletadas. O método detecção baseado na acidificação por meio da 10 formação de ácido benzóico é empregado para a detecção da expressão celular de anticorpos catalíticos que hidrolisam cocaína no grupo éster de benzoila, o mesmo local clivado por CocE. Alternativamente, a detecção por impressão de nitrocelulose é obtida por exposição a um derivado tiol de 15 cocaína e subsequente detecção de grupos sulfidrilas por meio de sistema indicador por precipitação de metal pesado (por exemplo, baseado em mercúrio).

Colônias bacterianas que contêm polipeptídeos mutantes também são rastreadas por subcultivo em meio líquido e 20 testes diretos quanto à atividade de esterase de cocaína usando um derivado tiol de cocaína e detecção com utilização do indicador colorimétrico de tiol, o reagente de Ellman (veja, por exemplo, a Figura 6). O reagente de Ellman forma rapidamente uma ligação dissulfeto com grupos 25 tiol livres e libera um íon tiolato colorido que absorve a 412 nm. Culturas incubadas de um dia para o outro a 16°C na presença de IPTG para induzir expressão de proteína (20 µl) são misturadas com derivado de benzoiltioéster 1 mM de cocaína, e reagente de Ellman 500 µM em fosfato de sódio 30 100 mM pH 7,4, até um volume final de 200 µl. Os resultados

(veja, por exemplo, a Figura 6) indicam que as células que contêm a enzima CocE de tipo selvagem são capazes de clivar o benzoiltioéster em níveis bem maiores do que as células isoladamente.

5 Finalmente, colônias bacterianas contendo polipeptídeos mutantes são rastreadas por subcultivo em meio líquido, seguido por lise e isolamento de polipeptídeos mutantes usando um meio de afinidade. Por exemplo, as células lisadas são lavadas através de placas de filtro de níquel-agarose que permitem a coleta e subsequente eluição de proteínas marcadas com 6xHIS (por exemplo, o kit "Ni-NTA Superflow 96-Bio-robot" (Qiagen). Alternativamente, as células são lisadas dentro de placas de microtitulação revestidas com níquel que permitem a ligação de proteínas de fusão 6xHIS e subsequente remoção de contaminantes (por exemplo, placas imobilizadoras de quelato de níquel (Nunc) ou placas *flash* de quelato de níquel NEN (Perkin Elmer)). Similarmente, as células lisadas são incubadas com microglóbulos revestidos com níquel (como glóbulos magnéticos de agarose Ni-NTA (Qiagen)), seguido por remoção subsequente de proteínas contaminantes. A atividade isolada de proteína esterase é então testada com a utilização de qualquer um dos ensaios mencionados previamente (como o ensaio espectrofotométrico de atividade (Exemplos 1 e 4), o ensaio de atividade de cocaína tritiada (Exemplo 1), o ensaio de atividade por indicação do pH de ácido benzóico, os sistemas de detecção do derivado tiol de cocaína, o uso de aptâmeros de cocaína (Stojanovic, M.N., de Prada, P. e Landry, D.W. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* 123, 4.928-31; 20 Stojanovic, M.N. e Landry, D.W. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 30

124, 9.678-9) por monitoramento de mudanças na fluorescência mediante degradação de cocaína, ou pelo uso de um substrato genérico de esterase como, por exemplo, acetato de 4-nitrofenil e monitoramento das mudanças colorimétricas a 420 nm, como descrito previamente (Halgasova, N. e cols. (1994) *Biochem. J.* 298 Pt 3, 751-5; O'Conner, C.J. e Manuel, R.D. (1993) *J. Dairy Sci.* 76: 3.674-3.682).

EXEMPLO 16: ANÁLISE PRELIMINAR DO POLIPEPTÍDEO MUTANTE N197K

A análise preliminar do polipeptídeo mutante N197K (Id. de Seq. N°: 42) mostrou boa estabilidade após 1 hora a 37°C no dia 0. Os valores de Vmax e Km são mostrados na Tabela 5. Uma re-verificação no 3° dia mostrou estabilidade similar. Os valores de Vmax e Km são mostrados na Tabela 6. Valores de Km maiores no 3° dia foram em consequência do reuso de cocaína velha. A filtração em gel de amostras incubadas a 37°C mostrou a formação de agregados.

Tabela 5: Teste inicial de N197K (dia 0)

	N197K (0)	N197K (60)
Equação 1		
Valores <i>Best-fit</i>		
VMAX	2.928	2.187
KM	34,77	24,24

Tabela 6: teste de repetição de N197K (dia 3)

	N197K (0)	N197K (60)
Equação 1		
Valores <i>Best-fit</i>		
VMAX	3.357	3.085

KM	102,2	113,5
----	-------	-------

Exemplo 17: identificação de polipeptídeos mutantes de CocE termicamente estáveis

Polipeptídeos mutantes de CocE termicamente estáveis foram identificados por determinação de $\tau_{1/2}$ dos polipeptídeos mutantes de CocE. Resumidamente, as enzimas foram pré-incubadas a 37°C por tempos variáveis. As medidas da atividade foram determinadas em temperatura ambiente (25°C). As enzimas mutantes com $\tau_{1/2}$ maior do que 12 minutos (o $\tau_{1/2}$ da CocE do tipo selvagem) foram consideradas termicamente estáveis (veja, por exemplo, a Figura 27 e a Tabela 7). Como demonstrado pela combinação de polipeptídeo de mutante de CocE T172R/G173Q, em várias modalidades, a combinação de duas mutações únicas com estabilidade menor ou ausente pode resultar em um a combinação termicamente estável.

Tabela 7: Polipeptídeos mutantes de CocE termicamente estáveis

Mutante	Estabilidade @ 37°C ($\tau_{1/2}$)
T122A	Não
Q123E	Não
S159A	Não
S140A	Não
S167A/W52L	Não
T172R	~46 min
V121D	Não
L163V	Não
F189A	Não
F189A/T172R	~40 min (Similar a T172R)
C107S	Não

W220A	Não
F189L	Não
A193D	Não
TI72R/A193D	~40 min (Similar a T172R)
G173Q	~25 min
T254R	Não
N42V	Não
T172R/G173Q	~326 min
G171Q/T172R/G173Q	Não
G171A	Não
G173A	Não
wt-T175-G-D185	Não
wt-T176-G-G-D185	Não
T172R/G173Q-T175-G-D185	
T172R/G173Q-T175-G-G-A186	~75 min
T172R/G173Q-T176-G-G-D185	~75 min
S177Q	Não
D45R	Não
F47R	Não
L169K	~274 min
L174R	Não
A181K	Não
S179R	Não
F189K	25 min
V190K	Não
A194K	Não
R182K	Não

Exemplo 18: proteção de agregação de mutantes esterase de cocaína termoestáveis

A Proteção de agregação de mutantes de CocE termoestáveis foi avaliada com o uso de cromatografia por exclusão de tamanho. Resumidamente, as enzimas foram pré-incubadas a 37°C por 0 minuto ou 60 minutos, e resolvidas por cromatografia por exclusão de tamanho. Os resultados para CocE de tipo selvagem, T172R e T172R/G173Q são mostrados na Figura 28.

EXEMPLO 19: ESPECTROS INFERIORES DO UV

Os dados dos espectros inferiores do UV foram obtidos usando um Aviv Spectropolarimeter Mode 400, com o auxílio de Norma Greenfield, UMDNJ, usando um suporte de 5 células e concentrações de proteína de 0,2 mg/ml. Os valores brutos dos dados obtidos foram purificados em PBS de controle, regulados, e desconvolutos usando o algoritmo CCA como descrito por A. Perczel, K. Park e G.D. Fasman, ["Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide". *Analytical Biochemistry* 203, 83-93 (1992)]. Esse algoritmo encontra o número mínimo de curvas necessário para a reconstrução de um conjunto de dados, e expressa a percentagem que cada curva contribui para o conjunto de dados como uma função da temperatura.

Abaixo está apresentada uma análise de desconvolução de CCA de UV inferior de CocE do tipo selvagem e 4 mutantes, obtidos em uma fusão de espectros de CD únicos usando um suporte de 5 células. O experimento foi realizado o longo do período de 8 horas, de 0-80°C.

A fusão dependente da temperatura foi observada entre os comprimentos de onda testados (200-250 nm), e os espectros regulados para cada mutante são mostrados na

Figura 29. Desconvolução via o algoritmo CCA indicou que cada espectro foi mais bem descrito por um conjunto de três curvas, como mostrado na Figura 30. Isso sugere que a fusão de CocE é um processo de pelo menos duas etapas, movendo de uma curva original (curva 1) para uma etapa desbobrada intermediária (curva 2), e finalmente a proteína totalmente desnaturada (curva 3). A contribuição % que cada temperatura desempenhou na descrição dessas três curvas é mostrada na Figura 31. A análise de reposta foi usada para aproximar uma temperatura em que o espectro inicial se funde (1), a formação e fusão do estado intermediário (2), e o acúmulo da proteína totalmente fundida (3). Esses numerosos foram coletados e tabulados na Figura 32 e mostrados na Tabela 8.

15 **Tabela 8: Pontos de fusão de cada etapa**

	Fusão #1	Formação #2	Fusão #2	Formação #3
—●— WT	37,04	34,57	50,98	59,86
—■— T172R	39,22	38,11	54,56	56,85
T172R-A193D	38,11	46,47	47,68	58,72
—✱— T172R-F189K	38,8	46,81	48,42	57,23
—✱— T172R-G1730	40,62	45,61	46,17	56,61

O mutante mais termoestável T172R-G173Q (como determinado em outros ensaios) mostrou a maior temperatura de fusão da curva original 1 (40°C vs 37°C para o tipo selvagem), e a menor temperatura tanto para o desaparecimento do intermediário da curva 2 (46°C vs 50°C para o tipo selvagem) quanto para o aparecimento da curva totalmente fundida 3 (56°C vs 59°C para o tipo selvagem).

Em resumo, parece que todos os mutantes passaram por

um processo de fusão em 2 etapas.

EXEMPLO 20: ESTABILIZAÇÃO USANDO PRODUTOS E INIBIDORES

A Esterase de cocaína (CocE) cliva a cocaína para produzir ácido benzóico e éster metílico de ecgonina.

5 Resumidamente, substratos e inibidores alternativos de cocaína, além de compostos capazes de estabilizar termicamente a enzima, foram investigados geralmente por substituição de análogos de amida e tiol na ligação reativa Ester, ou por remoção da ligação (para inibidores), por
10 substituição de análogos de benzoila no lugar do grupo abandonador de ácido benzóico, e/ou remoção ou alteração do grupo metil-éster na porção ecgonina da molécula. Como discutido abaixo, foi determinado que alguns substratos, produtos e inibidores estabilizavam a desnaturação térmica
15 de CocE do tipo selvagem, bem como evitavam a agregação induzida termicamente em eletroforese em gel.

A cocaína é o substrato natural da esterase de cocaína (CocE). A clivagem de cocaína foi monitorada por uma queda da absorbância a 240 nm. A cocaína (na faixa de mM) evitou
20 a formação induzida a 37°C de agregados de CocE de alto peso molecular (concentrações enzimáticas de 0,1 mg/ml) (veja, por exemplo, a Figura 33). Cocaína (em quantidades de μM) estabilizou a perda de atividade induzida a 37°C (veja, por exemplo, Figura 34), embora o mecanismo dessa
25 estabilização seja complicado em função da inibição de substrato em concentrações maiores.

O ácido benzóico é o produto natural de CocE e um inibidor fraco da clivagem de CocE de acetato de 4-nitrofenil (K_i 310 μM). O ácido benzóico evitou a formação
30 induzida a 37°C de agregados de CocE de alto peso molecular

(concentrações enzimáticas de 0,1 mg/ml) (veja, por exemplo, a Figura 35). O ácido benzóico (quantidades de μM) estabilizou a perda de atividade induzida a 37°C (veja, por exemplo, Figura 36), embora o mecanismo dessa estabilização seja complicado em função da inibição de substrato em concentrações maiores.

CocE catalisa a clivagem de acetato de 4-nitrofenil (4NPA) em 4-nitrofenol (4NP) e acetato. A reação de clivagem foi monitorada por observação de formação de produto a 400 nm. Tanto 4NP quanto 4NPA (na faixa de mM) evitaram a formação induzida a 37°C de agregados de CocE de alto peso molecular (concentrações enzimáticas de 0,1 mg/ml).

O ácido fenilborônico é um inibidor potente de CocE (K_i 250 nM). O ácido fenilborônico estabilizou a agregação induzida a 37°C de CocE com uma EC_{50} de 0,2 μM por análise de densitometria.

Usando o que foi apresentado acima, é desenvolvido um ensaio de rastreamento para rastrear pequenas moléculas que possam, da mesma forma, estabilizar a enzima, mas não ocupem necessariamente o sítio ativo. As moléculas identificadas como moléculas estabilizantes são usadas para estabilizar as proteínas aqui reveladas até estarem prontas para uso.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Columbia University
 Zhan, Chang-Guo
 5 Landry, Donald
 Sunahara, Roger
 MacDonald, Joanne
 Narasimhan, Diwa
 Woods, James
 10 Holden Ko, Mei_Chuan
 Deng, Shi-Xian

<120> COMPOSIÇÕES ANTICOCAÍNA E TRATAMENTO

15 <130> 88800730-0003

<140> PCTUS0715762
 <141> 03-08-2007

20 <150> 60/819,569
 <151> 10-07-2006

<160> 47

25 <170> PatentIn versão 3.3

<210> 1
 <211> 574
 <212> PRT
 30 <213> Rhodococcus sp. MB1

<400> 1

35 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

40 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

45 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

50 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

55 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

60

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

5 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

10 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

15 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

20 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

25 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

30 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

35 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

40 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

45 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

50 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

55 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

60 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

60 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala

	gatccagcga aggtcgggag tgaatggtgg acgggaatta cagtgttgcc tcgaacgtga	60
	tggttccgat gcgtgatggg gtgcgtctgg cggtcgacct gtaccgacca gatgctgatg	120
5	gacctgttcc ggtcctgctg gttcgcaacc catacgacaa gttcgacgtg ttcgcgtggt	180
	cgacgcagtc gacaaactgg cttgagttcg tgcgtgatgg ctatgccgtg gtcattcaag	240
10	acacgcgtgg cttgttcgca tcggaagggtg agttcgtccc gcacgttgac gacgaagctg	300
	acgccgagga tacgttgagc tggattctgg aacaagcgtg gtgcgacggc aatgtgggca	360
	tgttcggcgt ttcgtaactg ggtgtgacct agtggcaggc cgccgtatcc ggcgttggtg	420
15	ggctgaaggc gatcgcgccg tccatggcgt cggcggactt gtaccgcgcc ccgtggtacg	480
	gccctggtgg tgcgctttca gtcgaggcgc tgttgggctg gtcagctctc ataggactg	540
20	ggctcatcac gtcgaggtct gacgcccggc ccgaagacgc agccgacttc gtccaactcg	600
	cagcaattct caatgacgtc gctggcgcgg cgtcggtcac gccctggcc gagcaaccgc	660
	ttctgggccc actgattccg tgggtgatcg atcaggttgt cgatcaccct gacaacgatg	720
25	aatcatggca gtccattagc ttgtttgaac gactcggcgg gttggcaaca ccggccttga	780
	tcacggctgg gtggtacgac gggttcgtcg gcgaatcgtt gcgcactttc gttgcggtca	840
30	aggacaatgc cgacgcacgt ttggttgctg gcccttgag tcacagcaac ctactggtc	900
	ggaatgcgga ccggaagtcc ggcattgccc cgacctacc gattcaagaa gccaccacga	960
	tgacaaaggc attcttcgac cggcacctcc gcggcgagac cgatgcactc gcaggcgtcc	1020
35	ccaagtgcg gctgttcgta atgggcatcg atgagtggcg tgacgaaacg gactggccac	1080
	tgccggacac ggcgtatacg cccttctatc ttggaggtag cggggctgcg aatacctcca	1140
40	cgggtggtgg aacactgctg acgtcgattt ccggaactga atctgctgac acctacctgt	1200
	atgatccggc cgatcccgtg ccttcgctcg gggggacgct gctgttccac aacggagaca	1260
	acggaccgc cgaccaactc cccattcatg accgggacga cgtggtgtgt tacagcactg	1320
45	aggattgac cgaccgggtg gaagtaaccg gcaccgtctc cgcccggctg ttcgtgtcgt	1380
	catcagcggc ggacactgat ttcaccgcca aacttgctga cgtatttccc gacggtcgcg	1440
50	cgatcgcgct gtgtgacggg atcgtgcgga tgcggtaccg cgagacgttg gtcaatccaa	1500
	ccttgatcga agcggggcga atctacgagg ttgctatcga catgcttgca acctcgaatg	1560
	tattcctgcc agggcatcgc atcatggtcc aagtatcaag tagcaacttc ccgaaatacg	1620
55	accgcaattc gaataccggc ggagtaatcg cacgggaaca gctcgaagag atgtgcaccg	1680
	ccgtgaaccg cattcaccga ggacctgagc atcccagcca cattgtgctg ccgattatca	1740
60	agcgatagtt ttcgggtgag ccgcgcctgg ctgacgctgc agctcaaacc caatggctcg	1800
	gcaaccggta cgcgctcgcc gccctgcact ttccaccatg cgtaggctcg cagcggccga	1860

ctgaaggccg gattgcatcc cgaccocggcg accctaggtc aggcgaattg tccgaatgtc 1920
 5 agcgggtcatg taattcccca ggttgagcggg ttcgtcggtc acgtaattcc tcaccctgcc 1980
 gtcacgtagt tccccaccct gggcgtgtcg gtcgggggtgc gggtgctgct gcaggttcgc 2040
 cccctcccaa ggtccacctg ggggaaggggc cgcacgggtgg caaggagaac gtggacgatg 2100
 10 accgatctga cgatgaccga tctgatggag ttcttccggc actggcatgc cgggcgttcg 2160
 caggttcaga tctcaccggc gtttgggatc gaccgcaaaa cctgacttgc acaagttgac 2220
 ggcggtttcc ggactcggct gacatttgcg caagtagaag gccccgcggg ttcgggattt 2280
 15 ggcgcactaa cgggtcggta aaatctggcg agtggcggcg tacattcgca aggtcaggac 2340
 cgcacggggg gcgaccgcgg tgcagatcgc cgtcaagcag ggacgtcgcg acaaggtgcg 2400
 20 tcgagcacct cggttccgca cacaccgaca gcgagcttgc tgcgctactg caggccgccg 2460
 aggagaagct gcaggtcgga cagtaggaac tcgacctcga cctcggcggg agcgggggatc 2520
 gagggtcggg gatcgcggcg aagcggctcc gctggttgat cgaggcgatc gagaccggat 2580
 25 gacggcggct cggcttcgac gtgatcgacg acgaggtggt catctaactg gtgatcggca 2640
 ggctcgtcga accgacctcg atgagcgaca ccggccggga atcgccgaga tc 2692

30

<210> 3
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Polipeptídeo Mutante CocE

40

<400> 3

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

45

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

50

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

55

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

60

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp

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

5 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

10 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

15 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

20 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

25 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

30 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

35 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

40 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

45 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

50 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

55 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

60 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

65 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

70 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

75 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 4
 <211> 574
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE

 10 <400> 4

 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

 15 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

 20 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

 25 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

 30 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

 35 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

 40 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

 45 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Asp Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

 50 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

 55 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

 60 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

 65 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

 70 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

5 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

10 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

15 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

20 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

25 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

30 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

35 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

40 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

45 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

50 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

55 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

60 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

65 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

70 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

75 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

5

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

10

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

15

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

20

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

25

Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

30

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

35

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 5
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 5

45

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

50

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

55

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

60

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

65

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

5

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

10

Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

15

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

20

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

25

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

30

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

35

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

40

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

45

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

50

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

55

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

60

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
565 570

5 <210> 6
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipeptideo Mutante CocE
<400> 6

15 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
1 5 10 15

20 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
20 25 30

25 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
35 40 45

30 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
50 55 60

35 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
65 70 75 80

40 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
100 105 110

45 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Glu Trp Gln Ala Ala Val
115 120 125

50 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
130 135 140

55 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
145 150 155 160

60 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
165 170 175

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
180 185 190

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
195 200 205

5
Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
210 215 220

10
Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
225 230 235 240

15
Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
245 250 255

20
Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
260 265 270

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
275 280 285

25
Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
290 295 300

30
Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
305 310 315 320

35
His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
325 330 335

40
Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
340 345 350

45
Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
355 360 365

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
370 375 380

50
Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
385 390 395 400

55
Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
405 410 415

60
Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
420 425 430

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

5 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

10 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

15 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

20 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

25 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

30 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

35 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

40 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 7
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE

50 <400> 7

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

55 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

60 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

5

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

10

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

15

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

20

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

25

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

30

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

35

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

40

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

45

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

50

Ile Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

55

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

60

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

65

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

70

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

5 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

10 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

15 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

20 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

25 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

30 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

35 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

40 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

45 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

50 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

55 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

60 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

65 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

70 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

75 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly

	545				550					555				560		
5	Pro	Glu	His	Pro	Ser	His	Ile	Val	Leu	Pro	Ile	Ile	Lys	Arg		
					565					570						
10	<210>	8														
	<211>	574														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial														
15	<220>															
	<223>	Polipeptideo	Mutante	CocE												
	<400>	8														
20	Met	Val	Asp	Gly	Asn	Tyr	Ser	Val	Ala	Ser	Asn	Val	Met	Val	Pro	Met
	1				5					10					15	
	Arg	Asp	Gly	Val	Arg	Leu	Ala	Val	Asp	Leu	Tyr	Arg	Pro	Asp	Ala	Asp
				20					25					30		
25	Gly	Pro	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Val	Arg	Asn	Pro	Tyr	Asp	Lys	Phe	Asp
			35					40					45			
30	Val	Phe	Ala	Trp	Ser	Thr	Gln	Ser	Thr	Asn	Trp	Leu	Glu	Phe	Val	Arg
		50					55					60				
35	Asp	Gly	Tyr	Ala	Val	Val	Ile	Gln	Asp	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Ala	Ser
	65					70					75					80
40	Glu	Gly	Glu	Phe	Val	Pro	His	Val	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Ala	Glu	Asp
					85					90					95	
45	Thr	Leu	Ser	Trp	Ile	Leu	Glu	Gln	Ala	Trp	Cys	Asp	Gly	Asn	Val	Gly
				100					105						110	
50	Met	Phe	Gly	Val	Ser	Tyr	Leu	Gly	Val	Thr	Gln	Trp	Gln	Ala	Ala	Val
			115					120					125			
55	Ser	Gly	Val	Gly	Gly	Leu	Lys	Ala	Ile	Ala	Pro	Ser	Met	Ala	Ser	Ala
		130					135					140				
60	Asp	Leu	Tyr	Arg	Ala	Pro	Trp	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gly	Ala	Leu	Ser	Val
	145					150					155					160
	Glu	Ala	Leu	Leu	Gly	Trp	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Thr	Gly	Leu	Ile	Thr
				165						170					175	

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

5 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

10 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Leu Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

15 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

20 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

25 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

30 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

35 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

40 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

45 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

50 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

55 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

60 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

65 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

70 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

75 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr

			420					425					430			
5	Glu	Val	Leu	Thr	Asp	Pro	Val	Glu	Val	Thr	Gly	Thr	Val	Ser	Ala	Arg
			435					440					445			
10	Leu	Phe	Val	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Asp	Thr	Asp	Phe	Thr	Ala	Lys	Leu
		450					455					460				
15	Val	Asp	Val	Phe	Pro	Asp	Gly	Arg	Ala	Ile	Ala	Leu	Cys	Asp	Gly	Ile
	465					470					475					480
20	Val	Arg	Met	Arg	Tyr	Arg	Glu	Thr	Leu	Val	Asn	Pro	Thr	Leu	Ile	Glu
				485						490					495	
25	Ala	Gly	Glu	Ile	Tyr	Glu	Val	Ala	Ile	Asp	Met	Leu	Ala	Thr	Ser	Asn
				500						505					510	
30	Val	Phe	Leu	Pro	Gly	His	Arg	Ile	Met	Val	Gln	Val	Ser	Ser	Ser	Asn
			515					520					525			
35	Phe	Pro	Lys	Tyr	Asp	Arg	Asn	Ser	Asn	Thr	Gly	Gly	Val	Ile	Ala	Arg
		530					535					540				
40	Glu	Gln	Leu	Glu	Glu	Met	Cys	Thr	Ala	Val	Asn	Arg	Ile	His	Arg	Gly
	545					550					555					560
45	Pro	Glu	His	Pro	Ser	His	Ile	Val	Leu	Pro	Ile	Ile	Lys	Arg		
					565					570						
50	<210>	9														
	<211>	574														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial														
55	<220>															
	<223>	Polipeptideo Mutante CocE														
	<400>	9														
60	Met	Val	Asp	Gly	Asn	Tyr	Ser	Val	Ala	Ser	Asn	Val	Met	Val	Pro	Met
	1				5						10				15	
65	Arg	Asp	Gly	Val	Arg	Leu	Ala	Val	Asp	Leu	Tyr	Arg	Pro	Asp	Ala	Asp
				20					25					30		
70	Gly	Pro	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Val	Arg	Asn	Pro	Tyr	Asp	Lys	Phe	Asp
			35					40					45			

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

5 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

10 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

15 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

20 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

25 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

30 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

35 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

40 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

45 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

50 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

55 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

60 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

60 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr

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

				165					170					175			
5	Ser	Arg	Ser	Asp	Ala	Arg	Pro	Glu	Asp	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Gln	Leu	
				180					185					190			
10	Ala	Ala	Ile	Leu	Asn	Asp	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Val	Thr	Pro	Leu	
			195					200					205				
15	Ala	Glu	Gln	Pro	Leu	Leu	Gly	Arg	Leu	Ile	Pro	Trp	Val	Ile	Asp	Gln	
		210					215					220					
20	Val	Val	Asp	His	Pro	Asp	Asn	Asp	Glu	Ser	Trp	Gln	Ser	Ile	Ser	Leu	
	225					230					235					240	
25	Phe	Glu	Arg	Leu	Gly	Gly	Leu	Ala	Thr	Pro	Ala	Leu	Ile	Thr	Ala	Gly	
				245						250					255		
30	Trp	Tyr	Asp	Gly	Phe	Val	Gly	Glu	Ser	Leu	Arg	Thr	Phe	Val	Ala	Val	
			260					265						270			
35	Lys	Asp	Asn	Ala	Asp	Ala	Arg	Leu	Val	Val	Gly	Pro	Trp	Ser	His	Ser	
			275					280					285				
40	Asn	Leu	Thr	Gly	Arg	Asn	Ala	Asp	Arg	Lys	Phe	Gly	Ile	Ala	Ala	Thr	
	290						295					300					
45	Tyr	Pro	Ile	Gln	Glu	Ala	Thr	Thr	Met	His	Lys	Ala	Phe	Phe	Asp	Arg	
	305					310					315					320	
50	His	Leu	Arg	Gly	Glu	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala	Gly	Val	Pro	Lys	Val	Arg	
				325						330					335		
55	Leu	Phe	Val	Met	Gly	Ile	Asp	Glu	Trp	Arg	Asp	Glu	Thr	Asp	Trp	Pro	
			340					345						350			
60	Leu	Pro	Asp	Thr	Ala	Tyr	Thr	Pro	Phe	Tyr	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	
			355					360					365				
65	Ala	Asn	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	
		370				375						380					
70	Thr	Glu	Ser	Ala	Asp	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Pro	Ala	Asp	Pro	Val	Pro	
	385					390					395					400	
75	Ser	Leu	Gly	Gly	Thr	Leu	Leu	Phe	His	Asn	Gly	Asp	Asn	Gly	Pro	Ala	
				405						410					415		

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430
 5

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445
 10

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 15

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480
 20

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495
 25

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 30

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 35

Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 40

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 45

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570
 <210> 11
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 50
 <400> 11

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15
 55

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30
 60

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp

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

5 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

10 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

15 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

20 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

25 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

30 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

35 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

40 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

45 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

50 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

55 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

60 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

5

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

10

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

15

<210> 12
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Polipeptídeo Mutante CocE
 <400> 12

25

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

30

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

35

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

40

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

40

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

45

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

50

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

55

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

55

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

60

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

5

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

10

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

15

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

20

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

25

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

30

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

35

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

40

Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

45

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

50

<210> 13
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 13

60

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45
 5

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Gly Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60
 10

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80
 15

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95
 20

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110
 25

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125
 30

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140
 35

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160
 40

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175
 45

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190
 50

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205
 55

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220
 60

Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240
 65

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255
 70

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

5

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

10

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

15

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

20

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

25

Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

30

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

35

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

40

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

45

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

50

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

55

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

60

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

65

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

70

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

5 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

10 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560 560

15 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 14
 <211> 574
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE

25 <400> 14

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

30 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

35 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

40 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

45 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

50 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

55 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

60 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

5

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

10

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

15

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

20

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Ala Val Ile Asp Gln
 210 215 220

25

Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

30

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

35

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

40

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

45

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

50

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

55

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

60

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

65

Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

70

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

5 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

10 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

15 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

20 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

25 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

30 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

35 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

40 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

45 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

50 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

55 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 15
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE

<400> 15

60 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

5

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

10

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

15

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

20

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

25

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

30

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Ala Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

35

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

40

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

45

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

50

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

55

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

60

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

5 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

10 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

15 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

20 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

25 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

30 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

35 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

40 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

45 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

50 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

55 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

60 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn

	500	505	510
5	Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn 515	520	525
10	Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg 530	535	540
15	Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly 545	550	555 560
20	Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg 565	570	
25	<210> 16 <211> 574 <212> PRT <213> Artificial		
30	Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met 1	5	10 15
35	Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp 20	25	30
40	Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp 35	40	45
45	Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg 50	55	60
50	Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser 65	70	75 80
55	Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp 85	90	95
60	Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly 100	105	110
	Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val 115	120	125

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ala Met Ala Ser Ala
 130 135 140

5 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

10 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

15 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

20 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

25 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

30 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

35 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

40 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

45 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

50 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

55 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

60 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

5 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

10 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

15 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

20 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

25 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

30 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

35 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

40 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

45 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

50 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

55 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Leu Val Gln Leu
 180 185 190

60 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

65 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

70 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

75 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly

5 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 10 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 15 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 20 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570
 25 <210> 18
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 18
 35 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15
 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30
 40 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45
 45 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60
 50 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80
 55 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95
 60 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110
 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val

<400> 19

5 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

10 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

15 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

20 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

25 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

30 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

35 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

40 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

45 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

50 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

55 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

60 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

65 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

70 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

75 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

5 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Arg Ala Gly
 245 250 255

10 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

15 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

20 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

25 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

30 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

35 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

40 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

45 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

50 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

55 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

60 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

65 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

70 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

75 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
485 490 495

5 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
500 505 510

10 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
515 520 525

15 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
530 535 540

20 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
545 550 555 560

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
565 570

25
<210> 20
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

30
<220>
<223> Polipeptideo Mutante CocE

<400> 20

35 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
1 5 10 15

40 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
20 25 30

45 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Val Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
35 40 45

50 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
50 55 60

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
65 70 75 80

55 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
85 90 95

60 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
100 105 110

5 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

10 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

15 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

20 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

25 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

30 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

35 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

40 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

45 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

50 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

55 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

60 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

65 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

70 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

75 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

5

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

10

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

15

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

20

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

25

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

30

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

35

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

40

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

45

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

50

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

55

Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

60

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 21
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Polipeptideo Mutante CocE

5 <400> 21

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

10 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

15 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

20 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

25 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

30 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

35 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

40 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

45 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

50 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

55 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

60 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

5

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

10

Trp Tyr Asp Gly Phe Leu Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

15

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

20

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

25

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

30

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

35

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

40

Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

45

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

50

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

55

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

60

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

5 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

10 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

15 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

20 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

25 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

30 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

30 <210> 22
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 22

40 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

45 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

50 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

55 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

60 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

65 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

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

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

5 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

10 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

15 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

20 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

25 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

30 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

35 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

40 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

45 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

50 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Gly Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

55 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

60 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 23

<211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE

<400> 23

10 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

15 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

20 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

25 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

30 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

35 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

40 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

45 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp His Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

50 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

55 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

60 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

5 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

10 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

15 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

20 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

25 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

30 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

35 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

40 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

45 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

50 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

55 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

60 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

65 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

70 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

75 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu

	450		455		460														
5	Val 465	Asp	Val	Phe	Pro	Asp 470	Gly	Arg	Ala	Ile	Ala 475	Leu	Cys	Asp	Gly	Ile 480			
10	Val	Arg	Met	Arg	Tyr 485	Arg	Glu	Thr	Leu	Val 490	Asn	Pro	Thr	Leu	Ile 495	Glu			
15	Ala	Gly	Glu	Ile	Tyr 500	Glu	Val	Ala	Ile 505	Asp	Met	Leu	Ala	Thr	Ser	Asn 510			
20	Val	Phe	Leu	Pro	Gly	His	Arg	Ile 520	Met	Val	Gln	Val	Ser 525	Ser	Ser	Asn			
25	Phe	Pro	Lys	Tyr	Asp	Arg	Asn 535	Ser	Asn	Thr	Gly	Gly 540	Val	Ile	Ala	Arg			
30	Glu	Gln	Leu	Glu	Glu	Met 550	Cys	Thr	Ala	Val	Asn 555	Arg	Ile	His	Arg	Gly 560			
35	Pro	Glu	His	Pro	Ser 565	His	Ile	Val	Leu	Pro 570	Ile	Ile	Lys	Arg					
	<210>	24																	
	<211>	574																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Artificial																	
	<220>																		
	<223>	Polipeptideo Mutante CocE																	
40	<400>	24																	
45	Met 1	Val	Asp	Gly	Asn 5	Tyr	Ser	Val	Ala	Ser 10	Asn	Val	Met	Val	Pro 15	Met			
50	Arg	Asp	Gly	Val 20	Arg	Leu	Ala	Val	Asp 25	Leu	Tyr	Arg	Pro	Asp 30	Ala	Asp			
55	Gly	Pro	Val 35	Pro	Val	Leu	Leu	Val 40	Arg	Asn	Pro	Tyr	Asp 45	Lys	Phe	Asp			
60	Val	Phe 50	Ala	Trp	Ser	Thr	Gln 55	Ser	Thr	Asn	Trp	Leu 60	Glu	Phe	Val	Arg			
	Asp 65	Gly	Tyr	Ala	Val	Val 70	Ile	Gln	Asp	Thr	Arg 75	Gly	Leu	Phe	Ala	Ser 80			

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

				325						330						335	
5	Leu	Phe	Val	Met	Gly	Ile	Asp	Glu	Trp	Arg	Asp	Glu	Thr	Asp	Trp	Pro	
				340					345					350			
10	Leu	Pro	Asp	Thr	Ala	Tyr	Thr	Pro	Phe	Tyr	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	
			355					360					365				
15	Ala	Asn	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	
		370					375					380					
20	Thr	Glu	Ser	Ala	Asp	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Pro	Ala	Asp	Pro	Val	Pro	
	385					390				395						400	
25	Ser	Leu	Gly	Gly	Thr	Leu	Leu	Phe	His	Asn	Gly	Asp	Asn	Gly	Pro	Ala	
					405					410					415		
30	Asp	Gln	Arg	Pro	Ile	His	Asp	Arg	Asp	Asp	Val	Leu	Cys	Tyr	Ser	Thr	
				420					425					430			
35	Glu	Val	Leu	Thr	Asp	Pro	Val	Glu	Val	Thr	Gly	Thr	Val	Ser	Ala	Arg	
			435					440					445				
40	Leu	Phe	Val	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Asp	Thr	Asp	Phe	Thr	Ala	Lys	Leu	
		450					455					460					
45	Val	Asp	Val	Phe	Pro	Asp	Gly	Arg	Ala	Ile	Ala	Leu	Cys	Asp	Gly	Ile	
	465					470					475					480	
50	Val	Arg	Met	Arg	Tyr	Arg	Glu	Thr	Leu	Val	Asn	Pro	Thr	Leu	Ile	Glu	
					485						490				495		
55	Ala	Gly	Glu	Ile	Tyr	Glu	Val	Ala	Ile	Asp	Met	Leu	Ala	Thr	Ser	Asn	
				500					505					510			
60	Val	Phe	Leu	Pro	Gly	His	Arg	Ile	Met	Val	Gln	Val	Ser	Ser	Ser	Asn	
			515					520					525				
65	Phe	Pro	Lys	Tyr	Asp	Arg	Asn	Ser	Asn	Thr	Gly	Gly	Val	Ile	Ala	Arg	
		530					535					540					
70	Glu	Gln	Leu	Glu	Glu	Met	Cys	Thr	Ala	Val	Asn	Arg	Ile	His	Arg	Gly	
	545					550					555					560	
75	Pro	Glu	His	Pro	Ser	His	Ile	Val	Leu	Pro	Ile	Ile	Lys	Arg			
					565					570							

<210> 25
 <211> 574
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 10 <223> Polipeptideo Mutante CocE

 <400> 25

 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95
 35

 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

 40

 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

 45

 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

 50

 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Arg Gly Leu Ile Thr
 165 170 175
 55

 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

 60

 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu

	195	200	205
5	Ala 210	Glu 215	Gln 220
10	Val 225	Val 230	Asp 235
15	Phe 260	Glu 265	Arg 270
20	Lys 275	Asp 280	Asn 285
25	Asn 290	Leu 295	Thr 300
30	Tyr 305	Pro 310	Ile 315
35	His 325	Leu 330	Arg 335
40	Leu 340	Pro 345	Thr 350
45	Ala 370	Asn 375	Thr 380
50	Thr 385	Glu 390	Ser 395
55	Ser 405	Leu 410	Gly 415
60	Glu 435	Val 440	Thr 445

5 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

10 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

15 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

20 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

25 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

30 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

35 <210> 26
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 26

45 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

50 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

55 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

60 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser

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

5 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

10 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

15 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

20 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

25 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

30 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

35 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

40 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

45 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

50 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

55 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

60 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

65 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

70 Phe Pro Lys Phe Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

75 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

5

<210> 27
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE

<400> 27

15

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

20

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

25

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

30

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Ser Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

35

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

40

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

45

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

50

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

55

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

60

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

5 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

10 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

15 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

20 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

25 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

30 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

35 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

40 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

45 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

50 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

55 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

60 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

65 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

70 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

75 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

5

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

10

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

15

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

20

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

25

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

30

Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

35

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

40

<210> 28
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 28

50

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

55

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

60

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80
 5

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

10 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

15 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

20 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

25 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

30 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

35 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

40 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

45 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

50 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

55 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Thr Ser His Ser
 275 280 285

60 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

5

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

10

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

15

Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

20

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

25

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

30

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

35

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

40

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

45

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

50

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

55

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

60

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

65

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

70

Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

5 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 29
 10 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 15 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 29

20 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

25 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

30 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

35 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

40 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

45 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

50 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

55 Asp Pro Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

60 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190
 5
 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205
 10
 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220
 15
 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240
 20
 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255
 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270
 25
 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285
 30
 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300
 35
 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320
 40
 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335
 45
 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350
 50
 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365
 55
 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380
 60
 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

5 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

10 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

15 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

20 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

25 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

30 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

35 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

40 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 30
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE

<400> 30

50 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

55 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

60 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

5

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

10

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

15

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

20

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

25

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

30

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

35

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

40

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

45

Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

50

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

55

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

60

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

5 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

10 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

15 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

20 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

25 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

30 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

35 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

40 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

45 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

50 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

55 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

60 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

Phe Pro Lys Tyr Ser Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg

	530		535		540														
5	Glu 545	Gln	Leu	Glu	Glu	Met 550	Cys	Thr	Ala	Val	Asn 555	Arg	Ile	His	Arg	Gly 560			
10	Pro	Glu	His	Pro	Ser 565	His	Ile	Val	Leu	Pro 570	Ile	Ile	Lys	Arg					
	<210>	31																	
	<211>	574																	
	<212>	PRT																	
15	<213>	Artificial																	
	<220>																		
	<223>	Polipeptideo Mutante CocE																	
20	<400>	31																	
	Met	Val	Asp	Gly	Asn	Tyr	Ser	Val	Ala	Ser	Asn	Val	Met	Val	Pro	Met			
	1				5					10					15				
25	Arg	Asp	Gly	Val	Arg	Leu	Ala	Val	Asp	Leu	Tyr	Arg	Pro	Asp	Ala	Asp			
				20					25					30					
30	Gly	Pro	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Val	Arg	Asn	Pro	Tyr	Asp	Lys	Phe	Asp			
			35					40					45						
35	Val	Phe	Ala	Trp	Ser	Thr	Gln	Ser	Thr	Asn	Trp	Leu	Glu	Phe	Val	Arg			
		50					55					60							
40	Asp	Gly	Tyr	Ala	Val	Val	Ile	Gln	Asp	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Ala	Ser			
	65					70					75					80			
45	Glu	Gly	Glu	Phe	Val	Pro	His	Val	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Ala	Glu	Asp			
					85				90						95				
50	Thr	Leu	Ser	Trp	Ile	Leu	Glu	Gln	Ala	Trp	Cys	Asp	Gly	Asn	Val	Gly			
				100					105					110					
55	Met	Phe	Gly	Val	Ser	Tyr	Leu	Gly	Val	Thr	Gln	Trp	Gln	Ala	Ala	Val			
			115					120					125						
60	Ser	Gly	Val	Gly	Gly	Leu	Lys	Ala	Ile	Ala	Pro	Ser	Met	Ala	Ser	Ala			
		130					135					140							
60	Asp	Leu	Tyr	Arg	Ala	Pro	Trp	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gly	Ala	Leu	Ser	Val			
	145					150					155					160			

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

5 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

10 Ala Arg Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

15 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

20 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

25 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

30 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

35 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

40 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

45 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

50 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

55 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

60 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

5 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

10 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

15 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

20 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

25 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

30 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

35 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gln Leu Ile Thr
 165 170 175

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

40 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

45 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

50 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

55 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

60 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser

	275		280		285														
5	Asn 290	Leu	Thr	Gly	Arg	Asn	Ala 295	Asp	Arg	Lys	Phe	Gly 300	Ile	Ala	Ala	Thr			
10	Tyr 305	Pro	Ile	Gln	Glu	Ala 310	Thr	Thr	Met	His	Lys 315	Ala	Phe	Phe	Asp	Arg 320			
15	His	Leu	Arg	Gly	Glu 325	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala 330	Gly	Val	Pro	Lys	Val 335	Arg			
20	Leu	Phe	Val	Met 340	Gly	Ile	Asp	Glu	Trp 345	Arg	Asp	Glu	Thr	Asp 350	Trp	Pro			
25	Ala	Asn 370	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly 375	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr 380	Ser	Ile	Ser	Gly			
30	Thr 385	Glu	Ser	Ala	Asp	Thr 390	Tyr	Leu	Tyr	Asp 395	Pro	Ala	Asp	Pro	Val	Pro 400			
35	Ser	Leu	Gly	Gly	Thr 405	Leu	Leu	Phe	His	Asn 410	Gly	Asp	Asn	Gly	Pro 415	Ala			
40	Asp	Gln	Arg	Pro 420	Ile	His	Asp	Arg	Asp 425	Asp	Val	Leu	Cys	Tyr 430	Ser	Thr			
45	Glu	Val	Leu 435	Thr	Asp	Pro	Val	Glu 440	Val	Thr	Gly	Thr	Val 445	Ser	Ala	Arg			
50	Leu	Phe 450	Val	Ser	Ser	Ser	Ala 455	Val	Asp	Thr	Asp	Phe 460	Thr	Ala	Lys	Leu			
55	Val 465	Asp	Val	Phe	Pro	Asp 470	Gly	Arg	Ala	Ile	Ala 475	Leu	Cys	Asp	Gly	Ile 480			
60	Val	Arg	Met	Arg	Tyr 485	Arg	Glu	Thr	Leu	Val 490	Asn	Pro	Thr	Leu	Ile 495	Glu			
65	Ala	Gly	Glu	Ile 500	Tyr	Glu	Val	Ala	Ile 505	Asp	Met	Leu	Ala	Thr 510	Ser	Asn			
70	Val	Phe	Leu 515	Pro	Gly	His	Arg	Ile 520	Met	Val	Gln	Val	Ser 525	Ser	Ser	Asn			

5 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

10 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

15 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

15 <210> 33
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 33

25 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

30 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

35 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

40 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

45 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

50 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

55 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

60 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

65 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

70 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val

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

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415
 5

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

10
 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

15
 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

20
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Thr Asp Gly Ile
 465 470 475 480

25
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

30
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

35
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

40
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

45
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

50
 <210> 34
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE

55
 <400> 34

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

60
 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp

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

5 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

10 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

15 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

20 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

25 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

30 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

35 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

40 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

45 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

50 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

55 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

60 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

65 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

70 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

75 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

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

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

5

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

10

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

15

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

20

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

25

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

30

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

35

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

40

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

45

Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

50

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

55

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 36
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 36

60

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 5 20 25 30

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

10 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

15 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

20 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

25 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

Met Phe Gly Val Ser Tyr Ala Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 30 115 120 125

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

35 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

40 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 45 180 185 190

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

50 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

55 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

60 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

5

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

10

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

15

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

20

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

25

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

30

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

35

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

40

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

45

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

50

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

55

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

60

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
500 505 510

5 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
515 520 525

10 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
530 535 540

15 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
545 550 555 560

20 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
565 570

25 <210> 37
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Polipeptideo Mutante CocE

<400> 37

35 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
1 5 10 15

40 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
20 25 30

45 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Ala Phe Asp
35 40 45

50 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
50 55 60

55 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
65 70 75 80

60 Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
85 90 95

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
100 105 110

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
115 120 125

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

5

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

10

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

15

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

20

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

25

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

30

Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

35

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

40

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

45

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

50

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

55

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

60

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

65

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

70

Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

5 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

10 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

15 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

20 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

25 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

30 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

35 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

40 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

45 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

50 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

55 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 38
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE

60 <400> 38

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

5 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

10 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

15 Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

20 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

Glu Gly Glu Tyr Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

25 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

30 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

35 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

40 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

45 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190

50 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

55 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

60 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

5 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

10 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

15 Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

20 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

25 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

30 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

35 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

40 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

45 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

50 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

55 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

60 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu

				485						490						495
5	Ala	Gly	Glu	Ile	Tyr	Glu	Val	Ala	Ile	Asp	Met	Leu	Ala	Thr	Ser	Asn
				500					505					510		
10	Val	Phe	Leu	Pro	Gly	His	Arg	Ile	Met	Val	Gln	Val	Ser	Ser	Ser	Asn
			515					520					525			
15	Phe	Pro	Lys	Tyr	Asp	Arg	Asn	Ser	Asn	Thr	Gly	Gly	Val	Ile	Ala	Arg
	530						535					540				
20	Glu	Gln	Leu	Glu	Glu	Met	Cys	Thr	Ala	Val	Asn	Arg	Ile	His	Arg	Gly
	545					550					555					560
25	Pro	Glu	His	Pro	Ser	His	Ile	Val	Leu	Pro	Ile	Ile	Lys	Arg		
					565					570						
	<210>		39													
	<211>		587													
	<212>		PRT													
	<213>		Artificial													
	<220>															
30	<223>		Polipeptideo Mutante CocE													
	<400>		39													
35	Met	Val	Asp	Gly	Asn	Tyr	Ser	Val	Ala	Ser	Asn	Val	Met	Val	Pro	Met
	1				5					10					15	
40	Arg	Asp	Gly	Val	Arg	Leu	Ala	Val	Asp	Leu	Tyr	Arg	Pro	Asp	Ala	Asp
				20					25					30		
45	Gly	Pro	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Val	Arg	Asn	Pro	Tyr	Asp	Lys	Phe	Asp
			35					40					45			
50	Val	Phe	Ala	Trp	Ser	Thr	Gln	Ser	Thr	Asn	Trp	Leu	Glu	Phe	Val	Arg
	50						55					60				
55	Asp	Gly	Tyr	Ala	Val	Val	Ile	Gln	Asp	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Ala	Ser
	65					70					75					80
60	Glu	Gly	Glu	Phe	Val	Pro	His	Val	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Ala	Glu	Asp
					85					90					95	
	Thr	Leu	Ser	Trp	Ile	Leu	Glu	Gln	Ala	Trp	Cys	Asp	Gly	Asn	Val	Gly
				100					105						110	

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Polipeptideo Mutante CocE

<400> 40

10 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30
 15

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45
 20

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60
 25

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95
 30

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110
 35

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125
 40

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140
 45

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Arg Gly Leu Ile Thr
 165 170 175
 50

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190
 55

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205
 60

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln

	210		215		220												
5	Val 225	Val	Asp	His	Pro	Asp 230	Asn	Asp	Glu	Ser	Trp 235	Gln	Ser	Ile	Ser	Leu 240	
10	Phe	Glu	Arg	Leu	Gly 245	Gly	Leu	Ala	Thr	Pro 250	Ala	Leu	Ile	Thr	Ala 255	Gly	
15	Trp	Tyr	Asp	Gly 260	Phe	Val	Gly	Glu	Ser 265	Leu	Arg	Thr	Phe	Val 270	Ala	Val	
20	Lys	Asp	Asn 275	Ala	Asp	Ala	Arg	Leu 280	Val	Val	Gly	Pro	Trp 285	Ser	His	Ser	
25	Asn	Leu	Thr 290	Gly	Arg	Asn	Ala 295	Asp	Arg	Lys	Phe	Gly 300	Ile	Ala	Ala	Thr	
30	Tyr 305	Pro	Ile	Gln	Glu	Ala 310	Thr	Thr	Met	His	Lys 315	Ala	Phe	Phe	Asp	Arg 320	
35	His	Leu	Arg	Gly 325	Glu	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala 330	Gly	Val	Pro	Lys	Val 335	Arg	
40	Leu	Phe	Val	Met 340	Gly	Ile	Asp	Glu	Trp 345	Arg	Asp	Glu	Thr	Asp 350	Trp	Pro	
45	Leu	Pro	Asp 355	Thr	Ala	Tyr	Thr	Pro 360	Phe	Tyr	Leu	Gly 365	Gly	Ser	Gly	Ala	
50	Ala	Asn 370	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly 375	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr 380	Ser	Ile	Ser	Gly	
55	Thr 385	Glu	Ser	Ala	Asp	Thr 390	Tyr	Leu	Tyr	Asp 395	Pro	Ala	Asp	Pro	Val	Pro 400	
60	Ser	Leu	Gly	Gly 405	Thr	Leu	Leu	Phe	His	Asn 410	Gly	Asp	Asn	Gly	Pro 415	Ala	
65	Asp	Gln	Arg	Pro 420	Ile	His	Asp	Arg	Asp 425	Asp	Val	Leu	Cys	Tyr 430	Ser	Thr	
70	Glu	Val	Leu	Thr 435	Asp	Pro	Val	Glu 440	Val	Thr	Gly	Thr 445	Val	Ser	Ala	Arg	
75	Leu	Phe	Val	Ser	Ser	Ser	Ala 455	Val	Asp	Thr	Asp 460	Phe	Thr	Ala	Lys	Leu	

5 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

10 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

15 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

20 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

25 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

30 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Lys Leu
 565 570 575

35 Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 580 585

35 <210> 41
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 41

45 Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

50 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

55 Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

60 Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser

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

5 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

10 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

15 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

20 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

25 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

30 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

35 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

40 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

45 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

50 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

55 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

60 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

65 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

70 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

75 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Lys Leu
 565 570 575

5

Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 580 585

10

<210> 42
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 42

20

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

25

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

30

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

35

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

40

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

45

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

50

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

55

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

60

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190
 5

Ala Ala Ile Leu Lys Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205
 10

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220
 15

Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240
 20

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255
 25

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270
 30

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285
 35

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300
 40

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320
 45

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335
 50

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350
 55

Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365
 60

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380
 65

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400
 70

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

5

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

10

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

15

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

20

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

25

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

30

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

35

Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

40

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Leu Glu
 565 570 575

45

His His His His His His
 580

50

<210> 43
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> Polipeptideo Mutante CocE
 <400> 43

60

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45
 5

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60
 10

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80
 15

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95
 20

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110
 25

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125
 30

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140
 35

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160
 40

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175
 45

Ser Arg Ser Asp Ala Lys Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
 180 185 190
 50

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205
 55

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220
 60

Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240
 65

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255
 70

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

5

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

10

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

15

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

20

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

25

Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

30

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

35

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

40

Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

45

Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

50

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

55

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

60

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

65

Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

70

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

5

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

10

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

15

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Lys Val Gln Leu
 180 185 190

20

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

25

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

30

Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

35

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

40

Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

45

Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

50

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

55

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

60

His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335

Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350

Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365

Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380

5 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400

10 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415

15 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

20 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

25 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

30 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

35 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

40 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

45 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

50 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Leu Glu
 565 570 575

55 His His His His His His
 580

60 <210> 45
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Polipeptideo Mutante CocE

<400> 45

5

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15

10

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

15

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
 35 40 45

20

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
 50 55 60

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
 65 70 75 80

25

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

30

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

35

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

40

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

45

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

50

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Lys Gln Leu
 180 185 190

55

Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

60

Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

	Val	Val	Asp	His	Pro	Asp	Asn	Asp	Glu	Ser	Trp	Gln	Ser	Ile	Ser	Leu
	225					230					235					240
5	Phe	Glu	Arg	Leu	Gly	Gly	Leu	Ala	Thr	Pro	Ala	Leu	Ile	Thr	Ala	Gly
					245					250					255	
10	Trp	Tyr	Asp	Gly	Phe	Val	Gly	Glu	Ser	Leu	Arg	Thr	Phe	Val	Ala	Val
				260					265					270		
15	Lys	Asp	Asn	Ala	Asp	Ala	Arg	Leu	Val	Val	Gly	Pro	Trp	Ser	His	Ser
			275					280					285			
20	Asn	Leu	Thr	Gly	Arg	Asn	Ala	Asp	Arg	Lys	Phe	Gly	Ile	Ala	Ala	Thr
	290						295					300				
25	Tyr	Pro	Ile	Gln	Glu	Ala	Thr	Thr	Met	His	Lys	Ala	Phe	Phe	Asp	Arg
	305					310					315					320
30	His	Leu	Arg	Gly	Glu	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala	Gly	Val	Pro	Lys	Val	Arg
					325					330					335	
35	Leu	Phe	Val	Met	Gly	Ile	Asp	Glu	Trp	Arg	Asp	Glu	Thr	Asp	Trp	Pro
				340					345					350		
40	Leu	Pro	Asp	Thr	Ala	Tyr	Thr	Pro	Phe	Tyr	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala
			355					360					365			
45	Ala	Asn	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly
	370						375					380				
50	Thr	Glu	Ser	Ala	Asp	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Pro	Ala	Asp	Pro	Val	Pro
	385					390					395					400
55	Ser	Leu	Gly	Gly	Thr	Leu	Leu	Phe	His	Asn	Gly	Asp	Asn	Gly	Pro	Ala
					405					410					415	
60	Asp	Gln	Arg	Pro	Ile	His	Asp	Arg	Asp	Asp	Val	Leu	Cys	Tyr	Ser	Thr
				420					425					430		
65	Glu	Val	Leu	Thr	Asp	Pro	Val	Glu	Val	Thr	Gly	Thr	Val	Ser	Ala	Arg
			435					440					445			
70	Leu	Phe	Val	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Asp	Thr	Asp	Phe	Thr	Ala	Lys	Leu
	450						455					460				
75	Val	Asp	Val	Phe	Pro	Asp	Gly	Arg	Ala	Ile	Ala	Leu	Cys	Asp	Gly	Ile

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
 85 90 95

5 Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
 100 105 110

10 Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
 115 120 125

15 Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
 130 135 140

20 Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
 145 150 155 160

25 Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
 165 170 175

30 Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Lys Leu
 180 185 190

35 Ala Ala Ile Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val Thr Pro Leu
 195 200 205

40 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly Arg Leu Ile Pro Trp Val Ile Asp Gln
 210 215 220

45 Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu
 225 230 235 240

50 Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 245 250 255

55 Trp Tyr Asp Gly Phe Val Gly Glu Ser Leu Arg Thr Phe Val Ala Val
 260 265 270

60 Lys Asp Asn Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp Ser His Ser
 275 280 285

65 Asn Leu Thr Gly Gln Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300

70 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320

75 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg

				325						330						335	
5	Leu	Phe	Val	Met	Gly	Ile	Asp	Glu	Trp	Arg	Asp	Glu	Thr	Asp	Trp	Pro	
				340					345					350			
10	Leu	Pro	Asp	Thr	Ala	Tyr	Thr	Pro	Phe	Tyr	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	
			355					360					365				
15	Ala	Asn	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	
		370					375					380					
20	Thr	Glu	Ser	Ala	Asp	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Pro	Ala	Asp	Pro	Val	Pro	
	385					390					395					400	
25	Ser	Leu	Gly	Gly	Thr	Leu	Leu	Phe	His	Asn	Gly	Asp	Asn	Gly	Pro	Ala	
					405					410					415		
30	Asp	Gln	Arg	Pro	Ile	His	Asp	Arg	Asp	Asp	Val	Leu	Cys	Tyr	Ser	Thr	
				420					425					430			
35	Glu	Val	Leu	Thr	Asp	Pro	Val	Glu	Val	Thr	Gly	Thr	Val	Ser	Ala	Arg	
			435					440					445				
40	Leu	Phe	Val	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Asp	Thr	Asp	Phe	Thr	Ala	Lys	Leu	
		450					455					460					
45	Val	Asp	Val	Phe	Pro	Asp	Gly	Arg	Ala	Ile	Ala	Leu	Cys	Asp	Gly	Ile	
	465					470					475					480	
50	Val	Arg	Met	Arg	Tyr	Arg	Glu	Thr	Leu	Val	Asn	Pro	Thr	Leu	Ile	Glu	
					485						490				495		
55	Ala	Gly	Glu	Ile	Tyr	Glu	Val	Ala	Ile	Asp	Met	Leu	Ala	Thr	Ser	Asn	
				500					505					510			
60	Val	Phe	Leu	Pro	Gly	His	Arg	Ile	Met	Val	Gln	Val	Ser	Ser	Ser	Asn	
		515						520					525				
65	Phe	Pro	Lys	Tyr	Asp	Arg	Asn	Ser	Asn	Thr	Gly	Gly	Val	Ile	Ala	Arg	
		530					535					540					
70	Glu	Gln	Leu	Glu	Glu	Met	Cys	Thr	Ala	Val	Asn	Arg	Ile	His	Arg	Gly	
	545					550					555					560	
75	Pro	Glu	His	Pro	Ser	His	Ile	Val	Leu	Pro	Ile	Ile	Lys	Arg	Leu	Glu	
					565					570					575		

His His His His His His
580

5

<210> 47
<211> 582
<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>
<223> Polipeptideo Mutante CocE

15 <400> 47

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
1 5 10 15

20

Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
20 25 30

25

Gly Pro Val Pro Val Leu Leu Val Arg Asn Pro Tyr Asp Lys Phe Asp
35 40 45

30

Val Phe Ala Trp Ser Thr Gln Ser Thr Asn Trp Leu Glu Phe Val Arg
50 55 60

35

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
65 70 75 80

Glu Gly Glu Phe Val Pro His Val Asp Asp Glu Ala Asp Ala Glu Asp
85 90 95

40

Thr Leu Ser Trp Ile Leu Glu Gln Ala Trp Cys Asp Gly Asn Val Gly
100 105 110

45

Met Phe Gly Val Ser Tyr Leu Gly Val Thr Gln Trp Gln Ala Ala Val
115 120 125

50

Ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala
130 135 140

55

Asp Leu Tyr Arg Ala Pro Trp Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Leu Ser Val
145 150 155 160

Glu Ala Leu Leu Gly Trp Ser Ala Leu Ile Gly Thr Gly Leu Ile Thr
165 170 175

60

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu

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

5 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445

10 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460

15 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480

20 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495

25 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510

30 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525

35 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540

40 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560

45 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Leu Glu
 565 570 575

50 His His His His His His
 580

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo de esterase de cocaína mutante isolado (CocE) caracterizado por compreender uma seqüência de aminoácidos de Id. de Seq. N°: 1, em que pelo menos um
5 resíduo de aminoácido é substituído de modo que o polipeptídeo de CocE mutante tem atividade de esterase com termoestabilidade aumentada a 37°C quando comparado a CocE de tipo selvagem.

2. Polipeptídeo de CocE isolado, de acordo com a
10 reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos dois resíduos de aminoácidos são substituídos.

3. Polipeptídeo de CocE isolado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que pelo menos três resíduos de aminoácidos são substituídos.

15 4. Polipeptídeo de CocE isolado, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que pelo menos quatro resíduos de aminoácidos são substituídos.

5. Polipeptídeo de CocE isolado, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que pelo menos
20 cinco resíduos de aminoácidos são substituídos.

6. Polipeptídeo de esterase de cocaína mutante isolado caracterizado por compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em Id. de Seq. N°: 3 (L163V); Id. de Seq. N°: 7 (V225I); Id. de Seq.
25 N°: 8 (I218L); Id. de Seq. N°: 9 (A310D); Id. de Seq. N°: 10 (A149S); Id. de Seq. N°: 11 (S159A); Id. de Seq. N°: 12 (S265A); Id. de Seq. N°: 13 (S56G); Id. de Seq. N°: 14 (W220A); Id. de Seq. N°: 16 (S140A); Id. de Seq. N°: 17 (F189L); Id. de Seq. N°: 18 (A193D); Id. de Seq. N°: 19
30 (T254R); Id. de Seq. N°: 20 (N42V); Id. de Seq. N°: 21

(V262L); Id. de Seq. N°: 22 (L508G); Id. de Seq. N°: 23 (Y152H); Id. de Seq. N°: 24 (V160A); Id. de Seq. N°: 25 (T172R); Id. de Seq. N°: 26 (Y532F); Id. de Seq. N°: 27 (T74S); Id. de Seq. N°: 28 (W285T); Id. de Seq. N°: 29 (L146P); Id. de Seq. N°: 30 (D533S); Id. de Seq. N°: 31 (A194R); Id. de Seq. N°: 32 (G173Q); Id. de Seq. N°: 33 (C477T); Id. de Seq. N°: 34 (K531A); Id. de Seq. N°: 35 (R41I); Id. de Seq. N°: 36 (L119A); Id. de Seq. N°: 37 (K46A); Id. de Seq. N°: 38 (F84Y), Id. de Seq. N°: 39 (T172R-G173Q); Id. de Seq. N°: 40 (L169K); Id. de Seq. N°: 41 (F189A), Id. de Seq. N°: 42 (N197K), Id. de Seq. N°: 43 (R182K), Id. de Seq. N°: 44 (F189K), Id. de Seq. N°: 45 (V190K), Id. de Seq. N°: 46 (Q191K), e Id. de Seq. N°: 47 (A194K), ou um fragmento funcional dessas.

15 7. Ácido nucleico isolado caracterizado por codificar o polipeptídeo de CocE mutante de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

 8. Ácido nucleico isolado caracterizado por compreender uma seqüência de nucleotídeos que hibridiza a
20 Id. de Seq. N°: 2 ou o complemento de Id. de Seq. N°: 2 sob condições altamente controladas, em que o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo de CocE mutante que tem atividade de esterase com termoestabilidade aumentada a 37°C quando comparado a CocE de tipo selvagem.

25 9. Ácido nucleico isolado caracterizado por codificar um polipeptídeo de CocE mutante que compreende uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos 85% de identidade de seqüência com a seqüência de ácidos nucleicos de Id. de Seq. N°: 2, em que o polipeptídeo de CocE mutante
30 codificado tem atividade de esterase com termoestabilidade

aumentada a 37°C quando comparado a CocE de tipo selvagem.

10. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a identidade de seqüência é selecionada do grupo que consiste em pelo menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, e 99%.

11. Polipeptídeo ou ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que o aumento da termoestabilidade do polipeptídeo de CocE mutante sobre CocE de tipo selvagem é pelo menos de cerca de 2,1 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,2 kcal/mol, at leist cerca de 2,3 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,4 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,5 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,6 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,7 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,8 kcal/mol, pelo menos cerca de 2,9 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,0 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,1 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,2 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,3 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,4 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,5 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,6 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,7 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,8 kcal/mol, pelo menos cerca de 3,9 kcal/mol, pelo menos cerca de 4,0 kcal/mol, pelo menos cerca de 4,1 kcal/mol, pelo menos cerca de 4,2 kcal/mol, pelo menos cerca de 4,3 kcal/mol, pelo menos cerca de 4,4 kcal/mol, ou pelo menos cerca de 4,5 kcal/mol.

12. Polipeptídeo ou o ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de CocE mutante tem imunogenicidade reduzida quando comparado

a CocE de tipo selvagem.

13. Polipeptídeo ou o ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de CocE mutante tem pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 100%, pelo menos cerca de 105%, pelo menos cerca de 110%, pelo menos cerca de 115%, pelo menos cerca de 120%, pelo menos cerca de 125%, pelo menos cerca de 130%, pelo menos cerca de 135%, ou pelo menos cerca de 140% da atividade de esterase de polipeptídeo de CocE de tipo selvagem.

14. Polipeptídeo ou o ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de CocE mutante retém pelo menos substancialmente a mesma eficiência catalítica ou maior de polipeptídeo de CocE de tipo selvagem.

15. Composição farmacêutica caracterizada por compreender o polipeptídeo de CocE mutante ou o polipeptídeo de CocE mutante codificado pelo ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

16. Polipeptídeo, polipeptídeo codificado pelo ácido nucleico, ou composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que o

polipeptídeo de CocE mutante é peguilado.

17. Polipeptídeo, polipeptídeo codificado pelo ácido nucleico, ou composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 5 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizado pelo fato de o polipeptídeo de CocE mutante é encapsulado em uma hemácea.

18. Polipeptídeo, polipeptídeo codificado pelo ácido nucleico, ou composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de CocE mutante é estabilizado por um substrato ou inibidor.

19. Polipeptídeo, polipeptídeo codificado pelo ácido nucleico, ou a composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 15 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo compreende uma pluralidade de substituições de resíduo de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em: T122A; 123E; S159A; S140A; 20 S167A/W52L; T172R; V121D; L163V; F189A; F189A/T172R; C107S; W220A; F189L; A193D; T172R/A193D; G173Q; T254R; N42V; T172R/G173Q; G171Q/T172R/G173Q; G171A; G173A; wt-1175-G-D185; wt-T176-G-G-D185; T172R/G173Q-1175-GD185; T172R/G173Q-1175-G-G-A186; T172R/G173Q-T176-G-G-D185; 25 S177Q; D45R; F47R; L169K; L174R; A181K; S179R; F189K; V190K; A194K; e R182K.

20. Método de tratamento de uma condição induzida por cocaína caracterizado por compreender a administração a um indivíduo que necessita de uma quantidade eficaz do 30 polipeptídeo de CocE mutante, o polipeptídeo de CocE

mutante codificado pelo ácido nucleico, ou a composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações 1-19.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a condição induzida por cocaína é selecionada do grupo que consiste em overdose de cocaína, toxicidade por cocaína, dependência de cocaína, e vício de cocaína.

22. Método de rastreamento de alto rendimento para a identificação de polipeptídeos de CocE mutante termoestáveis caracterizado por compreender as etapas de:

transformação estável de uma célula com um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de CocE mutante;

expressão do polipeptídeo de CocE mutante na célula;

isolação do polipeptídeo de CocE expresso;

medição da atividade de esterase do polipeptídeo de CocE mutante isolado em uma ou mais temperaturas predeterminadas de pelo menos cerca de 30°C até cerca de 50°C para determinar a termoestabilidade dos polipeptídeos de CocE mutante isolados;

seleção de polipeptídeo de CocE mutante isolado com atividade de esterase na temperatura(s) predeterminada(s).

23. Método de rastreamento de alto rendimento, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a medição da atividade de esterase dos polipeptídeos mutantes isolados compreende:

o contato do polipeptídeo de CocE mutante isolado com (i) cocaína e um indicador de pH ou (ii) um tio-derivado de cocaína e um indicador de tiol;

detecção de uma mudança no indicador de pH ou indicador de tiol; em que uma mudança no indicador de pH ou

indicador de tiol está correlacionada com a formação de ácido benzóico a partir da hidrólise de cocaína ou derivado de cocaína pelo polipeptídeo de CocE mutante.

24. Método de rastreamento de alto rendimento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 ou 23, caracterizado por também compreender a repetição de uma ou mais etapas do método de rastreamento pelo menos uma vez em uma temperatura aumentada para medição da atividade de esterase.

25. Método de rastreamento de alto rendimento, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que um primeiro ciclo de rastreamento tem uma primeira temperatura para medição da atividade de esterase de cerca de 30°C e um ciclo subsequente de rastreamento tem uma temperatura para medição da atividade de esterase de cerca de 45°C.

26. Método de rastreamento de alto rendimento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22, 23, 24 ou 25, caracterizado pelo fato de que a expressão de polipeptídeo de CocE mutante ocorre em uma temperatura em que CocE de tipo selvagem retém substancialmente a atividade catalítica.

27. Método de rastreamento de alto rendimento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22, 23, 24 ou 25, caracterizado pelo fato de que a expressão de polipeptídeo de CocE mutante ocorre em uma temperatura em que o polipeptídeo de CocE de tipo selvagem substancialmente se divide em corpos de inclusão.

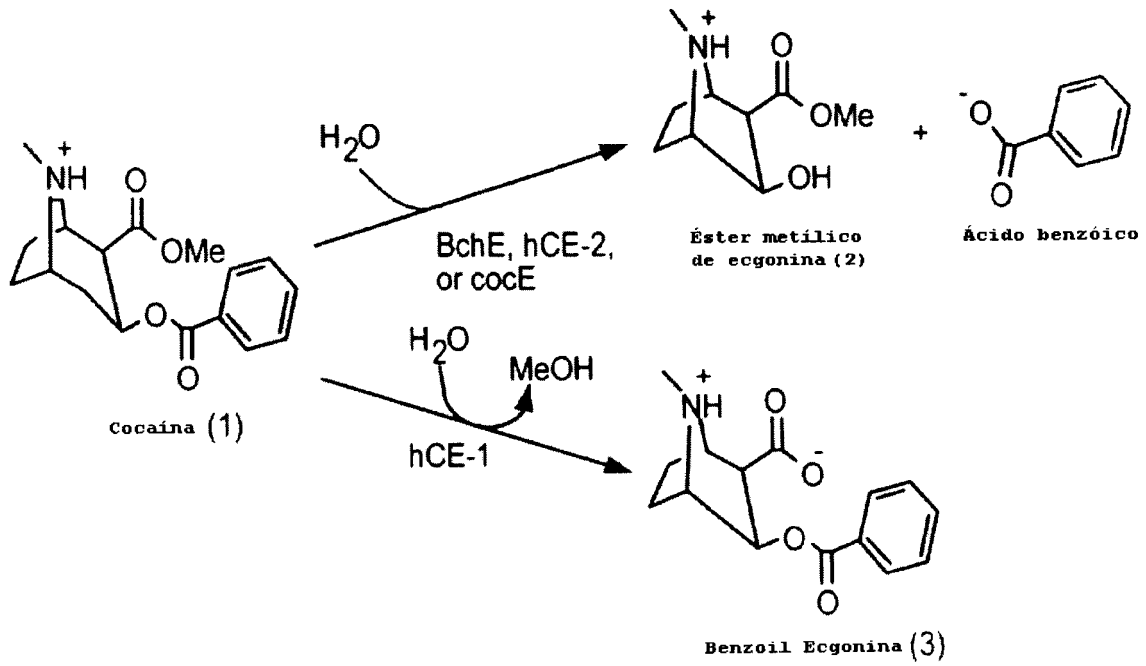


FIG. 1

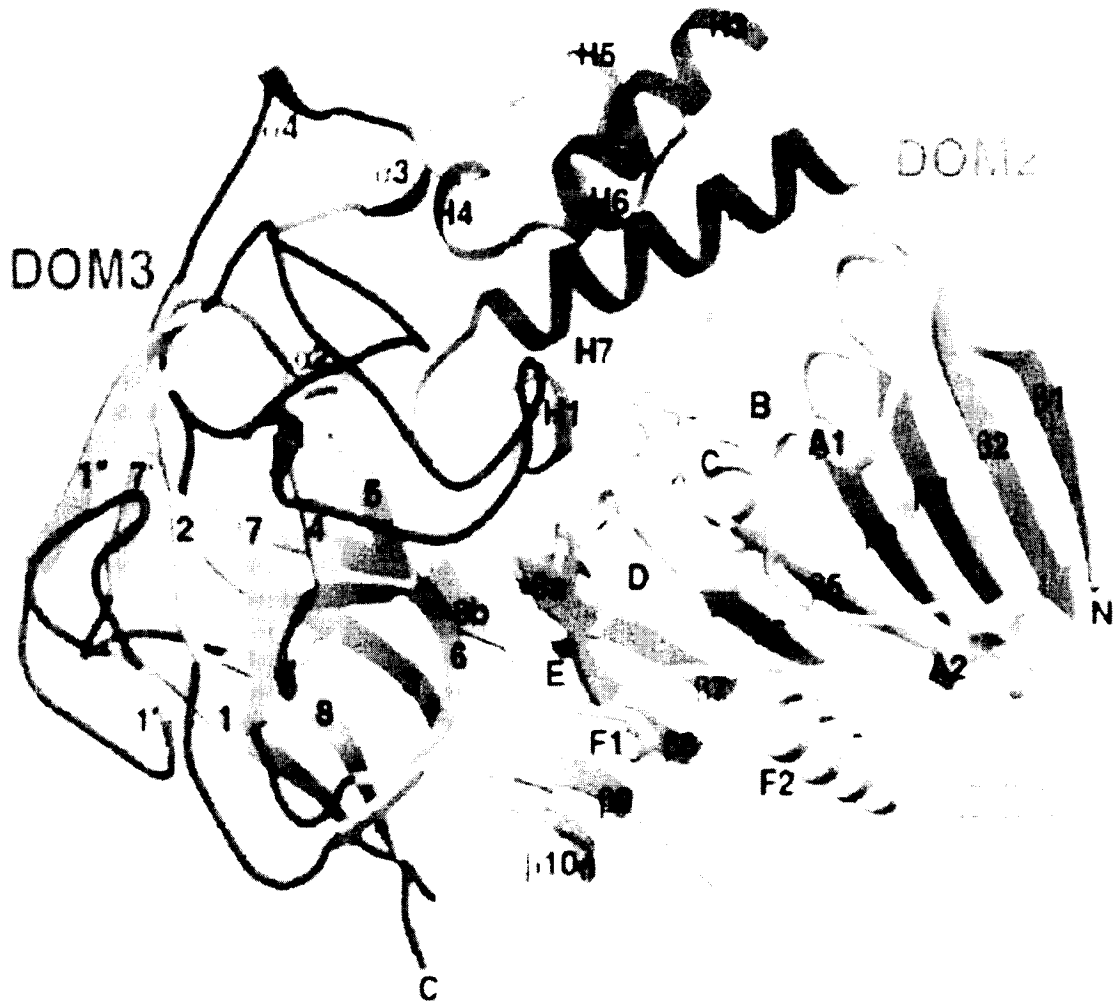
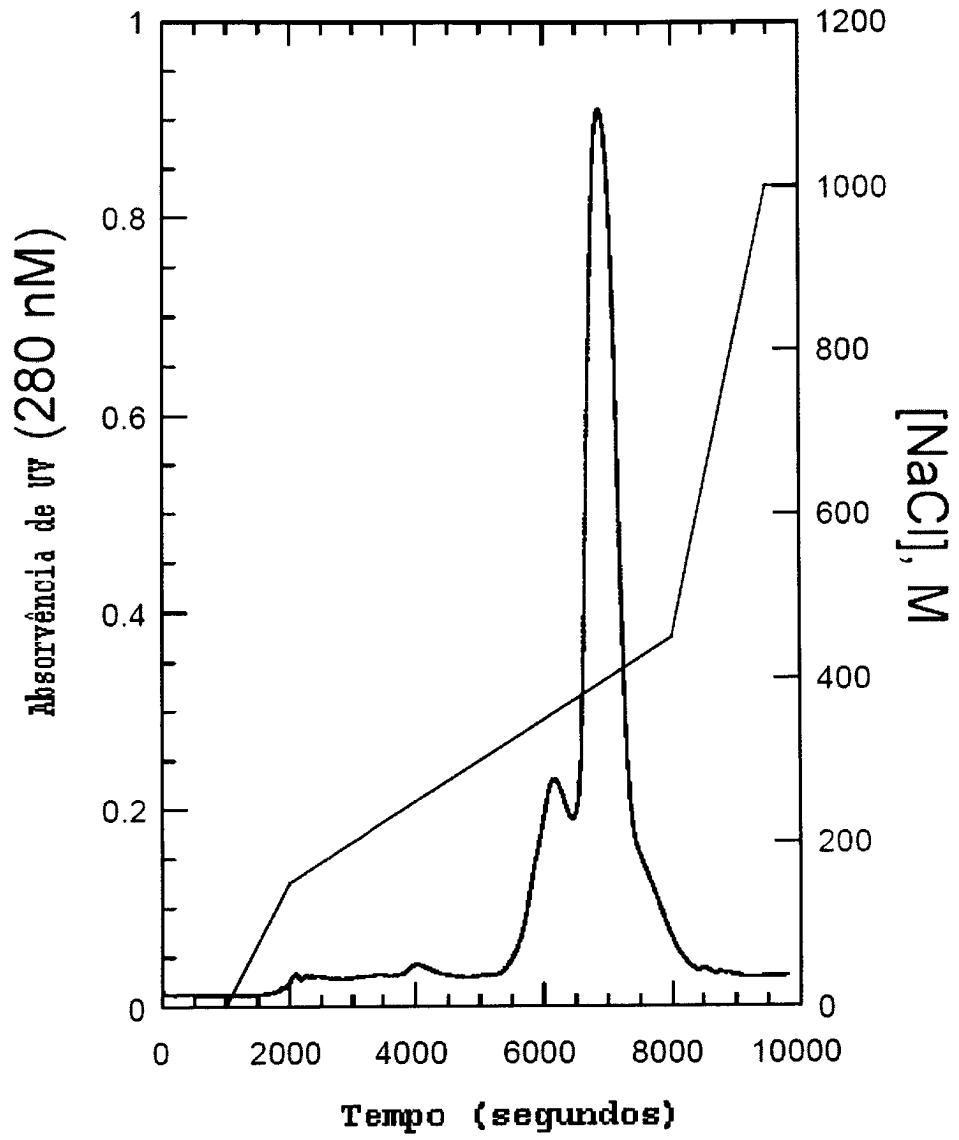


FIG. 2



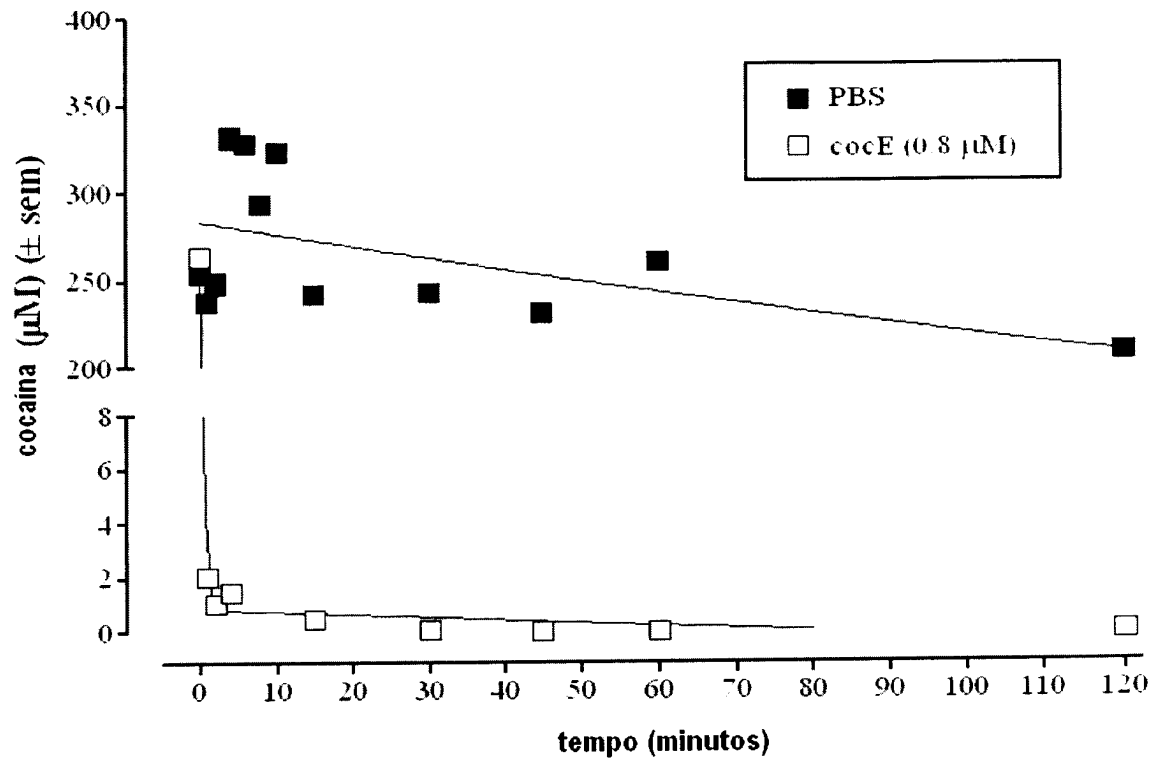


FIG. 4

- T172R
- S159A
- T172R(40min@37°C)
- CocE de tipo selvagem
- S159A(40min@37°C)
- CocE de tipo selvagem (40min@37°C)

Repetição de mutantes S159A & T172R (3-6-06)

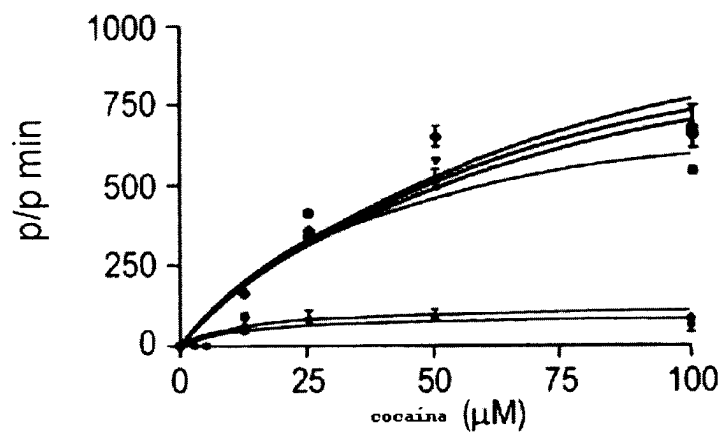


FIG. 5

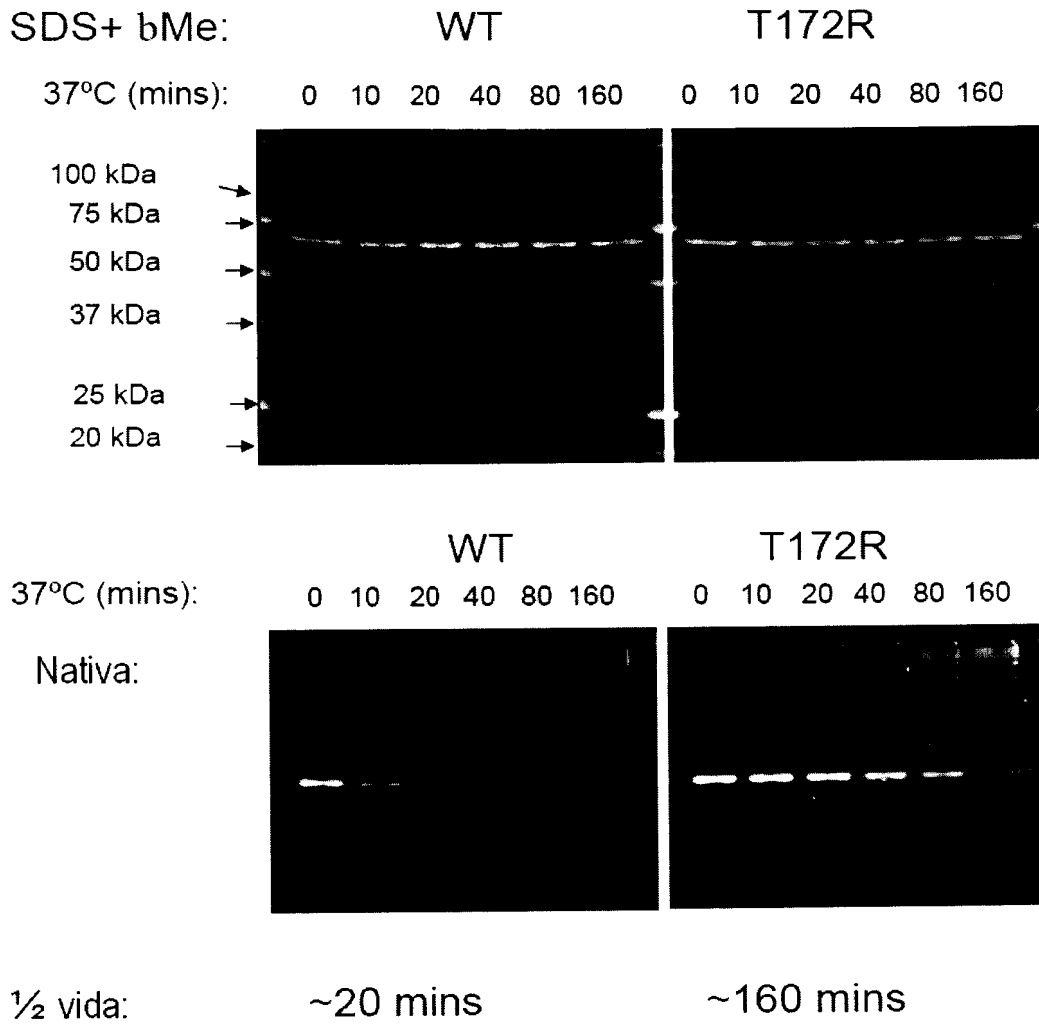


FIG. 6

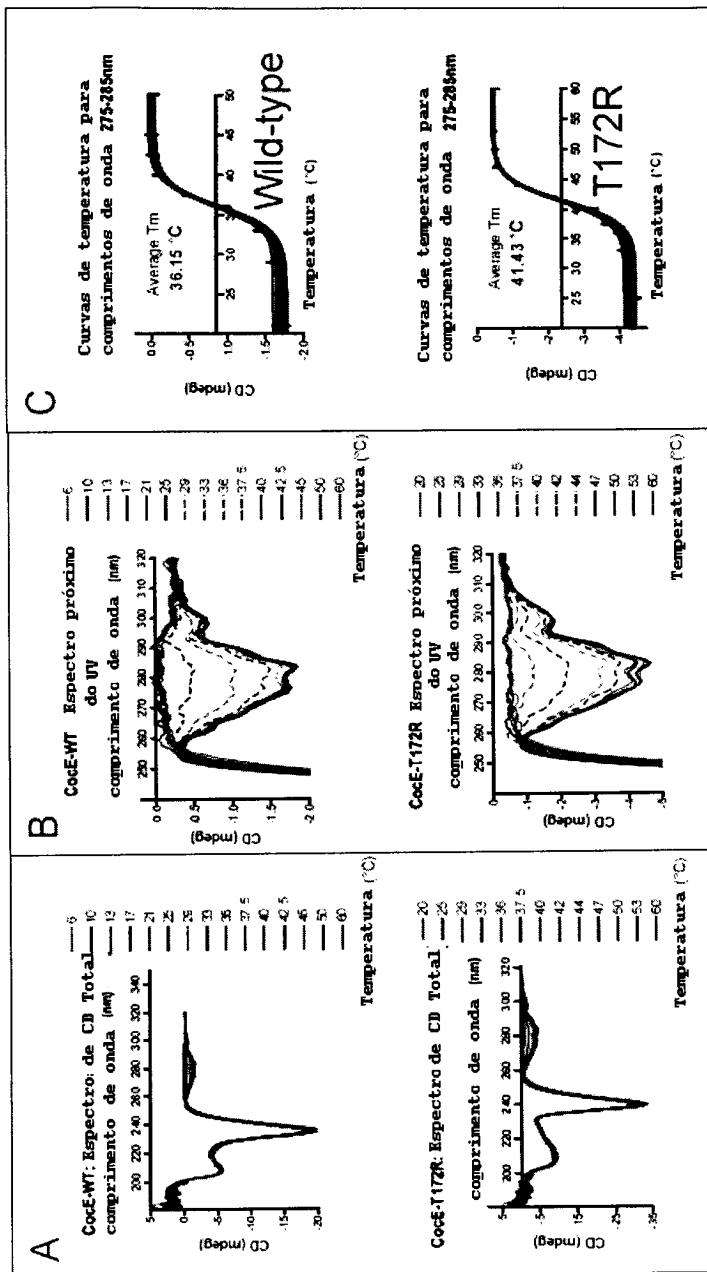


FIG. 7

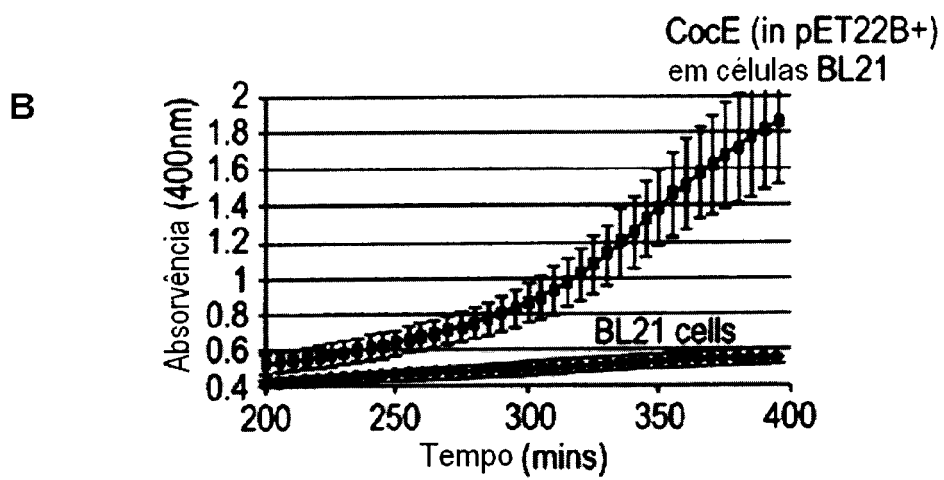
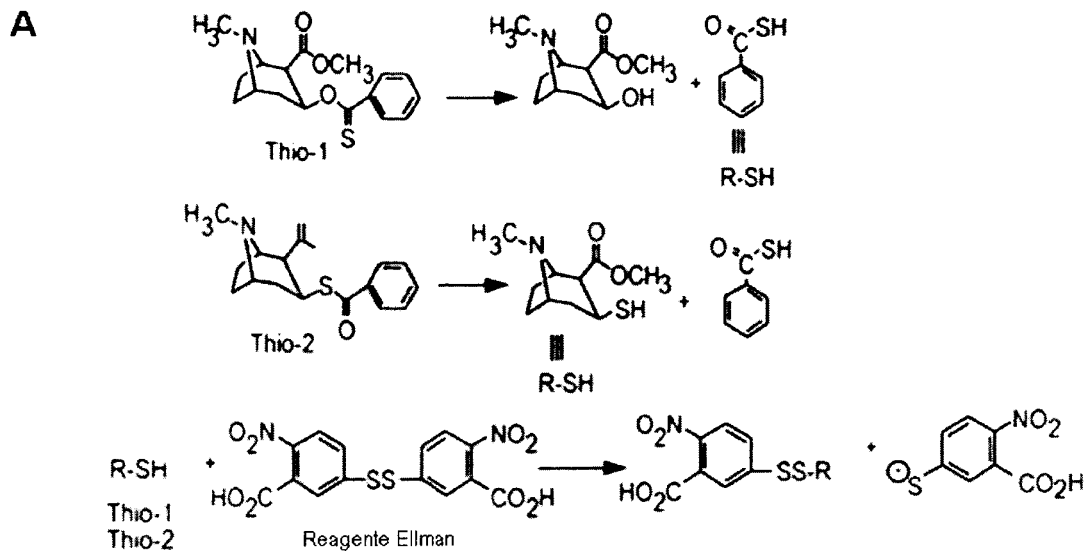


FIG. 8

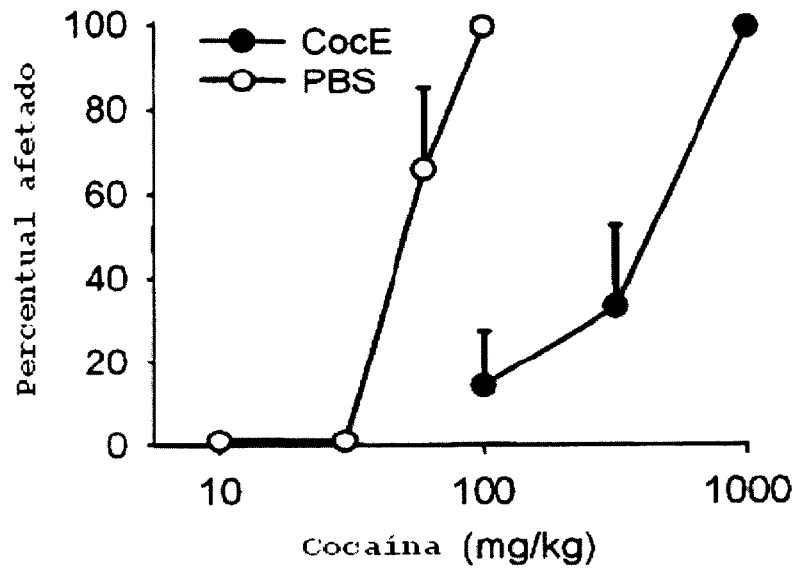


FIG. 9

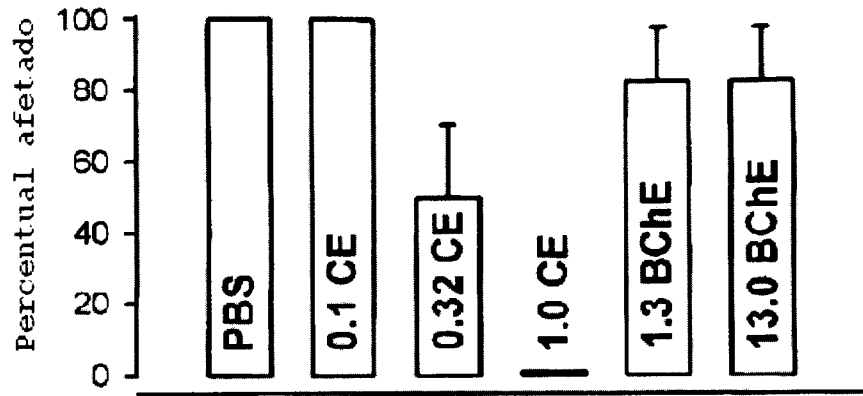


FIG. 10

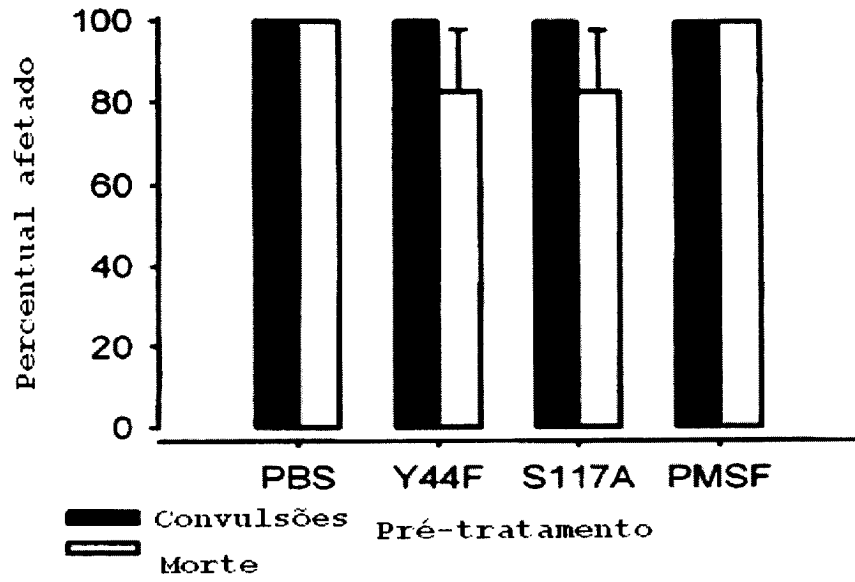


FIG. 11

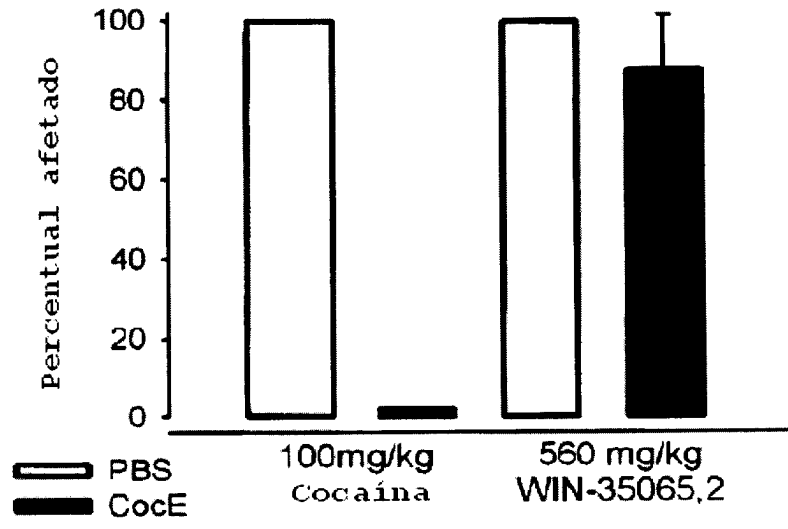


FIG. 12

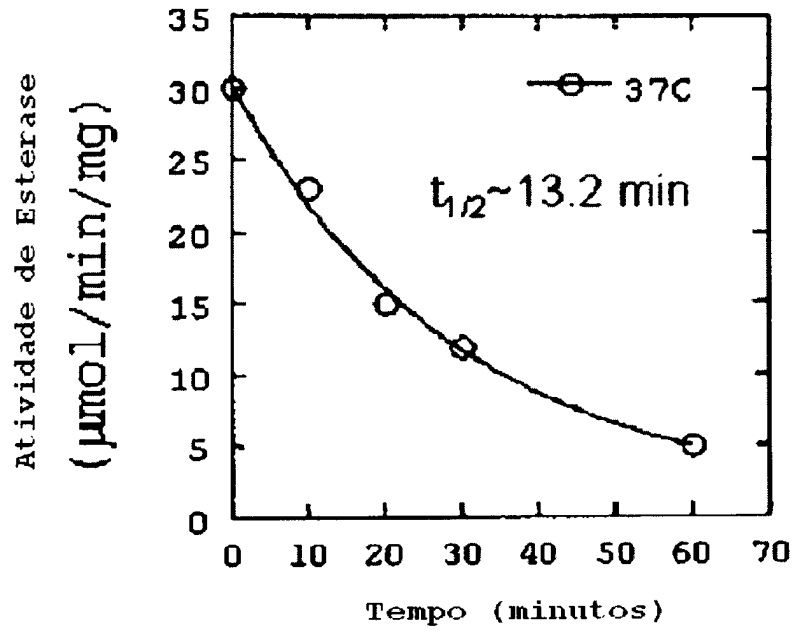


FIG. 13

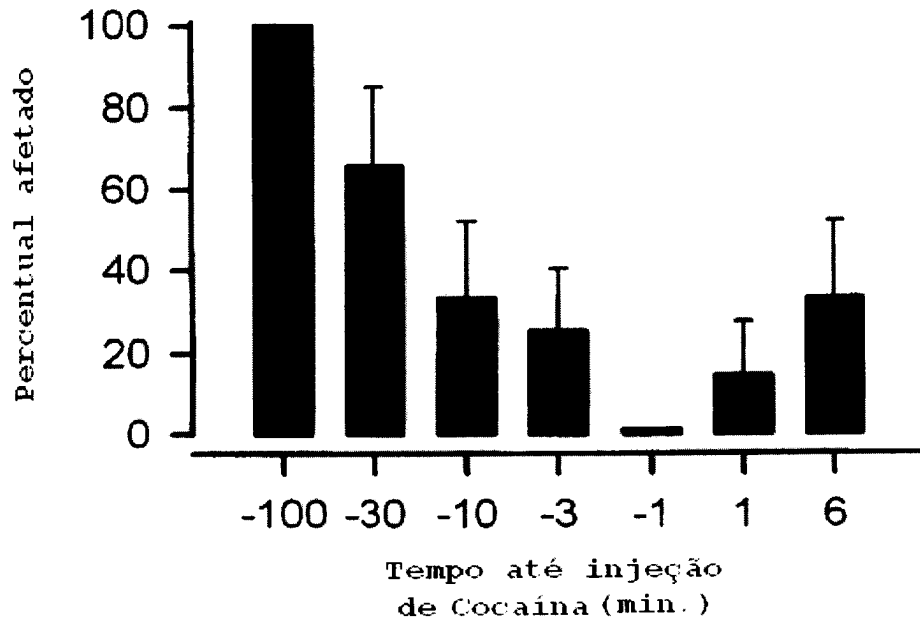


FIG. 14

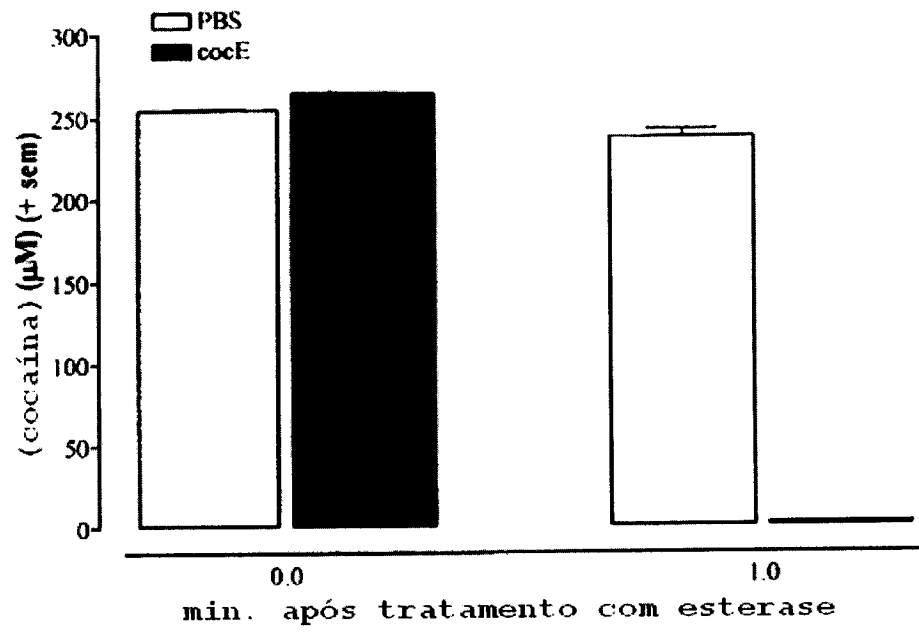


FIG. 15

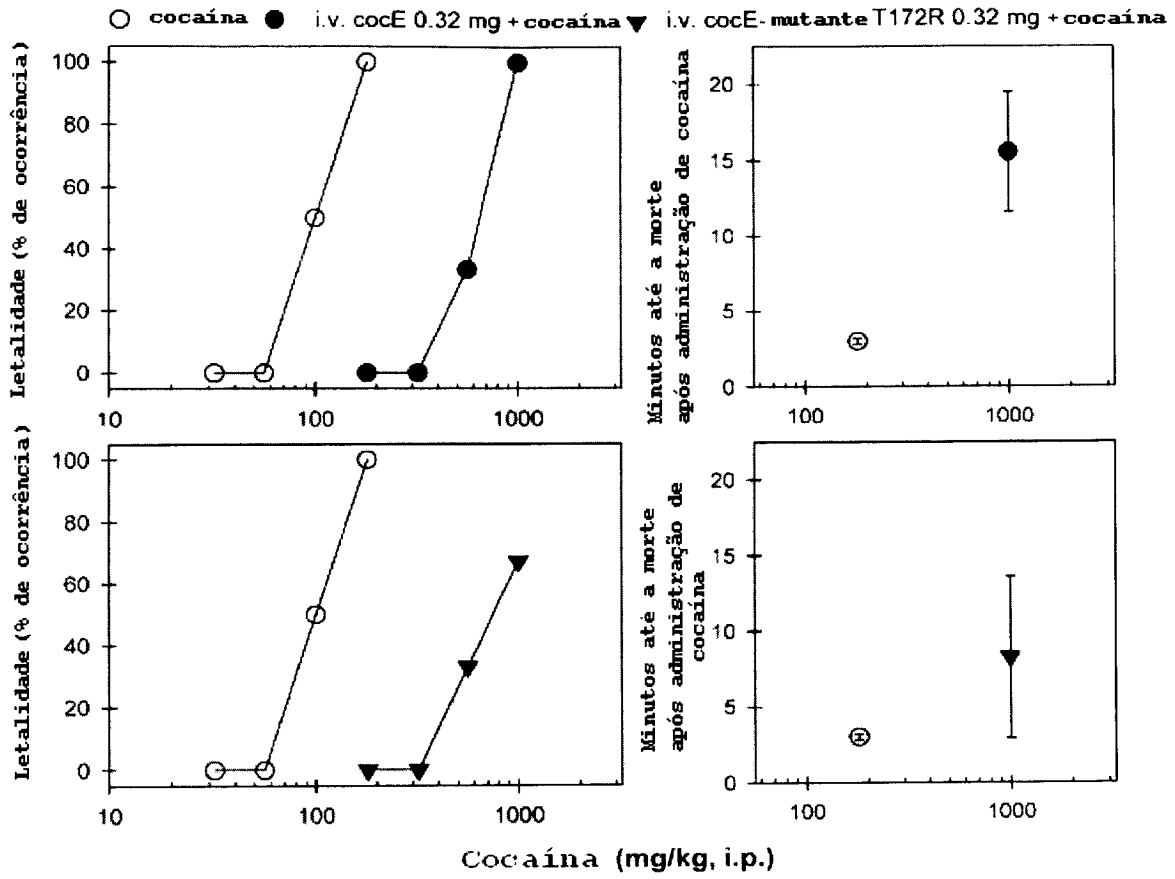


FIG. 16

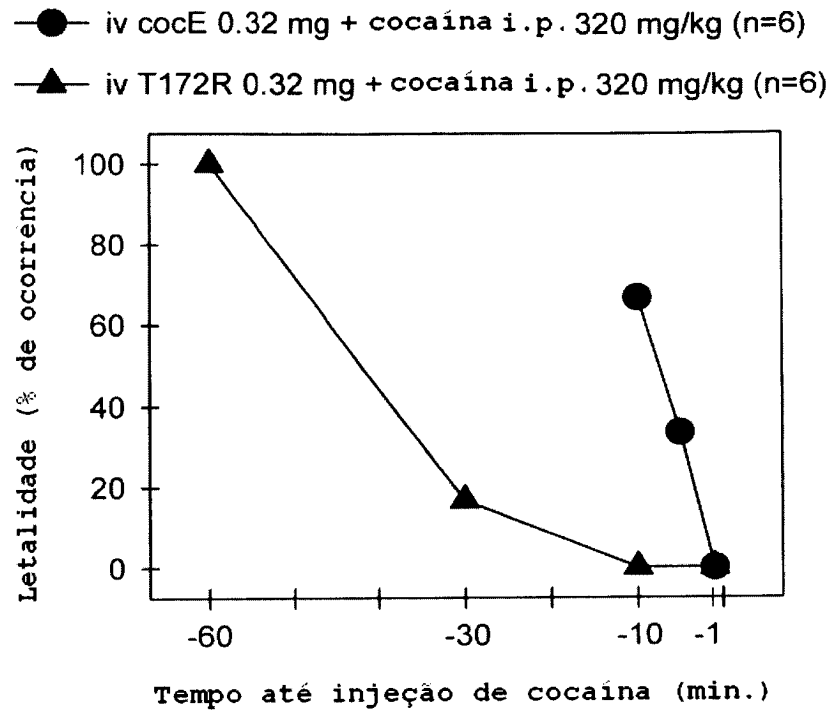


FIG. 17

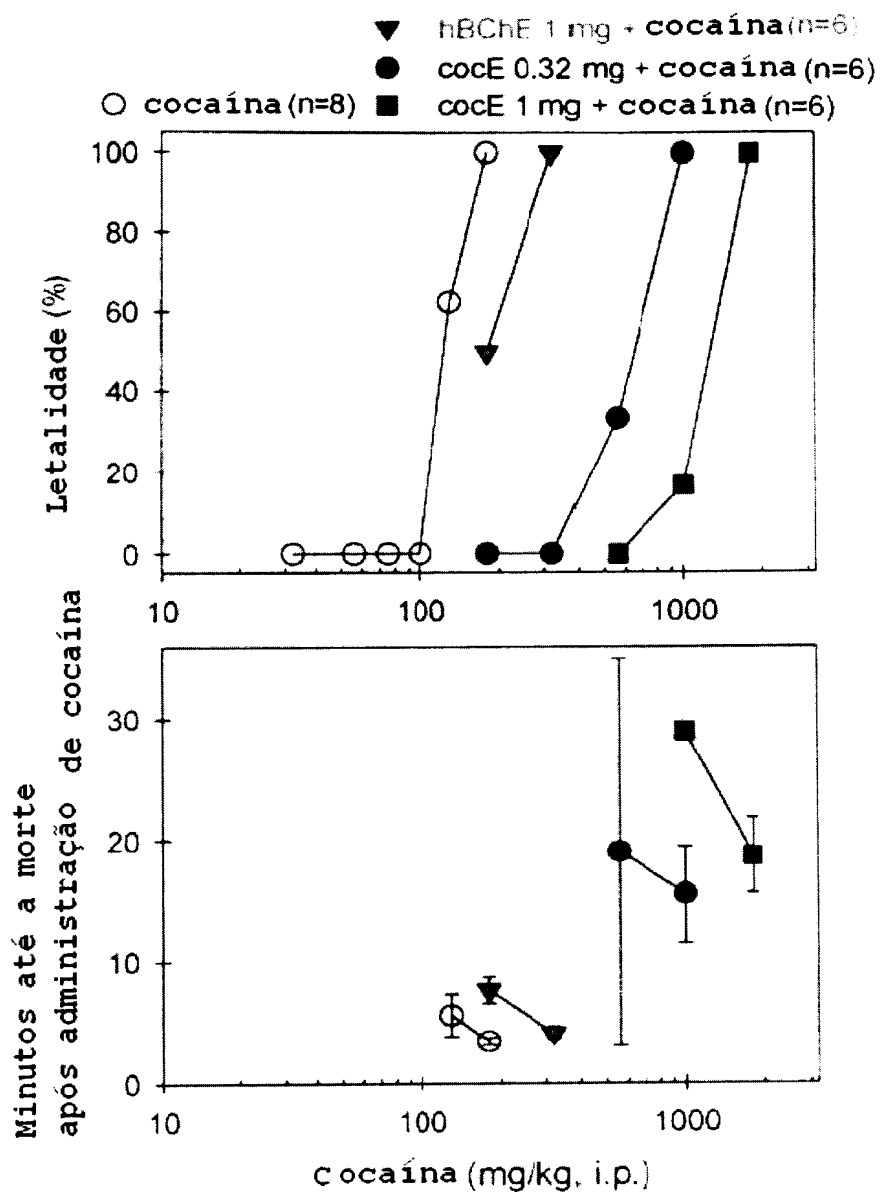


FIG. 18

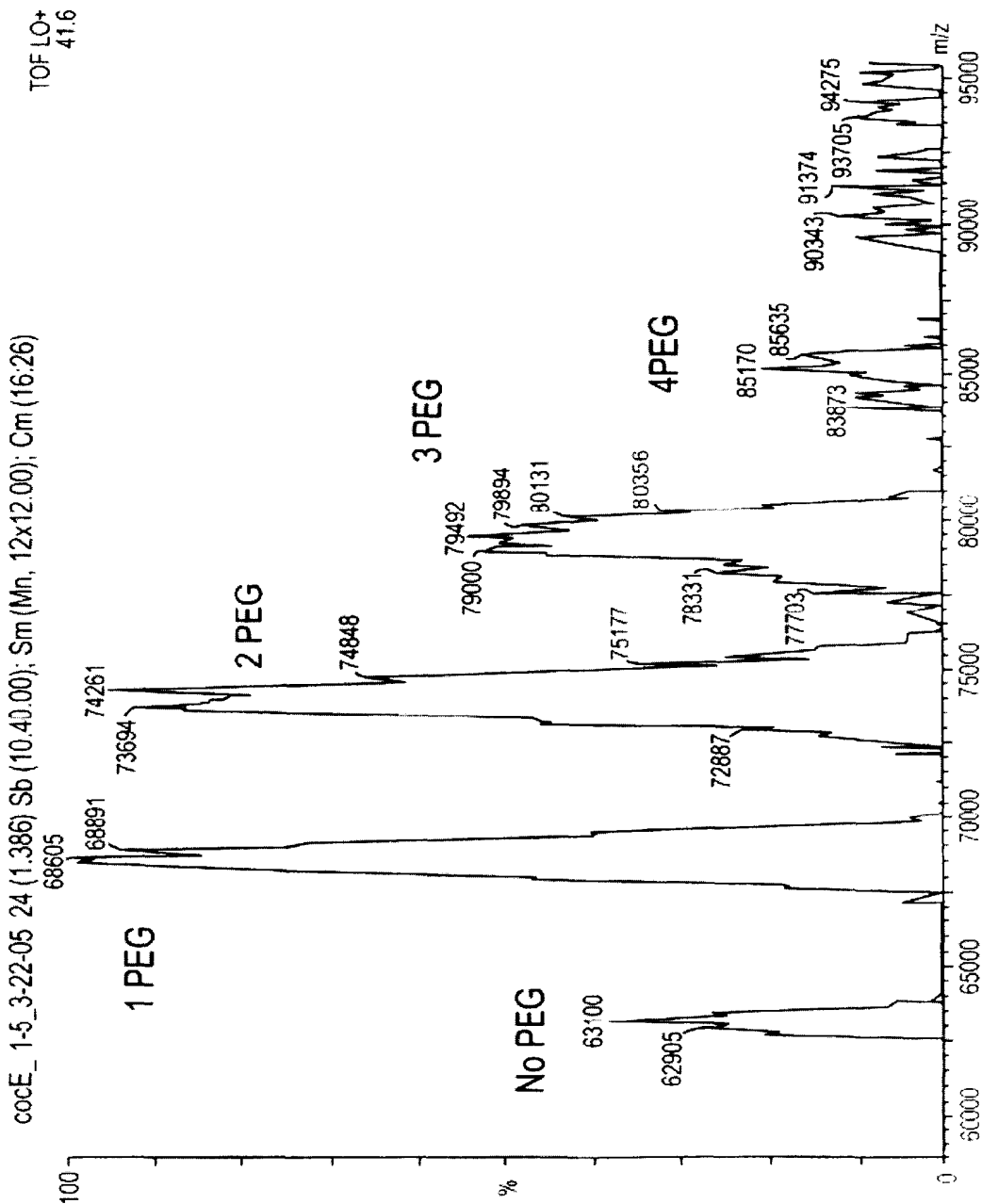


FIG. 19

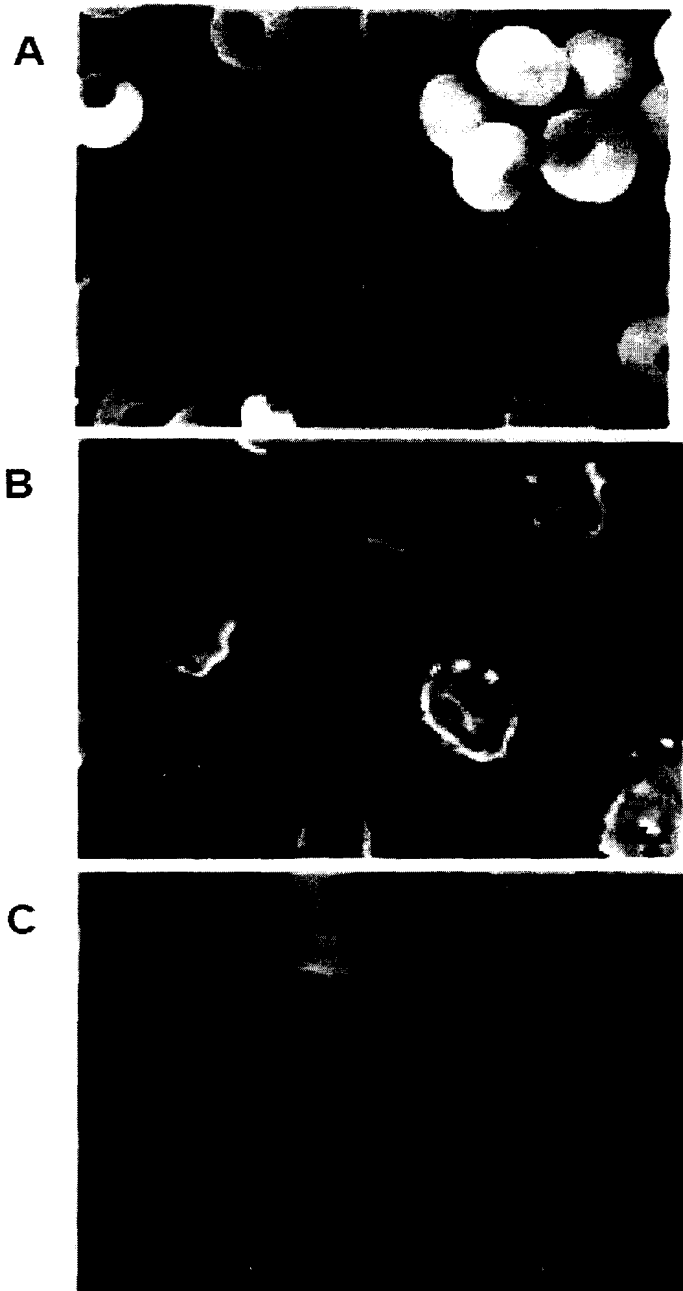


FIG. 20

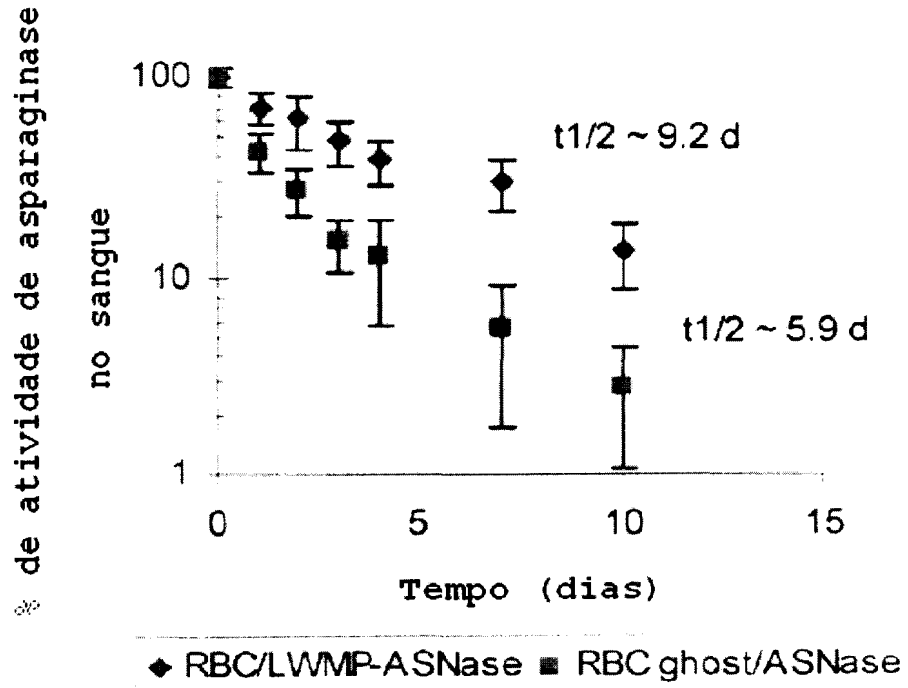


FIG. 21

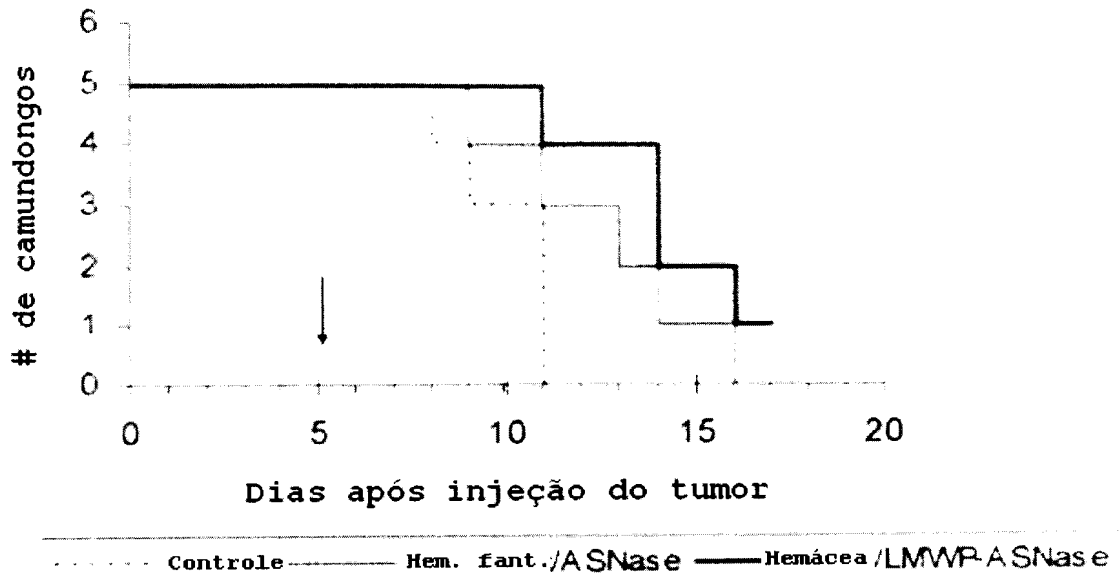


FIG. 22

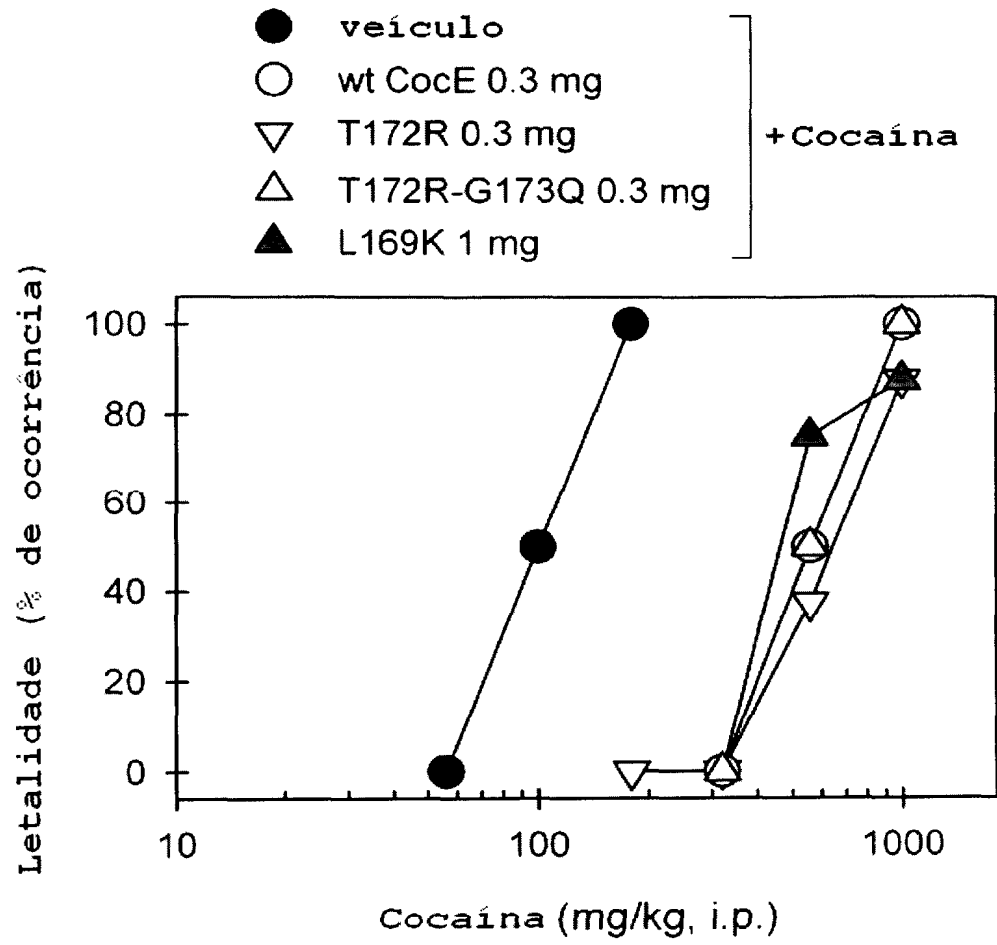


FIG. 23

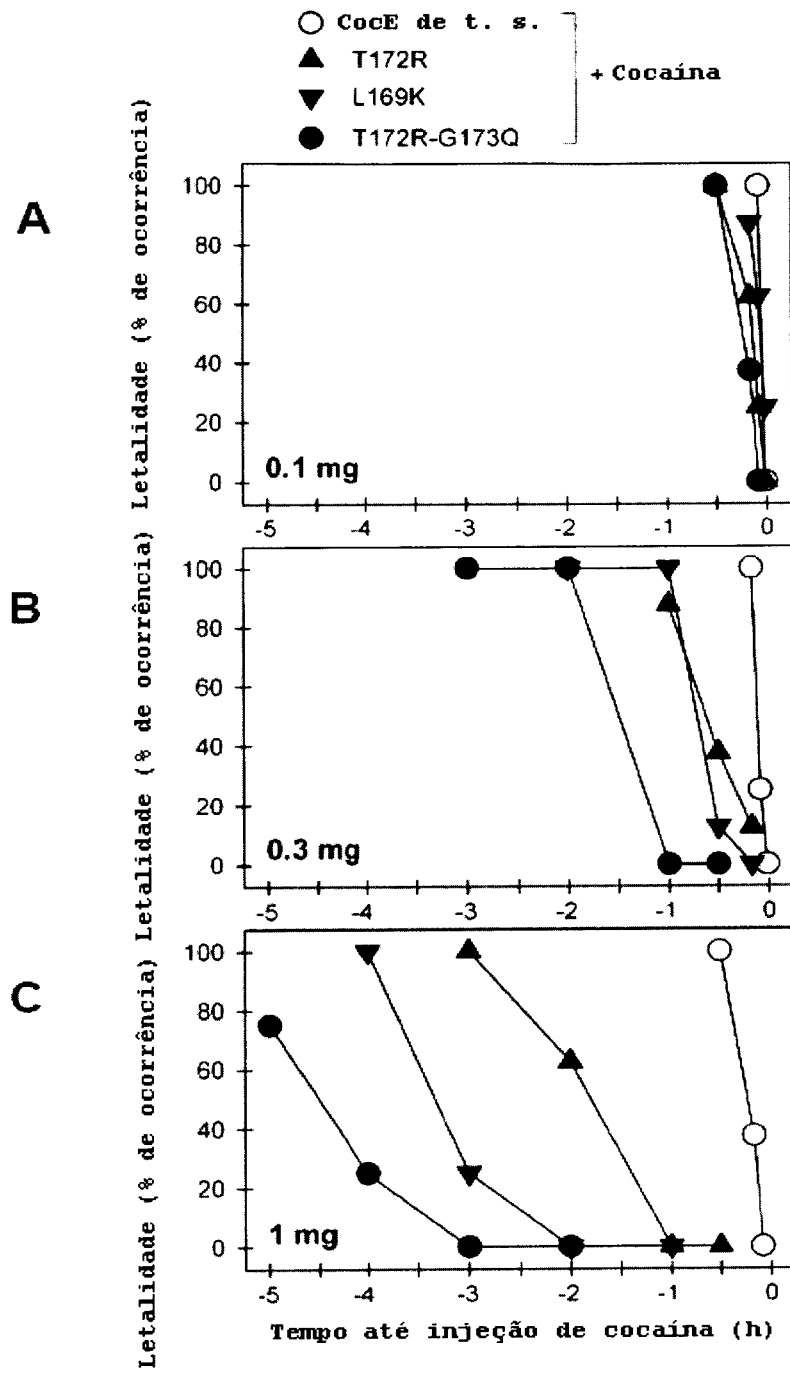


FIG. 24

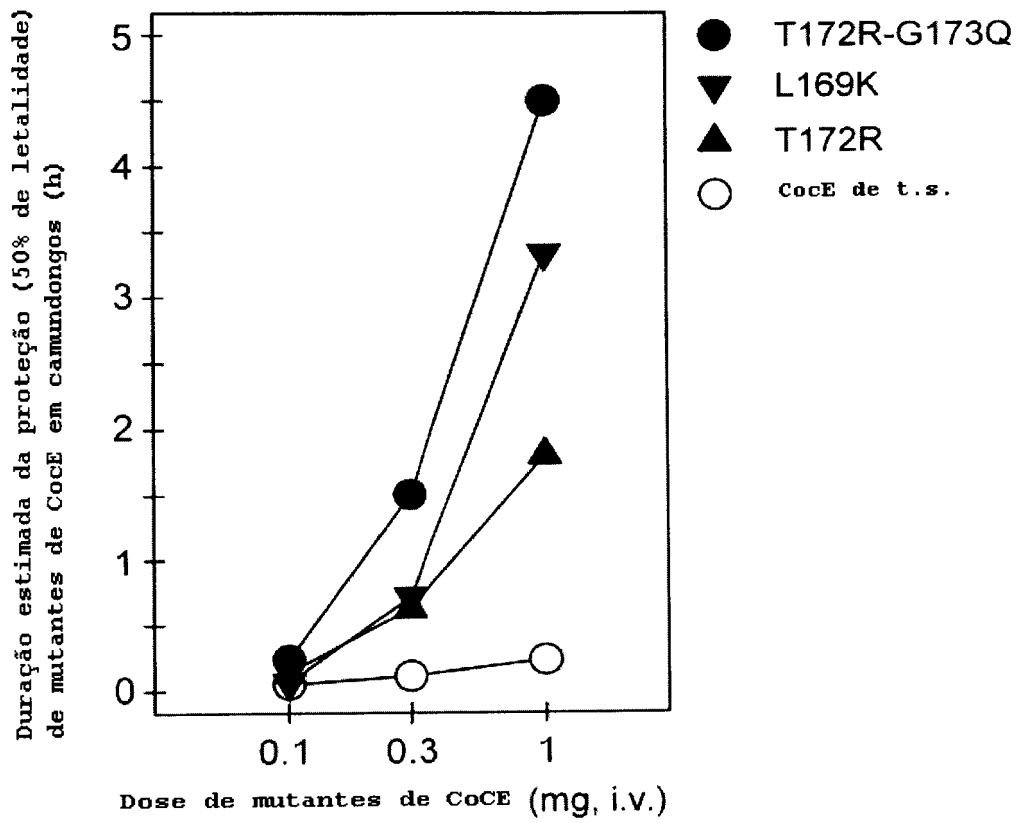


FIG. 25

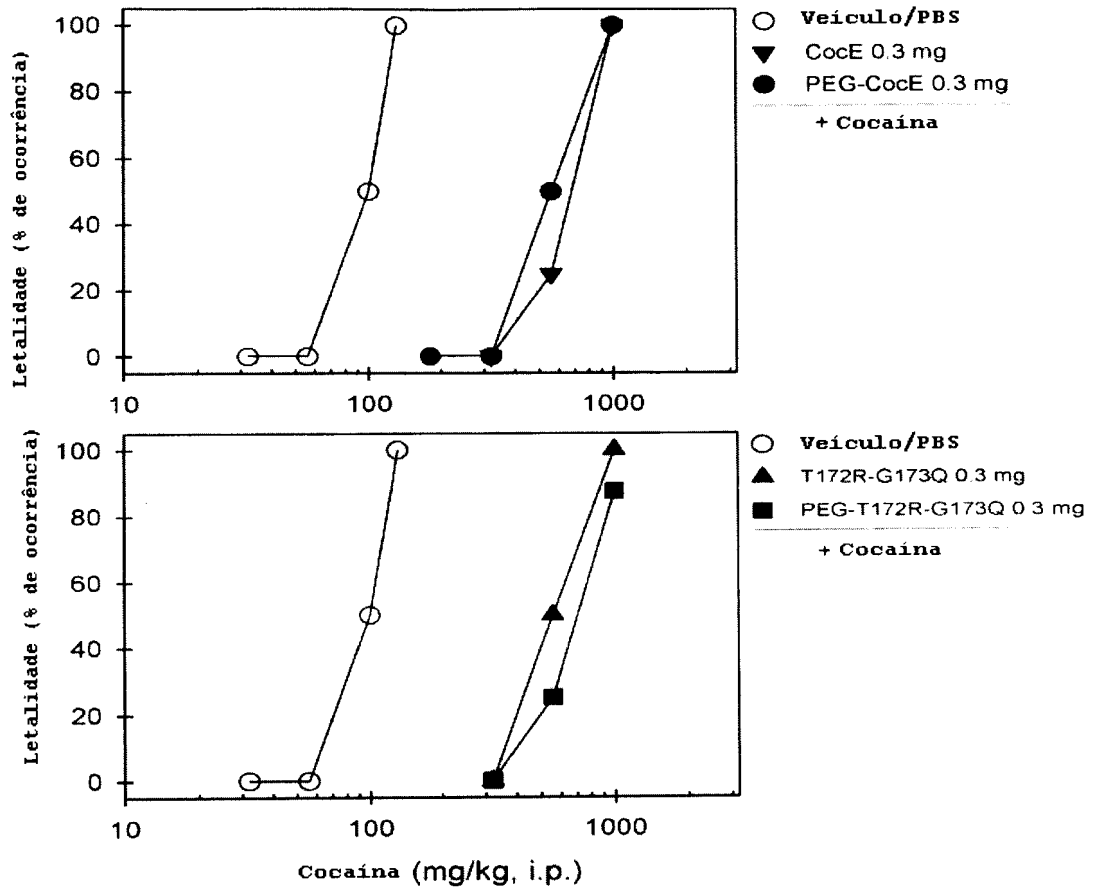
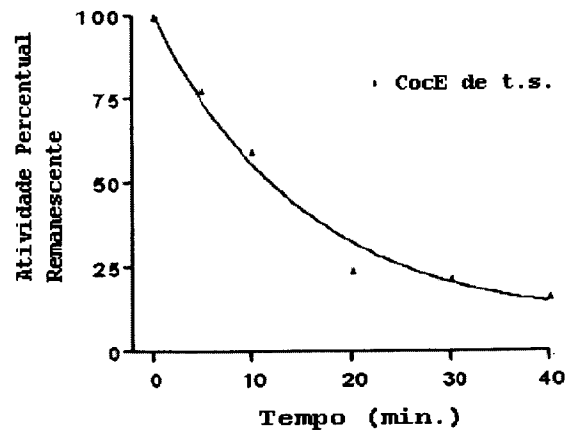
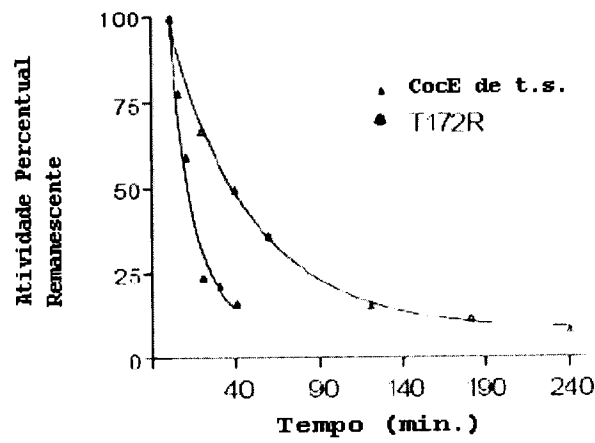


FIG. 26

A



B



C

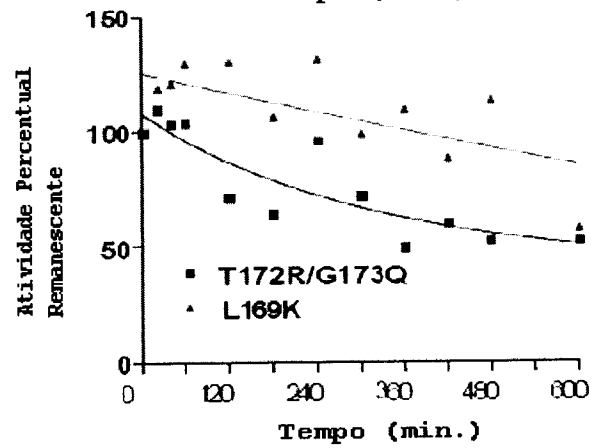


FIG. 27

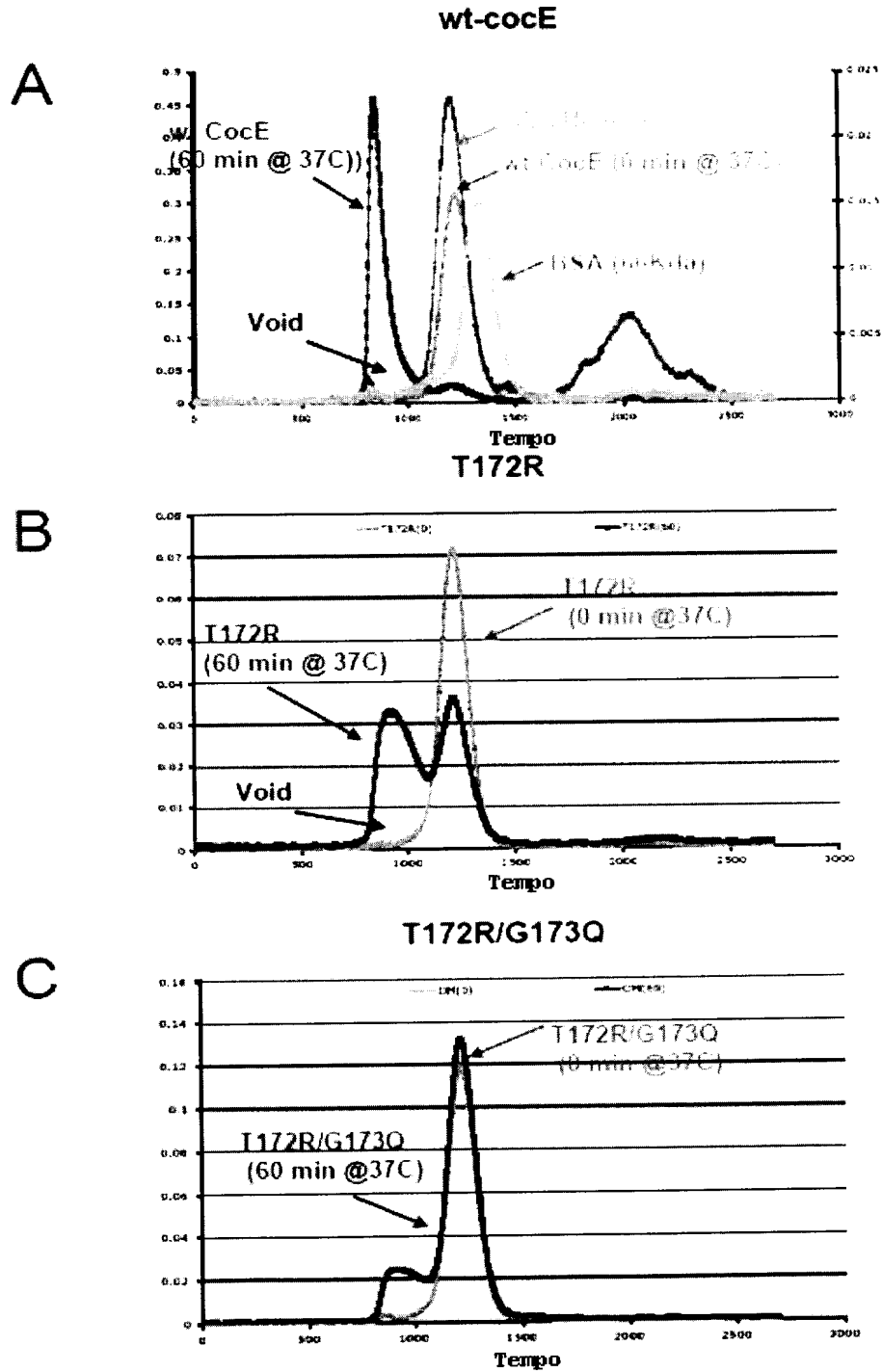


FIG. 28

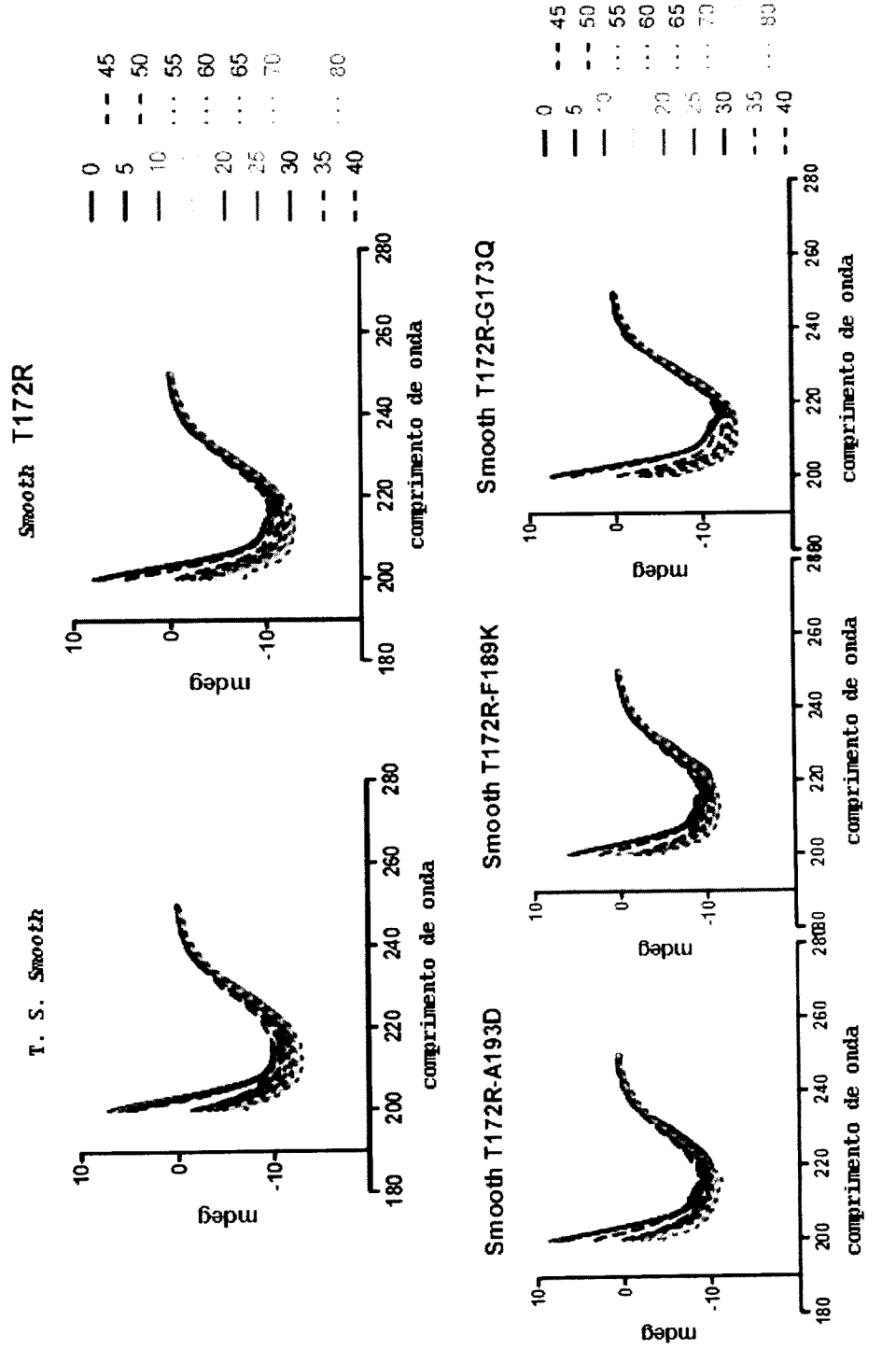


FIG. 29

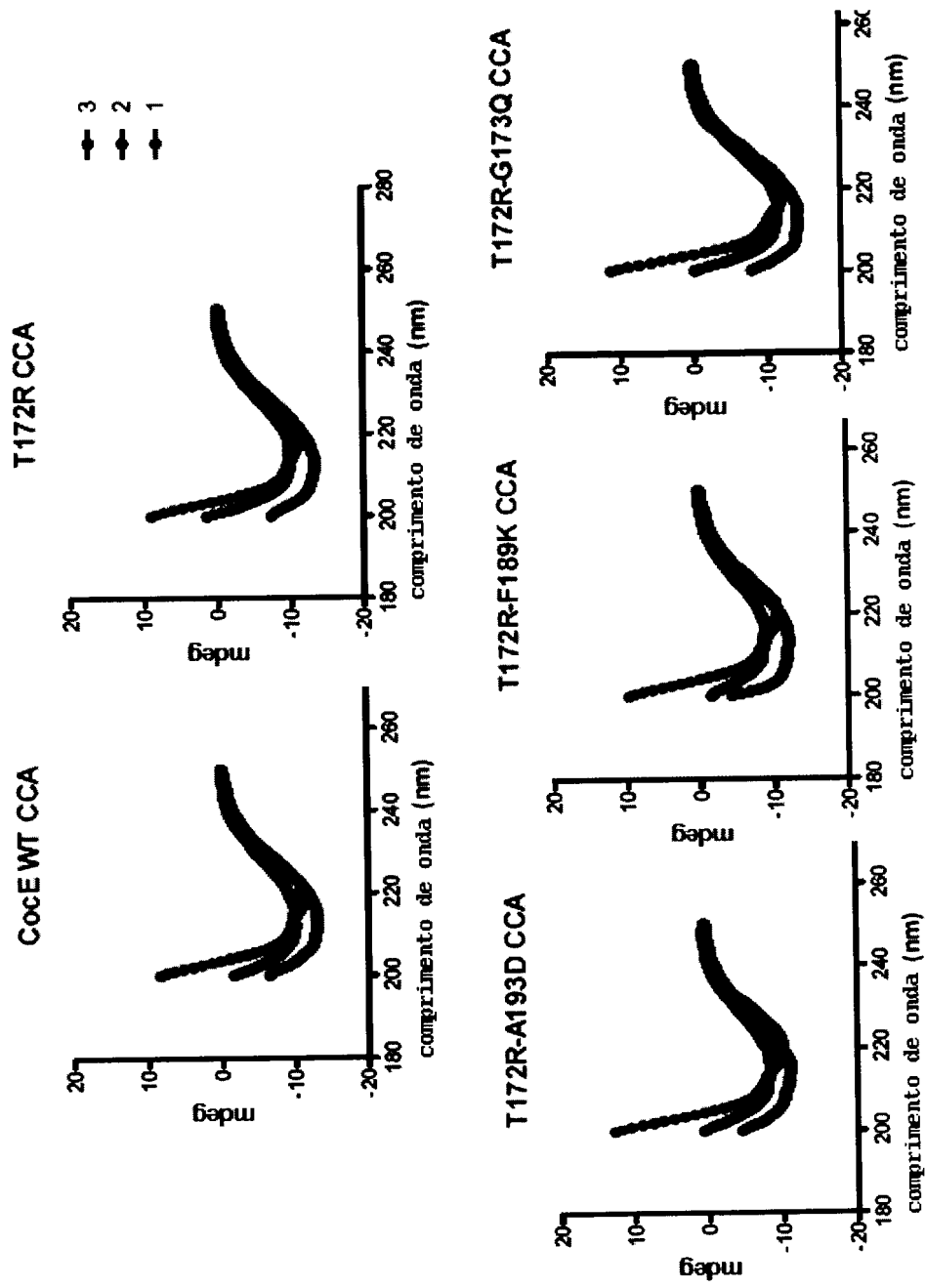


FIG. 30

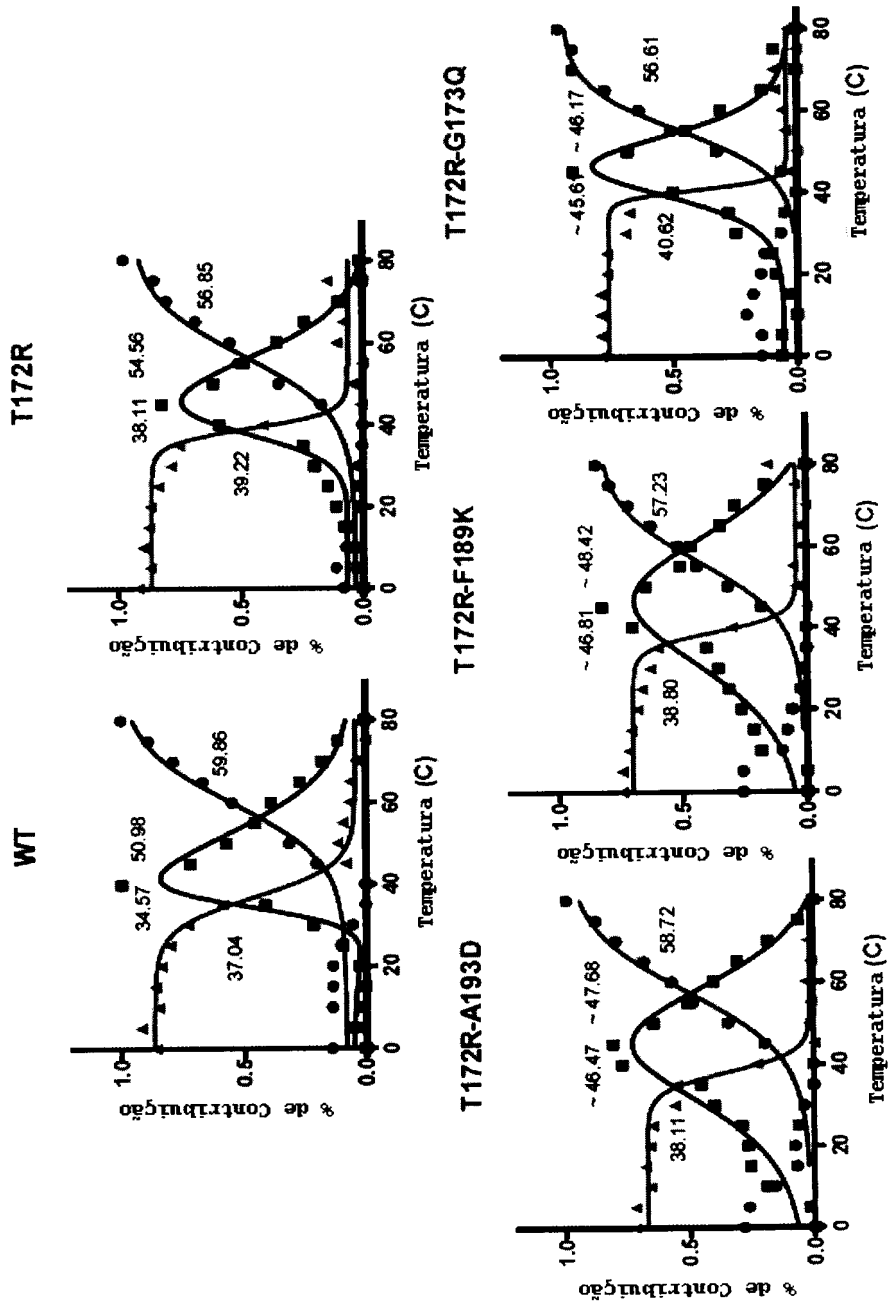


FIG. 31

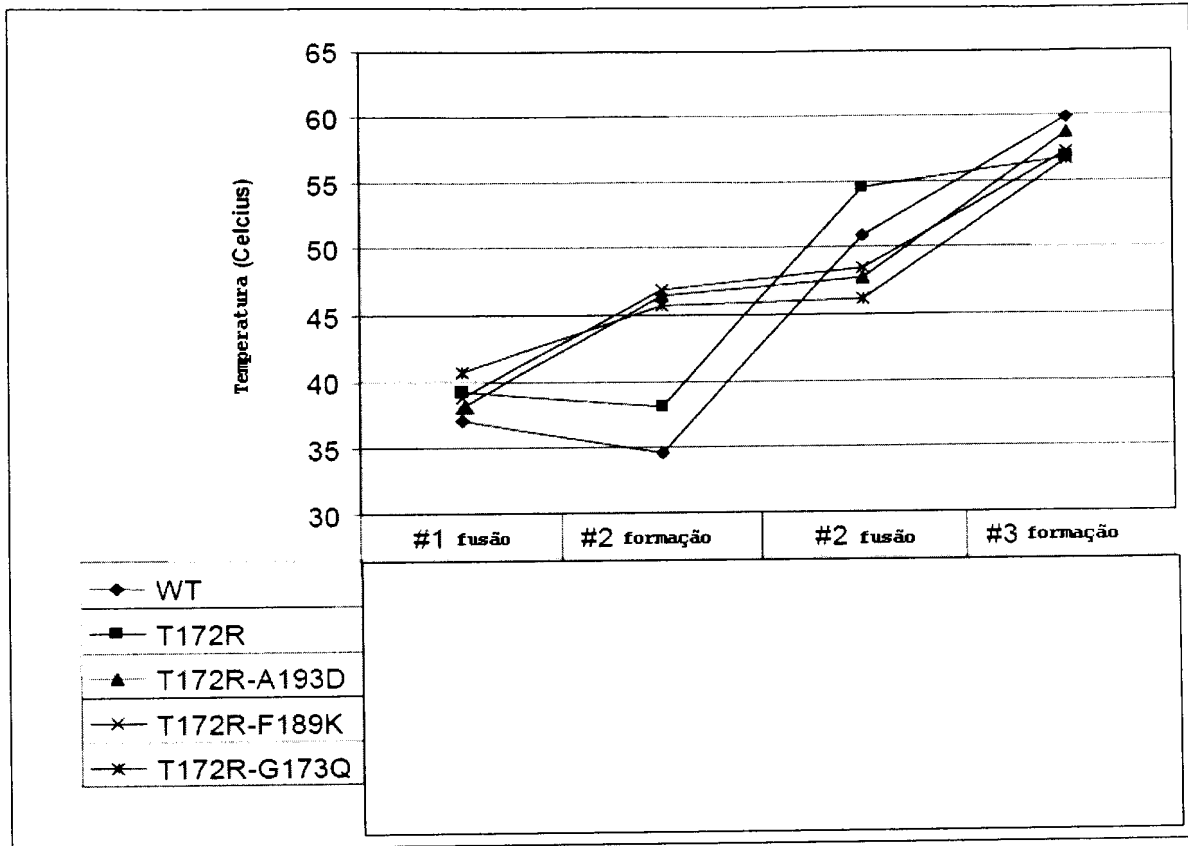


FIG. 32

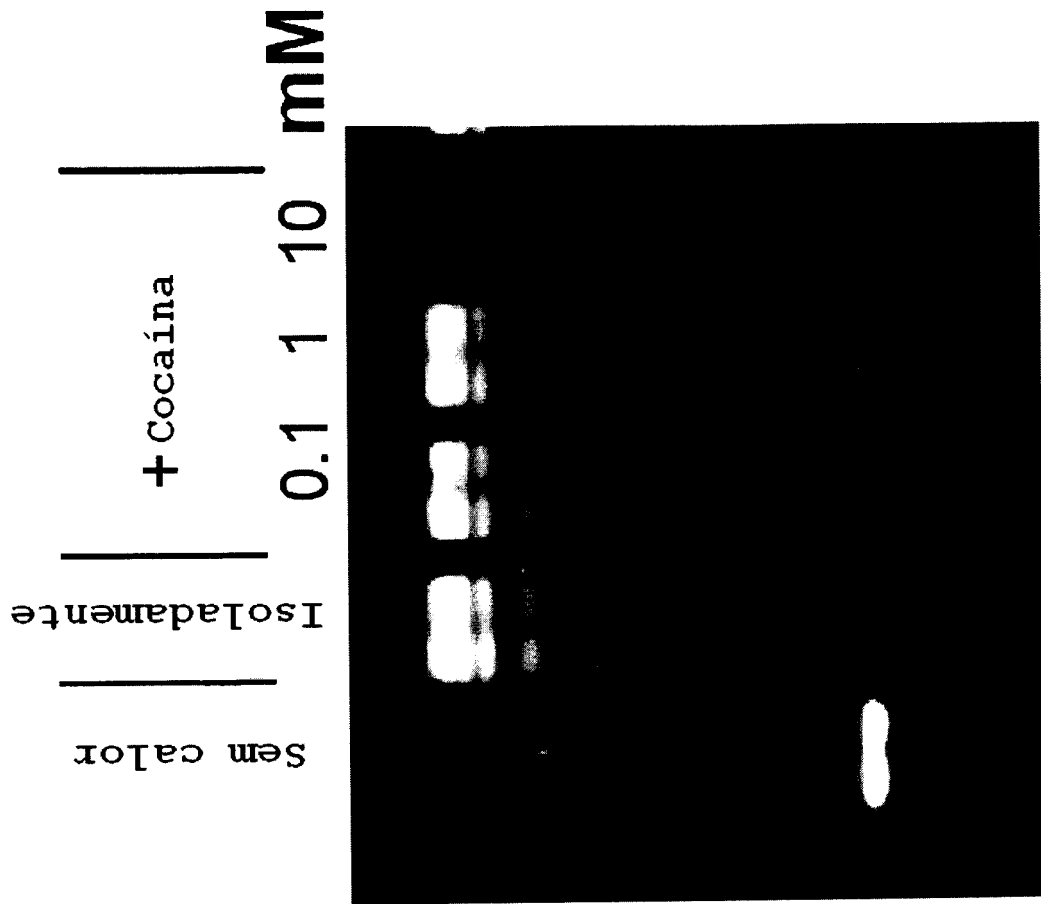


FIG. 33

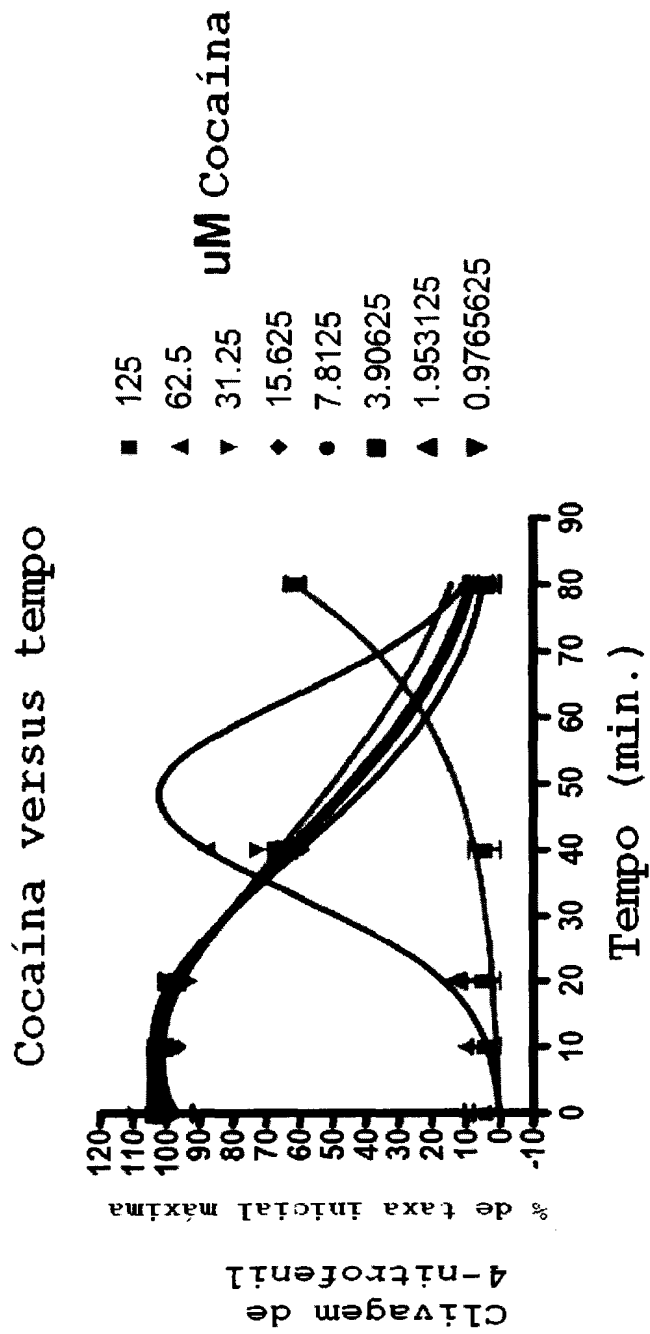


FIG. 34

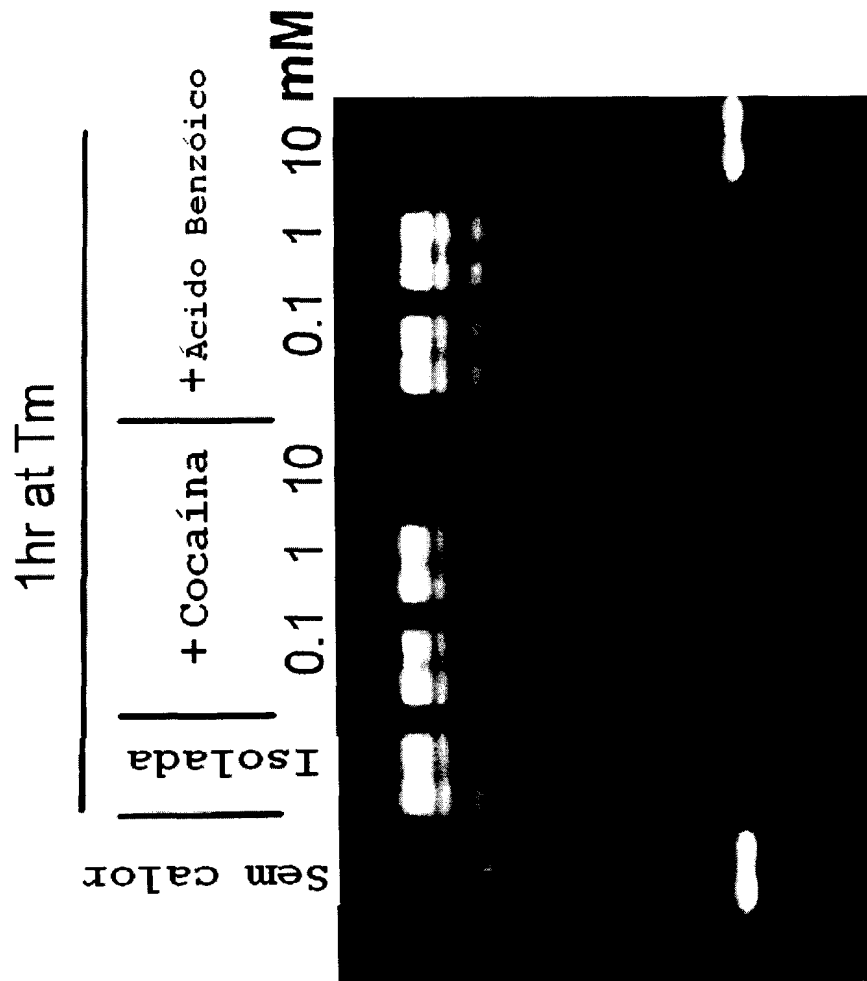
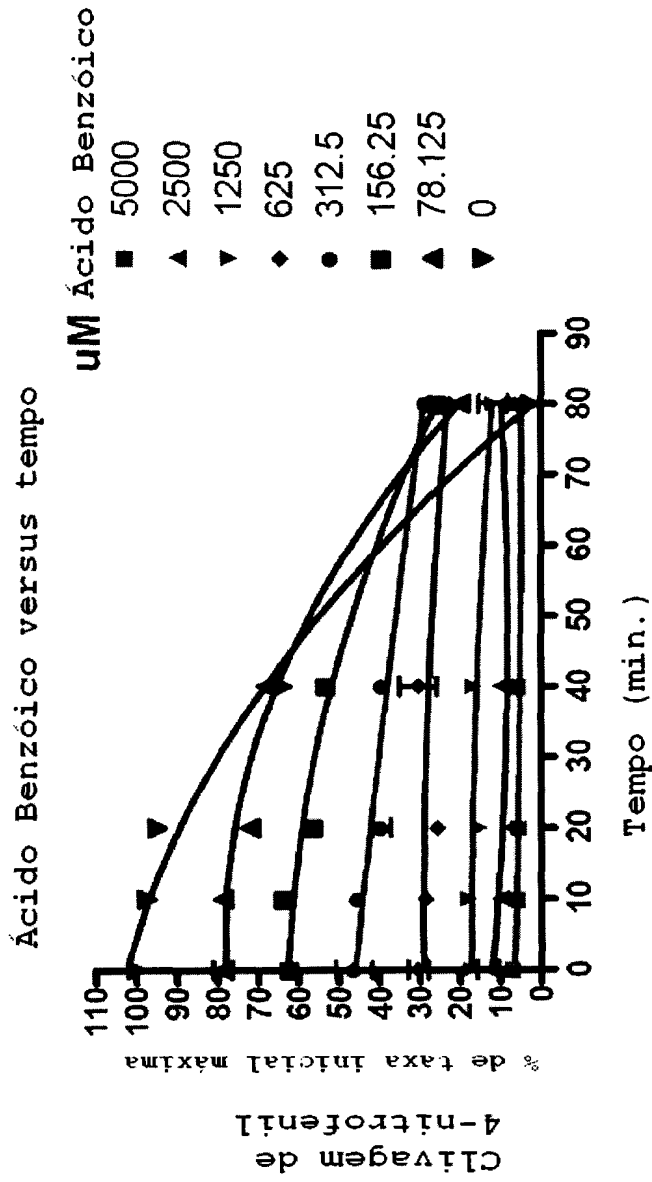


FIG. 35



(atividade de clivagem de 4NP deve diminuir com o tempo a menos que estabilizada)

FIG. 36

Resumo

COMPOSIÇÕES ANTICOCAÍNA E TRATAMENTO

Modalidades da invenção aqui reveladas geralmente relacionam-se a terapêuticos anticocaína. Especificamente, algumas modalidades da invenção relacionam-se a esterases de cocaína (CocE) mutante altamente eficientes, termoestáveis, e de longa duração que podem proteger contra os efeitos tóxicos e de reforço da cocaína em indivíduos. São aqui fornecidos polipeptídeos de CocE mutante que apresentam atividade de esterase termoestável. São também fornecidos métodos de tratamento de condições induzidas por cocaína em um indivíduo em necessidade por meio da administração de CocE mutante bem como métodos para rastreamento de alto rendimento de polipeptídeos de esterase candidatos.