



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

(21) **PI 0711901-1 A2**

(22) Data de Depósito: 21/05/2007
(43) Data da Publicação: 06/03/2012
(RPI 2148)



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

(54) **Título:** COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA A LIBERAÇÃO DE OXIGÊNIO

(30) **Prioridade Unionista:** 22/05/2006 US 60/921.505

(73) **Titular(es):** The Regents Of The University Of California

(72) **Inventor(es):** Elizabeth M. Boon, Emily Weinert, Jonathan A. Winger, Michgael A. Marletta, Stephen P.L. Cary

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

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007012184 de 21/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/139791de 06/12/2007

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA A LIBERAÇÃO DE OXIGÊNIO. Proteínas H-NOX são mutadas para exibir propriedades cinéticas e termodinâmicas aumentadas ou ideais para liberação sangüínea de gás O₂. As proteínas H-NOX projetadas compreendem mutações que transmitem ligação de ligante de O₂ ou NO alterada em relação ao domínio de H-NOX do tipo selvagem correspondente, e são operacionais como transportadores sangüíneos de gás O₂ em mamíferos fisiologicamente compatíveis. A invenção também fornece composições farmacêuticas, kits e métodos que utilizam proteínas H-NOX do tipo selvagem ou mutantes para o tratamento de qualquer condição para a qual a liberação de O₂ seja benéfica.

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA A LIBERAÇÃO DE OXIGÊNIO**REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS**

Esse pedido reivindica o benefício do pedido U.S. provisório número de série 60/921.505, depositado em 22 de maio de 2006 por Michael A. Marietta, Stephen P.L. Cary, Elizabeth M. Boon e Jonathan A. Winger, intitulado "Engineering H-NOX Proteins for Therapeutic Nitric Oxide and Oxygen Delivery" (Caso UC N° B06-084). Esse pedido U.S. provisório foi convertido a partir do pedido de utilidade U.S. número de série 11/440.588, depositado em 22 de maio de 2006, em um pedido provisório no dia 1° de maio de 2007, cujas revelações são aqui incorporadas por referência em suas totalidades.

DECLARAÇÃO EM RELAÇÃO AO FINANCIAMENTO FEDERAL**PESQUISA OU DESENVOLVIMENTO**

Esse trabalho foi apoiado pelo Financiamento N° DE-AC03-76SF. O Governo dos Estados Unidos pode ter direitos em qualquer patente emitida nesse pedido.

CAMPO TÉCNICO

Esse pedido está relacionado às proteínas H-NOX e aos métodos de sua utilização para a liberação de oxigênio. As proteínas H-NOX fornecem uma nova ferramenta terapêutica para a liberação de O₂ a seres humanos e, para fins veterinários, aos animais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O sistema de banco de sangue atual possui riscos inerentes e sérias limitações. Erros na tipagem sangüínea, imunogenicidade, transmissão de agentes bacterianos e infecções virais, tais como HIV-1 e hepatite, impõem perigos potencialmente fatais aos pacientes submetidos a

transfusões. Além disso, a disponibilidade limitada de doadores, a necessidade de tipos sanguíneos específicos, a validade curta de células sanguíneas vermelhas e a necessidade de refrigeração limitam a acessibilidade de transfusões aos pacientes. O desenvolvimento de um substituto do sangue estável eliminaria os riscos do sistema de banco de sangue atual e aumentaria a disponibilidade de transfusões aos pacientes na maioria dos ambientes. Dessa forma, a liberação de oxigênio (O_2) aos órgãos e tecidos para aliviar os sintomas causados pela perda sanguínea ou hipóxia é um objetivo terapêutico importante.

Nenhuma terapia baseada em hemoglobina foi aprovada para uso em seres humanos nos Estados Unidos. Terapias potenciais incluem diversos transportadores artificiais de O_2 (revisados por Spahn, D.R. e cols. (2005), "Artificial O_2 carriers: status in 2005", *Curr. Pharm. Des.* 11(31): 4.099-4.114) como, por exemplo, hemoglobinas projetadas (por exemplo, Patente U.S. N° 6.022.849). No entanto, alguns substitutos potenciais do sangue como, por exemplo, substitutos do sangue baseados em hemoglobina, são limitados em função de sua reatividade com óxido nítrico (NO). Em particular, o NO atua como um mensageiro químico no controle de muitos processos importantes *in vivo*, incluindo neurotransmissão, inflamação, agregação plaquetária e regulação do tônus dos músculos lisos gastrintestinais e vasculares. O NO reage diretamente com o O_2 que está ligado à hemoglobina para formar metemoglobina e nitrato. Tanto o ferro de heme quanto o NO ficam oxidados pelos átomos ligados de oxigênio, e a reação ocorre tão

rapidamente que não se observa nenhuma substituição de O₂ por NO (veja, por exemplo, a Patente U.S. N° 6.455.676).

Como o NO é produzido e consumido continuamente, há um turnover natural de NO *in vivo*. Quando se administra hemoglobina sem células, o equilíbrio entre a produção e o consumo de NO é alterada por reações com a hemoglobina sem células. A reação oxidativa entre NO e O₂ ligado à hemoglobina é irreversível, causando a destruição de NO, O₂ e hemoglobina. A ligação de NO à hemoglobina sem O₂ ligado é eficazmente irreversível no contexto fisiológico, na medida em que a meia-vida para a dissociação de nitrosil-hemoglobina é de 5-6 horas inativando eficazmente, dessa forma, hemoglobina como um transportador de O₂ sem células.

Após uma molécula de NO reagir com a hemoglobina, ela é eliminada do pool de moléculas sinalizadoras causando, dessa forma, certas condições adversas. Por exemplo, a ligação do NO à hemoglobina (com ou sem O₂ ligado) pode evitar o relaxamento vascular e potencialmente leva à hipertensão, a qual é observada algumas vezes após a administração de certas soluções de hemoglobina extracelular.

O NO também é necessário para mediar certas respostas inflamatórias. Por exemplo, o NO produzido pelo endotélio inibe a agregação plaquetária. Conseqüentemente, na medida em que o NO está ligado por hemoglobina sem célula (com ou sem O₂ ligado), a agregação plaquetária pode aumentar. À medida que as plaquetas se agregam, elas liberam compostos vasoconstritores potentes como, por exemplo, tromboxano A₂ e serotonina. Esses compostos podem atuar sinergicamente com os níveis reduzidos de NO causados pela remoção de

hemoglobina para produzir uma vasoconstrição significativa. Além de inibir a agregação plaquetária, o NO também inibe a adesão de neutrófilos às paredes celulares, o que, por sua vez, pode causar lesão da parede celular. Foi observado
5 dano da parede endotelial com a infusão de certas soluções de hemoglobina.

Outra desvantagem importante de substitutos do sangue baseados em hemoglobina é sua alta afinidade por O_2 . Essa alta afinidade limita a habilidade da hemoglobina para
10 liberar oxigênio em uma taxa clinicamente útil em localizações desejadas (por exemplo, tecidos periféricos). Alternativamente, a liberação de O_2 por substitutos do sangue baseados em hemoglobina de menor afinidade nas artérias antes de alcançar os leitos microvasculares pode
15 causar vasoconstrição em função da resposta vasoconstritora hiperóxica (hipótese de Winslow). Adicionalmente, substitutos do sangue baseados em hemoglobina são prejudicados pela depuração rápida da hemoglobina sem células do plasma em função da presença de receptores para
20 hemoglobina que removem a hemoglobina sem células do plasma. A hemoglobina sem célula também pode causar toxicidade renal, possivelmente em consequência da depleção de NO nos glomérulos, causando constrição e subsequente disfunção.

25 Em função das limitações dos substitutos do sangue atuais e da escassez crônica de sangue doado, permanece um interesse significativo em terapias adicionais ou alternativas para a liberação de oxigênio. Em particular, são desejados substitutos do sangue com uma menor
30 reatividade ao NO e/ou com um tempo de retenção plasmática

mais longo. Também são necessários transportadores de oxigênio com constantes de dissociação ou taxas inferiores para ligação de O_2 que sejam adequadas para aplicações clínicas ou industriais específicas. Uma aplicação industrial exemplar para a qual transportadores de O_2 são desejáveis inclui o crescimento de células em cultura, que é freqüentemente limitado pela quantidade de O_2 que chega às células.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção se baseia, em parte, na descoberta surpreendente de que proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes possuem uma reatividade ao NO bem menor do que a hemoglobina e, dessa forma, são transportadores de O_2 desejáveis. Se desejadas, podem ser introduzidas mutações nas proteínas H-NOX para alterar sua ligação de O_2 e ligantes de NO para otimizar ainda mais o uso de proteínas H-NOX como transportadores de O_2 .

Em um aspecto, a invenção apresenta proteínas H-NOX mutantes. Conseqüentemente, em algumas modalidades, a invenção fornece uma proteína H-NOX isolada que possui pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O_2 ou a reatividade ao NO, comparada com a de uma proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante está dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 2 nM a cerca de 50 μ M a 20°C, cerca de 50 nM a cerca de

10 μM a 20°C , cerca de 20 nM a cerca de 2 μM a 20°C , cerca de 100 nM a cerca de 1,9 μM a 20°C , cerca de 150 nM a cerca de μM a 20°C ou cerca de 100 nM a cerca de 255 nM a 20°C . Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da

5 proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 80 nM a 20°C como, por exemplo, entre cerca de 20 nM a cerca de 75 nM a 20°C . Em algumas modalidades, a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina como, por exemplo, pelo menos 1.000

10 vezes menor do que aquela da hemoglobina. Em algumas modalidades, a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C como, por exemplo, menos do que cerca de 600 s^{-1} , 500 s^{-1} , 400 s^{-1} , 300 s^{-1} , 200 s^{-1} , 100 s^{-1} , 75 s^{-1} , 50 s^{-1} , 25 s^{-1} , 20 s^{-1} , 10 s^{-1} ,

15 50 s^{-1} , 3 s^{-1} , 2 s^{-1} , $1,8\text{ s}^{-1}$, $1,5\text{ s}^{-1}$, $1,2\text{ s}^{-1}$, $1,0\text{ s}^{-1}$, $0,8\text{ s}^{-1}$, $0,7\text{ s}^{-1}$ ou $0,6\text{ s}^{-1}$ a 20°C . Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 0,01 a cerca de 200 s^{-1} a 20°C como, por exemplo, cerca de $1,0\text{ s}^{-1}$ a cerca de $16,0\text{ s}^{-1}$. Em algumas modalidades, a

20 constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM a cerca de 1,9 μM a 20°C , e a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $1,35\text{ s}^{-1}$ a cerca de $14,5\text{ s}^{-1}$ a 20°C . Em algumas modalidades, a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é

25 de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C . Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $1,35\text{ s}^{-1}$ a cerca de $14,5\text{ s}^{-1}$ a 20°C , e a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C . Em algumas

30 modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante

é entre cerca de $1,35 \text{ s}^{-1}$ a cerca de $14,5 \text{ s}^{-1}$ a 20°C , e a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C (por exemplo, menos do que cerca de 600 s^{-1} , 500 s^{-1} , 100 s^{-1} , 20 s^{-1} ou $1,8 \text{ s}^{-1}$ a 20°C).

5 Em algumas modalidades, a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C , e a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C (por exemplo, menos do que cerca de 600 s^{-1} , 500 s^{-1} , 100 s^{-1} , 20 s^{-1} ou $1,8 \text{ s}^{-1}$
10 20°C).

Em algumas modalidades, a invenção apresenta uma proteína H-NOX isolada que possui pelo menos uma mutação que altera a k_{off} para oxigênio ou a reatividade ao NO comparada com aquela de uma proteína H-NOX do tipo selvagem
15 correspondente. Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $0,01$ a cerca de 200 s^{-1} a 20°C , e a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX
20 mutante possui uma k_{off} para oxigênio que é menor ou igual a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C (por exemplo, entre cerca de $0,21 \text{ s}^{-1}$ a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C). Em algumas modalidades, a proteína H-NOX mutante derivada de uma proteína de *T. tengcongensis* e possui uma k_{off} para oxigênio entre cerca de
25 $1,35 \text{ s}^{-1}$ a cerca de 18 s^{-1} a 20°C . Em algumas modalidades, a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina como, por exemplo, pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina. Em algumas modalidades, a reatividade ao NO da
30 proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a

20°C como, por exemplo, menos do que cerca de 600 s⁻¹, 500 s⁻¹, 400 s⁻¹, 300 s⁻¹, 200 s⁻¹, 100 s⁻¹, 75 s⁻¹, 50 s⁻¹, 25 s⁻¹, 20 s⁻¹, 10 s⁻¹, 5 s⁻¹, 3 s⁻¹, 2 s⁻¹, 1,8 s⁻¹, 1,5 s⁻¹, 1,2 s⁻¹, 1,0 s⁻¹, 0,8 s⁻¹, 0,7 s⁻¹ ou 0,6 s⁻¹ a 20°C. Em algumas

5 modalidades, a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 1 nM a cerca de 1 mM a 20°C, entre cerca de 2 nM a cerca de 50 µM a 20°C, entre cerca de 50 nM a cerca de 10 µM a 20°C ou entre cerca de 100 nM a cerca de 1,9 µM a 20°C. Em algumas modalidades, a taxa de

10 auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h⁻¹ a 37°C. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM a cerca de 1,9 µM a 20°C, e a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos

15 do que cerca de 1 h⁻¹ a 37°C. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM a cerca de 1,9 µM a 20°C, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C (por exemplo, menos do que

20 cerca de 600 s⁻¹, 500 s⁻¹, 100 s⁻¹, 20 s⁻¹ ou 1,8 s⁻¹ a 20°C). Em algumas modalidades, a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h⁻¹ a 37°C, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C (por exemplo, menos do

25 que cerca de 600 s⁻¹, 500 s⁻¹, 100 s⁻¹, 20 s⁻¹ ou 1,8 s⁻¹ a 20°C).

Em várias modalidades, a invenção apresenta uma proteína H-NOX isolada que possui pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O₂ ou a

30 reatividade ao NO comparada com a de uma proteína H-NOX do

tipo selvagem correspondente. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante está dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM a cerca de 255 nM a 20°C. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é de menos de 80 nM a 20°C como, por exemplo, entre cerca de 20 nM a cerca de 75 nM a 20°C. Em algumas modalidades, a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina como, por exemplo, pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX mutante possui uma k_{off} para oxigênio que é menor ou igual a cerca de $0,65\ s^{-1}$ a 20°C (por exemplo, entre cerca de $0,21\ s^{-1}$ a cerca de $0,65\ s^{-1}$ a 20°C). Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $1,35\ s^{-1}$ a cerca de $2,9\ s^{-1}$ a 20°C. Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $5,8\ s^{-1}$ a cerca de $19\ s^{-1}$ a 20°C. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX mutante é estável a 4°C no ar.

Em algumas modalidades, a invenção apresenta uma proteína H-NOX isolada que possui pelo menos uma mutação que altera a k_{off} para oxigênio ou a reatividade ao NO comparada com a de uma proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente. Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é menor ou igual a cerca de 0,65

s^{-1} a $20^{\circ}C$, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina. Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $0,21 s^{-1}$ a cerca de $0,65 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$. Em algumas modalidades, a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina como, por exemplo, pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina. Em algumas modalidades, a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de $700 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$ como, por exemplo, menos do que cerca de $600 s^{-1}$, $500 s^{-1}$, $400 s^{-1}$, $300 s^{-1}$, $200 s^{-1}$, $100 s^{-1}$, $75 s^{-1}$, $50 s^{-1}$, $25 s^{-1}$, $20 s^{-1}$, $10 s^{-1}$, $50 s^{-1}$, $3 s^{-1}$, $2 s$, $1,8 s^{-1}$, $1,5 s^{-1}$, $1,2 s^{-1}$, $1,0 s^{-1}$, $0,8 s^{-1}$, $0,7 s^{-1}$ ou $0,6 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $100 nM$ a cerca de $1,9 \mu M$ a $20^{\circ}C$. Em algumas modalidades, a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de $1 h^{-1}$ a $37^{\circ}C$. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $100 nM$ a cerca de $1,9 \mu M$ a $20^{\circ}C$, e a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de $1 h^{-1}$ a $37^{\circ}C$. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $100 nM$ a cerca de $1,9 \mu M$ a $20^{\circ}C$, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de $700 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$ (por exemplo, menos do que cerca de $600 s^{-1}$, $500 s^{-1}$, $100 s^{-1}$, $20 s^{-1}$, $1,8 s^{-1}$ ou $0,7 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$). Em algumas modalidades, a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de $1 h^{-1}$ a $37^{\circ}C$, e a

reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C (por exemplo, menos do que cerca de 600 s^{-1} , 500 s^{-1} , 100 s^{-1} , 20 s^{-1} , $1,8 \text{ s}^{-1}$ ou $0,7 \text{ s}^{-1}$ a 20°C).

5 Em várias modalidades, a invenção apresenta uma proteína H-NOX isolada selecionada do grupo que consiste em H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*,
 10 H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, L2 F9W-F142Y, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, $\beta 1(1-385)$, $\beta 1(1-385)$ I145Y, $\beta 1(1-385)$ I145H, $\beta 1(1-194)$, $\beta 1(1-194)$ I145Y, $\beta 1(1-194)$ L9W-I145Y, $\beta 2(1-217)$, $\beta 2(1-217)$ I142Y, H-
 15 NOX(1-175) de *C. botulinum*, H-NOX(1-186) de *C. botulinum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, e H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*. Em algumas modalidades, a proteína $\beta 1$ ou $\beta 2$ é derivada de uma proteína $\beta 1$ ou $\beta 2$ de *R. norvegicus* ou *H. sapiens*.

20 Em várias modalidades, a invenção apresenta uma

proteína H-NOX isolada selecionada do grupo que consiste em
 H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T.*
tengcongensis, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX
 W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T.*
 5 *tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX
 W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-
 NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T.*
tengcongensis, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H
 de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*,
 10 H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T.*
tengcongensis, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H
 de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-
 His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-
 His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 F9W-
 15 F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX(728-899) de *D.*
desulfuricans, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1(1-385)
 I145H, β 1(1-194), β 1(1-194) I145Y, β 1(1-194) L9W-I145Y,
 β 2(1-217), β 2(1-217) I142Y, H-NOX(1-175) de *C. botulinum*, H-
 NOX(1-186) de *C. botulinum*, H-NOX(1-197) de *C.*
 20 *acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum* e H-NOX
 GCY-35(1-252) de *C. elegans*. Em algumas modalidades, a
 proteína β 1 ou β 2 é derivada de uma proteína β 1 ou β 2 de *R.*
norvegicus ou *H. sapiens*.

Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a
 25 constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX está
 dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina alfa
 de *Homo sapiens*, por exemplo, uma constante de dissociação
 de O₂ entre 0,1 a 10 vezes ou entre 0,5 a 2 vezes a da
 hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. Em algumas modalidades
 30 das proteínas H-NOX isoladas, a reatividade ao NO da

proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina alfa de *Homo sapiens* como, por exemplo, pelo menos 100 vezes ou 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX contém uma ou mais mutações (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 mutações) comparada com a proteína H-NOX da qual foi derivada. Em várias modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX contém menos de 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ou 2 mutações, comparada com a proteína H-NOX da qual foi derivada. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX possui pelo menos uma mutação da bolsa distal. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX possui pelo menos uma mutação que não está na bolsa distal. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX possui pelo menos uma mutação na qual um resíduo que corresponde a Ile5, Trp9, Asn74, Pro115 ou Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* ou I145 de $\beta 1(1-385)$ é substituído por qualquer outro aminoácido. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX possui pelo menos duas mutações, em que pelo menos uma mutação é a substituição de um resíduo que corresponde a Ile5, Trp9, Asn74, Pro115 ou Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* ou I145 de $\beta 1(1-385)$ por qualquer outro aminoácido. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a mutação na proteína H-NOX corresponde a uma mutação de I5A, uma mutação de I5L, uma mutação de W9F, uma mutação de Y140F, uma mutação de Y140H, uma mutação dupla de W9F Y140H ou uma mutação dupla F78Y Y 140F de *T. tengcongensis* ou uma

mutação de I145Y de $\beta 1$. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a mutação na proteína H-NOX corresponde a uma mutação de W9Y, uma mutação de W9H, uma mutação de W9N, uma mutação de N74H, uma mutação de N74E, uma mutação de N74A, uma mutação de P115A, uma mutação de RQ135, um mutante duplo de I5L P115A, um mutante duplo de N74A Y140H, ou um mutante duplo W9F N74A de *T. tengcongensis*. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, pelo menos um aminoácido do terminal C (por exemplo, pelo menos cerca de 50 aminoácidos contíguos do terminal C ou entre cerca de 25 a cerca de 200 aminoácidos contíguos do terminal C) na proteína H-NOX foram removidos, comparadas com a proteína do tipo selvagem correspondente.

Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX é derivada de uma proteína de mamífero (por exemplo, uma proteína humana como, por exemplo, $\beta 1$). Em várias modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX é derivada de uma proteína bacteriana (por exemplo, uma proteína de *T. tengcongensis*). Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX está ligada covalentemente a outra molécula ou porção, por exemplo, polietileno glicol. Heme pode ou não estar ligado à proteína H-NOX. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, o oxigênio está ligado à proteína H-NOX. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX é uma proteína de fusão que inclui um domínio de H-NOX e parte de outra proteína ou outra proteína inteira, por exemplo, albumina (por exemplo, albumina sérica humana).

Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a

proteína H-NOX não é H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX
 F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX do tipo selvagem de
T. tengcongensis ou 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*. Em
 algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a
 5 proteína H-NOX não é $\beta 2(1-217)$ de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-194)$
 de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-385)$ de *R. norvegicus* ou $\beta 1(1-385)$
 I145Y de *R. norvegicus*. Em algumas modalidades das
 proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX não é H-NOX W9F
 de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis* ou $\beta 1$
 10 H-NOX (1-385) I145Y de *H. sapiens*. Em algumas modalidades
 das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX não é H-NOX
 Y140H de *T. tengcongensis*, $\beta 1$ I140Y de *H. sapiens* ou $\beta 1$
 I145Y de *H. sapiens*. Em algumas modalidades das proteínas
 H-NOX isoladas, a proteína H-NOX não é H-NOX Y140F de *T.*
 15 *tengcongensis*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*,
 $\beta 1$ H-NOX I140Y de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de
H. sapiens, sGC $\beta 1$ H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC $\beta 1$
 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC $\beta 1$ H-NOX H105G de
R. norvegicus, sGC $\beta 1$ H-NOX H105F de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-
 20 NOX I145Y de *R. norvegicus* sGC, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem
 de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *D.*
melanogaster, CG14885-PA do tipo selvagem de *D.*
melanogaster H-NOX, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C.*
elegans, H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do
 25 tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de
S. oneidensis ou H-NOX do tipo selvagem de *C.*
acetobutylicum. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX
 isoladas, a proteína H-NOX não é H-NOX Y40L de *T.*
tengcongensis, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX
 30 W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*,

H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, β 1 H-NOX I140Y de *H. sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, sGC β 1 H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC β 1 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC β 1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC β 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX I145Y de *R. norvegicus* sGC, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG 14885-PA H-NOX do tipo selvagem *D. melanogaster*, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis* ou H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX não é qualquer uma das proteínas H-NOX seguintes que estão listadas pelo nome de seu gene, seguido pela abreviatura de sua espécie e Identificadores no Genbank (por exemplo, as seguintes seqüências de proteínas disponíveis em 21 de maio de 2006; 22 de maio de 2006; 21 de maio de 2007; ou 22 de maio de 2007):

| | |
|----------------------------|----------------------------------|
| Npun5905_Npu_23129606, | alr2278_Ana_17229770, |
| SO2144_Sone_24373702, | Mdeg1343_Mde_23027521, |
| VCA0720_Vch_15601476, | CC2992_Ccr_16127222, |
| Rsph2043_Rhsp_22958463 | (gi: 46192757), |
| Mmc10739_Mcsp_22999020, | Tar4_Tte_20807169, |
| Ddes2822_Dde_23475919, | CAC3243_Cac_15896488, |
| 31_Ce_17568389, | CG14885_Dm_24647455, |
| HpGCS-beta1_Hpul_14245738, | GUCY1B3_Hs_4504215, |
| CG4154_Dm_24646993 | (gi: NP_650424.2, gi: 62484298), |
| 32_Ce_13539160, | gcy-36_Ce_17568391 |
| | (gi: 32566352, gi: |

86564713), gcy-35_Ce-17507861 (gi: 71990146),
gcy-37_Ce_17540904 (gi: 71985505), GCY1α3_Hs_20535603,
GCY1α2-Hs_899477 ou GYCa99B_Dm_729270 (gi: 68067738)
(Lakshminarayan e cols. (2003), "Ancient conserved domains
5 shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial
signaling proteins", *BMG Genomics* 4: 513). As abreviações
de espécies usadas nesses nomes incluem: Ana = *Anabaena Sp*;
Ccr = *Caulobacter crescentus*; Cac = *Clostridium*
acetobutylicum; Dde = *Desulfovibrio desulfuricans*; Mcsp =
10 *Magnetococcus sp.*; Mde = *Microbulbifer degradans*; Npu =
Nostoc punctiforme; Rhsp = *Rhodobacter sphaeroides*; Sone =
Shewanella oneidensis; Tte = *Thermoanaerobacter*
tengcongensis; Vch = *Vibrio cholerae*; Ce = *Caenorhabditis*
elegans; Dm = *Drosophila melanogaster*; Hpul = *Hemicentrotus*
15 *pulcherrimus*; Hs = *Homo sapiens*. Em algumas modalidades das
proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX não é qualquer
uma das proteínas H-NOX seguintes que estão listadas por
seu nome do organismo e número de acesso na base de dados
Pfam (por exemplo, as seqüências de proteínas seguintes
20 disponíveis em 21 de maio de 2006; 22 de maio de 2006; 17
de maio de 2007; 21 de maio de 2007; ou 22 de maio de
2007): *Caenorhabditis briggsae* Q622M5_CAEBR, *Caenorhabditis*
briggsae Q61P44_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*
Q61R54_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61V90_CAEBR,
25 *Caenorhabditis briggsae* Q61A94_CAEBR, *Caenorhabditis*
briggsae Q60TP4_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*
Q60M10_CAEBR, *Caenorhabditis elegans* GCY37-CAEEL,
Caenorhabditis elegans GCY31-CAEEL, *Caenorhabditis elegans*
GCY36-CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY32-CAEEL,
30 *Caenorhabditis elegans* GCY35-CAEEL, *Caenorhabditis elegans*

GCY34_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY33_CAEEL, *Oryzias*
curvinotus Q7T040_ORYCU, *Oryzias curvinotus* Q75WF0_ORYCU,
Oryzias latipes P79998_ORYLA, *Oryzias latipes* Q7ZSZ5_ORYLA,
Tetraodon nigroviridis Q4SW38_TETNG, *Tetraodon nigroviridis*
 5 *Q4RZ94_TETNG*, *Tetraodon nigroviridis* Q4S6K5_TETNG, *Fugu*
rubripes Q9OVY5_FUGRU, *Xenopus laevis* Q6INK9_XENLA, *Homo*
sapiens Q5T8J7_HUMAN, *Homo sapiens* GCYA2_HUMAN, *Homo*
sapiens GCYB2_HUMAN, *Homo sapiens* GCYB1_HUMAN, *Gorilla*
gorilla Q9N193_9PRIM, *Pongo pygmaeus* Q5RAN8_PONPY, *Pan*
 10 *troglodytes* Q9N192_PANTR, *Macaca mulatta* Q9N194_MACMU,
Hylobates lar Q9N191_HYLLA, *Mus musculus* Q8BXH3_MOUSE, *Mus*
musculus GCYB1_MOUSE, *Mus musculus* Q3UTI4_MOUSE, *Mus*
musculus Q3UH83_MOUSE, *Mus musculus* Q6XE41_MOUSE, *Mus*
musculus Q80YP4_MOUSE, *Rattus norvegicus* Q8OWX7_RAT, *Rattus*
 15 *norvegicus* Q80WX8_RAT, *Rattus norvegicus* Q920Q1_RAT, *Rattus*
norvegicus Q54A43_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY0_RAT, *Rattus*
norvegicus Q80WY4_RAT, *Rattus norvegicus* Q8CH85_RAT, *Rattus*
norvegicus Q80WY5_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB1_RAT, *Rattus*
norvegicus Q8CH90_RAT, *Rattus norvegicus* Q91XJ7_RAT, *Rattus*
 20 *norvegicus* Q80WX9_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB2_RAT, *Rattus*
norvegicus GCYA2_RAT, *Canis familiaris* Q4ZHR9_CANFA, *Bos*
taurus GCYB1_BOVIN, *Sus scrofa* Q4ZHR7_PIG, *Gryllus*
bimaculatus Q59HN5_GRYBI, *Manduca sexta* O77106_MANSE,
Manduca sexta O76340_MANSE, *Apis mellifera* Q5UAF0_APIME,
 25 *Apis mellifera* Q5FAN0_APIME, *Apis mellifera* Q6L5L6_APIME,
Anopheles gambiae cepa PEST Q7PYK9_ANOGA, *Anopheles gambiae*
cepa PEST Q7Q9W6_ANOGA, *Anopheles gambiae* cepa PEST
 Q7QF3I_ANOGA, *Anopheles gambiae* cepa PEST Q7PS01_ANOGA,
Anopheles gambiae cepa PEST Q7PFY2_ANOGA, *Anopheles gambiae*
 30 *Q7KQ93_ANOGA*, *Drosophila melanogaster* Q24086_DROME,

Drosophila melanogaster GCYH_DROME, *Drosophila melanogaster*
 GCY8E_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYDA_DROME,
Drosophila melanogaster GCYDB_DROME, *Drosophila*
melanogaster Q9VA09_DROME, *Drosophila pseudoobscura*
 5 Q29CE1_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C7_DROPS,
Drosophila pseudoobscura Q296C8_DROPS, *Drosophila*
pseudoobscura Q29BU7_DROPS, *Aplysia californica*
 Q7YWK7_APLCA, *Hemicentrotus pulcherrimus* Q95NK5_HEMPU,
Chlamydomonas reinhardtii, Q5YLC2_CHLRE, *Anabaena* sp
 10 Q8YUQ7_ANASP, *Flavobacterium bacterium* BBFL7 Q26GR8_9BACT,
Psychroflexus torquis ATCC 700755 Q1VQE5_9FLAO,
proteobactéria marinha gama HTCC2207 Q1YPJ5_9GAMM,
proteobactéria marinha gama HTCC2207 Q1YTK4_9GAMM,
Caulobacter crescentus Q9A451_CAUCR, *Acidiphilium cryptum*
 15 JF-5 Q2DG60_ACICY, *Rhodobacter sphaeroides* Q3J0U9_RHOS4,
Silicibacter pomeroyi Q5LPV1_SILPO, *Paracoccus*
denitrificans PD1222, Q3PC67_PARDE, *Silicibacter* sp TM1040
 Q3QNY2_9RHOB, *Jannaschia* sp Q28ML8_JANSC, *Magnetococcus* sp
 MC-1 Q3XT27_9PROT, *Legionella pneumophila* Q5WXP0_LEGPL,
 20 *Legionella pneumophila* Q5WTZ5_LEGPL, *Legionella pneumophila*
 Q5X268_LEGPA, *Legionella pneumophila* Q5X2R2_LEGPA,
Legionella pneumophila subsp. *pneumophila* Q5ZWM9_LEGPH,
Legionella pneumophila subsp. *pneumophila* Q5ZSQ8_LEGPH,
Colwellia psychrerythraea Q47Y43_COLP3, *Pseudoalteromonas*
 25 *atlantica* T6c Q3CSZ5_ALTAT, *Shewanella oneidensis*
 Q8EF49_SHEON, *Saccharophagus degradans* Q21E20_SACD2,
Saccharophagus degradans Q21ER7_SACD2, *Vibrio angustum* S14
 Q1ZWE5_9VIBR, *Vibrio vulnificus* Q8DAE2_VIBVU, *Vibrio*
alginolyticus 12G01 Q1VCP6_VIBAL, *Vibrio* sp DAT722
 30 Q2FA22_9VIBR, *Vibrio parahaemolyticus* Q87NJ1_VIBPA, *Vibrio*

fischeri Q5EIF5_VIBF1, *Vibrio vulnificus* Q7MJS8_VIBVY,
Photobacterium sp SKA34 Q2C6Z5_9GAMM, *Hahella chejuensis*
 Q2SFY7_HAHCH, *Oceanospirillum* sp MED92 Q2BKV0_9GAMM,
Oceanobacter sp RED65 Q1NO35_9GAMM, *Desulfovibrio*
 5 *desulfuricans* Q310U7_DESDG, *Halothermothrix orenii* H 168
 Q2AIW5_9FIRM, *Thermoanaerobacter tengcongensis*
 Q8RBX6_THETN, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903
 Q2ZH17_CALSA, *Clostridium acetobutylicum* Q97E73_CLOAB,
Alkaliphilus metalliredigenes QYMF Q3C763_9CLOT,
 10 *Clostridium tetani* Q899J9_CLOTE e *Clostridium beijerincki*
 NCIMB 8052 Q2WVN0_CLOSE. Em algumas modalidades das
 proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX não é sGC β 1 H-
 NOX C78S de *R. norvegicus* ou sGC β 1 H-NOX C78E de *R.*
norvegicus. Em algumas modalidades das proteínas H-NOX
 15 isoladas, a proteína H-NOX não possui uma mutação no motivo
 Y-S-R, que inclui Tyr135, Ser137 e Arg139 de H-NOX humana.

Em um aspecto, a invenção apresenta um ácido nucléico
 recombinante que codifica qualquer uma ou mais das
 proteínas H-NOX mutantes aqui descritas. Em modalidades
 20 específicas, o ácido nucléico inclui um segmento ou toda a
 sequência de ácidos nucléicos de qualquer um dos ácidos
 nucléicos mostrados nas FIGS. 2-4D ou 8A-8DD. Em algumas
 modalidades, o ácido nucléico codifica uma proteína de
 fusão que inclui um domínio de H-NOX e parte de outra
 25 proteína ou outra proteína inteira, por exemplo, albumina
 (por exemplo, albumina sérica humana). Em algumas
 modalidades, o ácido nucléico inclui pelo menos cerca de
 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, ou mais
 nucleotídeos contíguos de um ácido nucléico de H-NOX e
 30 contém uma ou mais mutações (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9 ou 10 mutações), comparado com o ácido nucléico de H-NOX do qual foi derivado. Em várias modalidades, um ácido nucléico de H-NOX mutante contém menos do que cerca de qualquer uma de 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ou 2
5 mutações, comparado com o ácido nucléico de H-NOX do qual foi derivado. A invenção também apresenta variantes degeneradas de qualquer ácido nucléico que codifica uma proteína H-NOX mutante.

Ainda em outro aspecto, a invenção fornece um vetor
10 que inclui qualquer um ou mais dos ácidos nucléicos de H-NOX mutantes aqui descritos. Em outro aspecto, a invenção apresenta uma célula que inclui qualquer um ou mais dos ácidos nucléicos de H-NOX mutantes aqui descritos. Em um aspecto, a invenção apresenta uma célula que inclui
15 qualquer vetor aqui descrito.

Em um aspecto, a invenção apresenta um método de produção de uma proteína H-NOX. Esse método envolve o cultivo de uma célula que possui um ácido nucléico que codifica qualquer uma ou mais das proteínas H-NOX mutantes
20 aqui descritas, sob condições adequadas à produção da proteína H-NOX mutante. Em algumas modalidades, a invenção ainda inclui a etapa de purificação da proteína H-NOX mutante.

Em um aspecto, a invenção apresenta composições
25 farmacêuticas que incluem uma ou mais proteínas H-NOX, por exemplo, qualquer uma das proteínas H-NOX do tipo selvagem ou mutantes aqui descritas. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica inclui uma quantidade farmacêuticamente aceitável de uma proteína H-NOX aqui
30 descrita e um veículo farmacêuticamente aceitável. Em

algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 1 nM e cerca de 1 mM a 20°C, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C (por exemplo, menos do que

5 cerca de 600 s^{-1} , 500 s^{-1} , 100 s^{-1} , 20 s^{-1} ou 1,8 s^{-1} a 20°C). Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM a cerca de 2 μM a 20°C, e a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,0 s^{-1} a cerca de 16,0 s^{-1} a 20°C. Em algumas

10 modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM a cerca de 2 μM a 20°C, e a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre

15 cerca de 20 nM a cerca de 2 μM a 20°C, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C (por exemplo, menos do que cerca de 600 s^{-1} , 500 s^{-1} , 100 s^{-1} , 20 s^{-1} , ou 1,8 s^{-1} a 20°C). Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,0

20 s^{-1} a cerca de 16,0 s^{-1} a 20°C, e a taxa de auto-oxidação de heme da proteína X é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C. Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,0 s^{-1} a cerca de 16,0 s^{-1} a 20°C, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca

25 de 700 s^{-1} a 20°C (por exemplo, menos do que cerca de 600 s^{-1} , 500 s^{-1} , 100 s^{-1} , 20 s^{-1} ou 1,8 s^{-1} a 20°C).

Em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade farmaceuticamente aceitável de uma proteína H-NOX e um

30 veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas

modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX está dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina. Em
5 algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 0,01 e cerca de 200 s^{-1} a 20°C , em que a reatividade ao NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

Em algumas modalidades das composições farmacêuticas,
10 a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX está dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina alfa de *Homo sapiens*, por exemplo, uma constante de dissociação de O_2 entre 0,1 a 10 vezes ou entre 0,5 a 2 vezes a da hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. Em algumas modalidades
15 das composições farmacêuticas, a reatividade ao NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina alfa de *Homo sapiens* como, por exemplo, pelo menos 100 vezes ou 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. Em algumas modalidades
20 das composições farmacêuticas, a proteína H-NOX é uma proteína do tipo selvagem. Em algumas modalidades das composições farmacêuticas, a proteína H-NOX é uma proteína mutante aqui descrita. Em várias modalidades das composições farmacêuticas, a proteína H-NOX possui pelo
25 menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O_2 , a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme, a reatividade ao NO, a estabilidade ao NO, ou qualquer duas ou mais das citadas anteriormente, comparada com a de uma proteína do tipo selvagem correspondente. Em algumas
30 modalidades das composições farmacêuticas, a proteína H-NOX

é uma selecionada do grupo que consiste em H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*,
 5 H-NOX W9FY140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H
 10 de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6
 15 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 1 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*,
 20 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX do tipo selvagem de *D. desulfuricans*, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-385) de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145H de *H. sapiens*, β 1(1-194) de *H. sapiens*, β 1(1-194) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-194) L9W-I145Y de *H. sapiens*, β 2(1-217) de *H. sapiens*, β 2(1-217) I142Y de *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105G de *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105F de *H. sapiens*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, β 1(1-385) de *R. norvegicus*,
 30 β 1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145H de *R.*

norvegicus, $\beta 1(1-194)$ de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-194)$ I145Y de
R. norvegicus, $\beta 1(1-194)$ L9W-I145Y de *R. norvegicus*, $\beta 2(1-217)$ de *R. norvegicus*, $\beta 2(1-217)$ I142Y de *R. norvegicus*, $\beta 1$
H-NOX H105G de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX H105F de *R.*
5 *norvegicus*, H-NOX(1-175) de *C. botulinum*, H-NOX(1-186) de
C. botulinum, H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*,
H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C.*
acetobutylicum, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C.*
elegans, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, $\beta 1$ H-NOX do
10 tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo
selvagem de *D. melanogaster*, CG14886 do tipo selvagem de *D.*
melanogaster, CG4154 do tipo selvagem de *D. melanogaster*;
H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo
selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S.*
15 *oneidensis*, H-NOX do tipo selvagem de *M. musculus*, H-NOX do
tipo selvagem de *C. familiaris*, H-NOX do tipo selvagem de
B. taurus, H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*; H-NOX
do tipo selvagem de *X. laevis*, H-NOX do tipo selvagem de *O.*
latipes, H-NOX do tipo selvagem de *O. curivatus*, H-NOX do
20 tipo selvagem de *F. rubripes*, H-NOX do tipo selvagem de *A.*
gambiae, H-NOX do tipo selvagem de *M. sexta*; gcy-31 do tipo
selvagem de *C. elegans*, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 do
tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-34 do tipo selvagem de *C.*
elegans, gcy-35 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-36 do
25 tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-37 do tipo selvagem de *C.*
elegans; H-NOX do tipo selvagem de *V. cholera*, H-NOX do
tipo selvagem de *V. fischerii* e H-NOX do tipo selvagem de
N. punctiforme. Em algumas modalidades das composições
farmacêuticas, a composição farmacêutica inclui um ou mais
30 lipossomos ou nanopartículas que incluem ou encapsulam a

proteína H-NOX.

Em algumas modalidades das composições farmacêuticas, a proteína H-NOX não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*. Em algumas modalidades das composições farmacêuticas, a

5 proteína H-NOX não é H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis* ou 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophilia*. Em algumas modalidades das composições farmacêuticas, a

10 proteína H-NOX não é $\beta 2$ (1-217) de *R. norvegicus*, $\beta 1$ (1-194) de *R. norvegicus*, $\beta 1$ (1-385) de *R. norvegicus* ou $\beta 1$ (1-385) I145Y de *R. norvegicus*. Em algumas modalidades das composições farmacêuticas, a proteína H-NOX não é H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis* ou $\beta 1$ H-NOX (1-385) I145Y de *H. sapiens*. Em algumas modalidades,

15 proteína H-NOX não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, $\beta 1$ I140Y de *H. sapiens* ou $\beta 1$ I145Y de *H. sapiens*. Em algumas modalidades das composições farmacêuticas, a proteína H-NOX não é H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophilia*, $\beta 1$ H-NOX I140Y de *H. sapiens*,

20 $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, sGC $\beta 1$ H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC $\beta 1$ H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC $\beta 1$ H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC $\beta 1$ H-NOX H105F de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX I145Y de *R. norvegicus* sGC, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX

25 do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster* H-NOX, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis* ou H-NOX do tipo selvagem

30 de *C. acetobutylicum*. Em algumas modalidades das

composições farmacêuticas, a proteína H-NOX não é H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, β 1 H-NOX I140Y de *H. sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, sGC β 1 H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC β 1 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC β 1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC β 1 H-NOX H 105F de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX I145Y de *R. norvegicus* sGC, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG 14885-PA H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis* ou H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*.

Em algumas modalidades das composições farmacêuticas, a proteína H-NOX não é qualquer uma das proteínas H-NOX seguintes que estão listadas pelo nome de seu gene, seguido pela abreviatura de sua espécie e Identificadores no Genbank (por exemplo, as seguintes seqüências de proteínas disponíveis em 21 de maio de 2006; 22 de maio de 2006; 21 de maio de 2007; ou 22 de maio de 2007):

| | | |
|----|-------------------------|----------------------------|
| 25 | Npun5905_Npu_23129606, | alr2278_Ana_17229770, |
| | SO2144_Sone_24373702, | Mdeg1343_Mde_23027521, |
| | VCA0720_Vch_15601476, | CC2992_Ccr_16127222, |
| | Rsph2043_Rhsp_22958463 | (gi: 46192757), |
| | Mmc10739_Mcsp_22999020, | Tar4_Tte_20807169, |
| 30 | Ddes2822_Dde_23475919, | CAC3243_Cac_15896488, gcy- |

31_Ce_17568389, CG14885_Dm_24647455, GUCY1B3_Hs_4504215,
 HpGCS-beta1_Hpul_14245738, Gycbeta100B_Dm_24651577,
 CG4154_Dm_24646993 (gi: NP_650424.2, gi: 62484298), gcy-
 32_Ce_13539160, gcy-36_Ce_17568391 (gi: 32566352, gi:
 5 86564713), gcy-35_Ce-17507861 (gi: 71990146), gcy-
 37_Ce_17540904 (gi: 71985505), GCY1 α 3_Hs_20535603,
 GCY1 α 2-Hs_899477 ou GYC α -99B_Dm_729270 (gi: 68067738)
 (Lakshminarayan e cols. (2003), "Ancient conserved domains
 shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial
 10 signaling proteins", *BMG Genomics* 4: 5-13). As abreviações
 de espécies usadas nesses nomes incluem: Ana = *Anabaena Sp*;
 Ccr = *Caulobacter crescentus*; Cac = *Clostridium*
acetobutylicum; Dde = *Desulfovibrio desulfuricans*; Mcsp =
Magnetococcus sp.; Mde = *Microbulbifer degradans*; Npu =
 15 *Nostoc punctiforme*; Rhsp = *Rhodobacter sphaeroides*; Sone =
Shewanella oneidensis; Tte = *Thermoanaerobacter*
tengcongensis; Vch = *Vibrio cholerae*; Ce = *Caenorhabditis*
elegans; Dm = *Drosophila melanogaster*; Hpul = *Hemicentrotus*
pulcherrimus; Hs = *Homo sapiens*. Em algumas modalidades das
 20 composições farmacêuticas, a proteína H-NOX não é sGC β 1 H-
 NOX C78S de *R. norvegicus* ou sGC β 1 H-NOX C78E de *R.*
norvegicus. Em algumas modalidades das composições
 farmacêuticas, a proteína H-NOX não é qualquer uma das
 proteínas H-NOX seguintes que estão listadas por seu nome
 25 do organismo e número de acesso na base de dados Pfam (por
 exemplo, as seguintes seqüências de proteínas disponíveis
 em 21 de maio de 2006; 22 de maio de 2006; 17 de maio de
 2007; 21 de maio de 2007; ou 22 de maio de 2007):
Caenorhabditis briggsae Q622M5_CAEBR, *Caenorhabditis*
 30 *briggsae* Q61P44_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*

Q61R54_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61V90_CAEBR,
Caenorhabditis briggsae Q61A94_CAEBR, *Caenorhabditis*
briggsae Q60TP4_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*
 Q60M10_CAEBR, *Caenorhabditis elegans* GCY37_CAEEL,
 5 *Caenorhabditis elegans* GCY31_CAEEL, *Caenorhabditis elegans*
 GCY36_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY32_CAEEL,
Caenorhabditis elegans GCY35_CAEEL, *Caenorhabditis elegans*
 GCY34_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY33_CAEEL, *Oryzias*
curvinotus Q7T040_ORYCU, *Oryzias curvinotus* Q75 WF0_ORYCU,
 10 *Oryzias latipes* P79998_ORYLA, *Oryzias latipes* Q7ZSZ5_ORYLA,
Tetraodon nigroviridis Q4SW38_TETNG, *Tetraodon nigroviridis*
 Q4RZ94_TETNG, *Tetraodon nigroviridis* Q4S6K5_TETNG, *Fugu*
rubripes Q90VY5_FUGRU, *Xenopus laevis* Q6INK9_XENLA, *Homo*
sapiens Q5T8J7_HUMAN, *Homo sapiens* GCYA2_HUMAN, *Homo*
 15 *sapiens* GCYB2_HUMAN, *Homo sapiens* GCYB1_HUMAN, *Gorilla*
gorilla Q9N193_9PRIM, *Pongo pygmaeus* Q5RAN8_PONPY, *Pan*
trogloodytes Q9N192_PANTR, *Macaca mulatta* Q9N194_MACMU,
Hylobates lar Q9N191_HYLLA, *Mus musculus* Q8BXH3_MOUSE, *Mus*
musculus GCYBI_MOUSE, *Mus musculus* Q3UTI4_MOUSE, *Mus*
 20 *musculus* Q3UH83_MOUSE, *Mus musculus* Q6XE41_MOUSE, *Mus*
musculus Q80YP4_MOUSE, *Rattus norvegicus* Q80WX7_RAT, *Rattus*
norvegicus Q80WX8_RAT, *Rattus norvegicus* Q920Q1_RAT, *Rattus*
norvegicus Q54A43_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY0_RAT, *Rattus*
norvegicus Q80WY4_RAT, *Rattus norvegicus* Q8CH85_RAT, *Rattus*
 25 *norvegicus* Q80WY5_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB1_RAT, *Rattus*
norvegicus Q8CH90_RAT, *Rattus norvegicus* Q91XJ7_RAT, *Rattus*
norvegicus Q80WX9_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB2_RAT, *Rattus*
norvegicus GCYA2_RAT, *Canis familiaris* Q4ZHR9_CANFA, *Bos*
taurus GCYB1_BOVIN, *Sus scrofa* Q4ZHR7_PIG, *Gryllus*
 30 *bimaculatus* Q59HN5_GRYBI, *Manduca sexta* O77106_MANSE,

Manduca sexta O76340_MANSE, *Apis mellifera* Q5UAF0_APIME,
Apis mellifera Q5FAN0_APIME, *Apis mellifera* Q6L5L6_APIME,
Anopheles gambiae cepa PEST Q7PYK9_ANOGA, *Anopheles gambiae*
 cepa PEST Q7Q9W6_ANOGA, *Anopheles gambiae* cepa PEST
 5 Q7QF31_ANOGA, *Anopheles gambiae* cepa PEST Q7PS01_ANOGA,
Anopheles gambiae cepa PEST Q7PFY2_ANOGA, *Anopheles gambiae*
 Q7KQ93_ANOGA, *Drosophila melanogaster* Q24086_DROME,
Drosophila melanogaster GCYH_DROME, *Drosophila melanogaster*
 GCY8E_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYDA_DROME,
 10 *Drosophila melanogaster* GCYDB_DROME, *Drosophila*
melanogaster Q9VA09_DROME, *Drosophila pseudoobscura*
 Q29CE1_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C7_DROPS,
Drosophila pseudoobscura Q296C8_DROPS, *Drosophila*
pseudoobscura Q29BU7_DROPS, *Aplysia californica*
 15 Q7YWK7_APLCA, *Hemicentrotus pulcherrimus* Q95NK5_HEMPU,
Chlamydomonas reinhardtii, Q5YLC2_CHLRE, *Anabaena* sp Q8YUQ7
 ANASP, *Flavobacterium bacterium* BBFL7 Q26GR8 9BACT,
Psychroflexus torquis ATCC 700755 Q VQE5_9FLAO,
proteobactéria marinha gama HTCC2207 Q1YPJ5_9GAMM,
 20 *proteobactéria* marinha gama HTCC2207 QIYTK4_9GAMM,
Caulobacter crescentus Q9A451_CAUCR, *Acidiphilium cryptum*
 JF-5 Q2DG60_ACICY, *Rhodobacter sphaeroides* Q3J0U9 RHOS4,
Silicibacter pomeroyi Q5LPV1_SILPO, *Paracoccus*
denitrificans PD1222, Q3PC67_PARDE, *Silicibacter* sp TMI 040
 25 Q3QNY2 9RHOB, *Jannaschia* sp Q28ML8_JANSC, *Magnetococcus* sp
 MC-1 Q3XT27_9PROT, *Legionella pneumophila* Q5WXP0_LEGPL,
Legionella pneumophila Q5WTZ5_LEGPL, *Legionella pneumophila*
 Q5X268_LEGPA, *Legionella pneumophila* Q5X2R2_LEGPA,
Legionella pneumophila subsp. *pneumophila* Q5ZWM9_LEGPH,
 30 *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* Q5ZSQ8_LEGPH,

Colwellia psychrerythraea Q47Y43_COLP3, *Pseudoalteromonas*
atlantica T6c Q3CSZ5_ALTAT, *Shewanella oneidensis*
Q8EF49_SHEON, *Saccharophagus degradans* Q21E20_SACD2,
Saccharophagus degradans Q21ER7_SACD2, *Vibrio angustum* S14
5 Q1ZWES_9VIBR, *Vibrio vulnificus* Q8DAE2_VIBVU, *Vibrio*
alginolyticus 12G01 Q1VCP6_VIBAL, *Vibrio* sp DAT722
Q2FA22_9VIBR, *Vibrio parahaemolyticus* Q87NJ1_VIBPA, *Vibrio*
fischeri Q5E1F5_VIBF1, *Vibrio vulnificus* Q7MJS8_VIBVY,
Photobacterium sp SKA34 Q2C6Z5_9GAMM, *Hahella chejuensis*
10 Q2SFY7_HAHCH, *Oceanospirillum* sp MED92 Q2BKV0_9GAMM,
Oceanobacter sp RED65 Q1NO35_9GAMM, *Desulfovibrio*
desulfuricans Q310U7_DESDG, *Halothermothrix orenii* H 168
Q2AIW5_9FIRM, *Thermoanaerobacter tengcongensis*
Q8RBX6_THETN, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903
15 Q2ZH17_CALSA, *Clostridium acetobutylicum* Q97E73_CLOAB,
Alkaliphilus metalliredigenes QYMF Q3C763_9CLOT,
Clostridium tetani Q899J9_CLOTE e *Clostridium beijerincki*
NCIMB 8052 Q2WVNO_CLOBE. Em algumas modalidades das
composições farmacêuticas, a proteína H-NOX não possui uma
20 mutação no motivo Y-S-R, que inclui Tyr135, Ser137 e Arg139
de H-NOX humana.

A menos que observado explicitamente ou ditado pelo
contexto, todas as proteínas H-NOX do tipo selvagem e
mutantes aqui descritas podem ser usadas em qualquer uma
25 das composições farmacêuticas aqui descritas. A proteína H-
NOX pode ter ou não heme e/ou oxigênio ligado, e pode estar
ligada covalentemente ou não a outra molécula ou porção
como, por exemplo, polietileno glicol. Em algumas
modalidades, a proteína H-NOX é uma proteína de fusão que
30 inclui um domínio de H-NOX e parte de outra proteína ou

outra proteína inteira, por exemplo, albumina (por exemplo, albumina sérica humana).

Em um aspecto, a invenção fornece métodos de liberação de oxigênio a um indivíduo (por exemplo, um mamífero como, por exemplo, um primata (por exemplo, um ser humano, um macaco, um gorila, um chimpanzé, um lêmure etc.), um bovino, um eqüino, um suíno, um canino ou um felino) com o uso de uma proteína H-NOX. Em algumas modalidades, o indivíduo sofre ou está em risco de apresentar uma doença cardiovascular, uma doença neurológica, hipóxia tumoral, uma perda sangüínea ou um ferimento. Indicações cardiovasculares exemplares incluem infarto do miocárdio (por exemplo, infarto do miocárdio com elevação do segmento ST), cardioplegia, anemia falciforme, isquemia peroperatória, oclusão vascular periférica e angioplastia. Indicações neurológicas exemplares incluem acidente vascular cerebral isquêmico, lesão cerebral traumática e lesão da medula espinhal. Para o tratamento de hipóxia tumoral, as proteínas H-NOX podem ser usadas, por exemplo, como um adjuvante da radioterapia em tumores sólidos (por exemplo, indivíduos com prognóstico pré-metastático ruim) ou como um adjuvante da terapia com PDT em tumores de superfície (por exemplo, câncer de cólon, pulmão ou cutâneo ou câncer em outra superfície ou localização acessível). As aplicações das proteínas H-NOX como alternativa à transfusão sangüínea incluem trauma (por exemplo, no campo de batalha, alívio em desastres ou acidentes), cirurgia (por exemplo, cirurgia de aneurisma abdominal, cirurgia ortopédica como, por exemplo, cirurgia de substituição do quadril, ou qualquer outra cirurgia que produza grande

perda sangüínea), hemorragias, choque hemorrágico, hemodiluição e usos intensos de sangue (por exemplo, suplementação de autodoação). Exemplos de aplicações no cuidado de ferimentos incluem o cuidado de feridas pós-
5 radiação (por exemplo, efeito do oxigênio hiperbárico), reparo pós-cirúrgico, reparo de úlcera diabética e feridas por queimadura.

Conseqüentemente, em algumas modalidades, a invenção fornece um método de liberação de oxigênio a um indivíduo
10 (por exemplo, um ser humano) pela administração a um indivíduo que dela necessita de uma proteína H-NOX em uma quantidade suficiente para liberar uma quantidade eficaz de oxigênio ao indivíduo. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 1
15 nM a cerca de 1 mM a $20^\circ C$, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de $700\ s^{-1}$ a $20^\circ C$ (por exemplo, menos do que cerca de $600\ s^{-1}$, $500\ s^{-1}$, $100\ s^{-1}$, $20\ s^{-1}$ ou $1,8\ s^{-1}$ a $20^\circ C$). Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX está
20 dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

Em algumas modalidades dos métodos, o oxigênio está ligado à proteína H-NOX, antes da administração da proteína
25 H-NOX ao indivíduo. Em algumas modalidades dos métodos, o oxigênio não está ligado à proteína H-NOX, antes da administração da proteína H-NOX ao indivíduo, e a proteína H-NOX transporta oxigênio de uma localização no indivíduo para outra localização no indivíduo. Em algumas modalidades
30 dos métodos, a proteína H-NOX é administrada no sangue do

indivíduo. Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX é administrada no sangue, em um ferimento, em um tumor, em um tecido hipóxico ou em um órgão hipóxico do indivíduo. Em algumas modalidades dos métodos, o indivíduo
5 sofre ou está em risco de apresentar uma perda sangüínea. Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX é administrada ao indivíduo pelo menos duas vezes.

Em algumas modalidades dos métodos, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX está dentro de 2 ordens
10 de magnitude daquela da hemoglobina alfa de *Homo sapiens*, por exemplo, uma constante de dissociação de O_2 entre 0,1 a 10 vezes ou entre 0,5 a 2 vezes a da hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. Em algumas modalidades dos métodos, a reatividade ao NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes
15 menor do que aquela da hemoglobina alfa de *Homo sapiens* como, por exemplo, pelo menos 100 vezes ou 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina alfa de *Homo sapiens*. Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX é uma proteína do tipo selvagem. Em algumas modalidades dos
20 métodos, a proteína H-NOX é uma proteína mutante aqui descrita. Em várias modalidades dos métodos, a proteína H-NOX possui pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O_2 , a k_{off} para o oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme, a reatividade ao NO, ou qualquer duas ou
25 mais das citadas anteriormente, comparada com a de uma proteína do tipo selvagem correspondente. Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX é uma selecionada do grupo que consiste em H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de
30 *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-

NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de
 5 *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T.*
 10 *tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L.*
 15 *pneumophila*, 1 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX do tipo selvagem de *D. desulfuricans*, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *H.*
 20 *sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-385) de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145H de *H. sapiens*, β 1(1-194) de *H. sapiens*, β 1(1-194) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-194) L9W-I145Y de *H. sapiens*, β 2(1-217) de *H. sapiens*, β 2(1-217) I142Y de *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105G de
 25 *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105F de *H. sapiens*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, β 1(1-385) de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145H de *R. norvegicus*, β 1(1-194) *R. norvegicus*, β 1(1-194) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-194) L9W-I145Y de *R. norvegicus*, β 2(1-217)
 30 de *R. norvegicus*, β 2(1-217) I142Y de *R. norvegicus*, β 1 H-

NOX H105G de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, H-NOX(1-175) de *C. botulinum*, H-NOX(1-186) de *C. botulinum*, H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, GCY35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14886 do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG4154 do tipo selvagem de *D. melanogaster*; H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis*, H-NOX do tipo selvagem de *M. musculus*, H-NOX do tipo selvagem de *C. familiaris*, H-NOX do tipo selvagem de *B. taurus*, H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, H-NOX do tipo selvagem de *X. laevis*, H-NOX do tipo selvagem de *O. latipes*, H-NOX do tipo selvagem de *O. curivatus*, H-NOX do tipo selvagem de *F. rubripes*, H-NOX do tipo selvagem de *A. gambiae*, H-NOX do tipo selvagem de *M. sexta*; gcy-31 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-34 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-35 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-36 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-37 do tipo selvagem de *C. elegans*; H-NOX do tipo selvagem de *V. cholera*, H-NOX do tipo selvagem de *V. fischerii* e H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*. Em algumas modalidades dos métodos, um ou mais lipossomos ou nanopartículas incluem ou encapsulam a proteína H-NOX.

Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*. Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX não é H-NOX Y40L

de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis* ou 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*. Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX não é $\beta 2$ (1-217) de *R. norvegicus*, $\beta 1$ (1-194) de *R. norvegicus*, $\beta 1$ (1-385) de *R. norvegicus* ou $\beta 1$ (1-385) I145Y de *R. norvegicus*. Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX não é H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis* ou $\beta 1$ H-NOX (1-385) I145Y de *H. sapiens*. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, $\beta 1$ I140Y de *H. sapiens* ou $\beta 1$ I145Y de *H. sapiens*. Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX não é H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, $\beta 1$ H-NOX I140Y de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, *R. norvegicus* SGC $\beta 1$ H-NOX (1-385), SGC $\beta 1$ H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, SGC $\beta 1$ H-NOX H105G de *R. norvegicus*, SGC $\beta 1$ H-NOX H105F de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX I145Y de *R. norvegicus* SGC, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster* H-NOX, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis* ou H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*. Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX não é H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, $\beta 1$ H-NOX I140Y de *H. sapiens*, $\beta 1$ I145Y de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-

NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, sGC β 1 H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, sGC β 1 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC β 1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, *R. norvegicus*. sGC β 1 H-NOX H105F, β 1 H-NOX I145Y de *R. norvegicus* sGC, β 1 H-NOX

5 do tipo selvagem de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster* H-NOX, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de

10 *S. oneidensis* ou H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*. Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX não é qualquer uma das proteínas H-NOX seguintes que estão listadas pelo nome de seu gene, seguido pela abreviatura de sua espécie e Identificadores no

15 Genbank (por exemplo, as seguintes seqüências de proteínas disponíveis em 21 de maio de 2006; 22 de maio de 2006; 21 de maio de 2007; ou 22 de maio de 2007):

Npun5905_Npu_23129606, alr2278_Ana_17229770,
 SO2144_Sone_24373702, Mdeg1343_Mde_23027521,
 20 VCA0720_Vch_15601476, CC2992_Ccr_16127222,
 Rsph2043_Rhsp_22958463 (gi: 46192757),
 Mmc10739_Mcsp_22999020, Tar4_Tte_20807169,
 Ddes2822_Dde_23475919, CAC3243_Cac_15896488, gcy-
 31_Ce_17568389, CO14885_Dm_24647455, GUCY1B3_Hs_4504215,
 25 HpGCS-beta1_Hpul_14245738, Gycbeta100B_Dm_24651577,
 CG4154_Dm_24646993 (gi: NP_650424.2, gi: 62484298), gcy-
 32_Ce_13539160, gcy-36_Ce_17568391 (gi: 32566352, gi:
 86564713), gcy-35_Ce-17507861 (gi: 71990146), gcy-37_Ce_1
 7540904 (gi: 71985505), GCY1 α 3_Hs_20535603, GCY1 α 2-Hs
 30 899477 ou GYC α -99B_Dm_729270 (gi: 68067738) (Lakshminarayan

e cols. (2003), "Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins", *BMG Genomics* 4: 5-13). As abreviações de espécies usadas nesses nomes incluem: Ana = *Anabaena Sp*;

5 Ccr = *Caulobacter crescentus*; Cac = *Clostridium acetobutylicum*; Dde = *Desulfovibrio desulfuricans*; Mcsp = *Magnetococcus sp.*; Mde = *Microbulbifer degradans*; Npu = *Nostoc punctiforme*; Rhsp = *Rhodobacter sphaeroides*; Sone = *Shewanella oneidensis*; Tte = *Thermoanaerobacter*

10 *tengcongensis*; Vch = *Vibrio cholerae*; Ce = *Caenorhabditis elegans*; Dm = *Drosophila melanogaster*; Hpul = *Hemicentrotus pulcherrimus*; Hs = *Homo sapiens*. Em algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX não é qualquer uma das proteínas H-NOX seguintes que estão listadas por seu nome do

15 organismo e número de acesso na base de dados Pfam (por exemplo, as seguintes seqüências de proteínas disponíveis em 21 de maio de 2006; 22 de maio de 2006; 17 de maio de 2007; 21 de maio de 2007; ou 22 de maio de 2007):

Caenorhabditis briggsae Q622M5_CAEBR, *Caenorhabditis*

20 *briggsae* Q61P44_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61R54_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61 V90_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61 A94_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q60TP4_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q60M10_CAEBR, *Caenorhabditis elegans* GCY37_CAEEL,

25 *Caenorhabditis elegans* GCY31_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY36_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY32_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY35_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY34_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY33_CAEEL, *Oryzias curvinotus* Q7T040_ORYCU, *Oryzias curvinotus* Q75 WF0_ORYCU,

30 *Oryzias latipes* P79998_ORYLA, *Oryzias latipes* Q7ZSZ5_ORYLA,

Tetraodon nigroviridis Q4SW38_TETNG, *Tetraodon nigroviridis*
 Q4RZ94_TETNG, *Tetraodon nigroviridis* Q4S6K5_TETNG, *Fugu*
rubripes Q9OVY5_FUGRU, *Xenopus laevis* Q6INK9_XENLA, *Homo*
sapiens Q5T8J7_HUMAN, *Homo sapiens* GCYA2_HUMAN, *Homo*
 5 *sapiens* GCYB2_HUMAN, *Homo sapiens* GCYB1_HUMAN, *Gorilla*
gorilla Q9N193_9PRIM, *Pongo pygmaeus* Q5RAN8_PONPY, *Pan*
trogglodytes Q9N 192_PANTR, *Macaca mulatta* Q9N194_MACMU,
Hylobates lar Q9N191_HYLLA, *Mus musculus* Q8BXH3_MOUSE, *Mus*
musculus GCYB1_MOUSE, *Mus musculus* Q3UTI4_MOUSE, *Mus*
 10 *musculus* Q3UH83_MOUSE, *Mus musculus* Q6XE41_MOUSE, *Mus*
musculus Q80YP4_MOUSE, *Rattus norvegicus* Q8OWX7_RAT, *Rattus*
norvegicus Q80WX8_RAT, *Rattus norvegicus* Q920Q1_RAT, *Rattus*
norvegicus Q54A43_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY0_RAT, *Rattus*
norvegicus Q80WY4_RAT, *Rattus norvegicus* Q8CH85_RAT, *Rattus*
 15 *norvegicus* Q80WY5_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB 1_RAT, *Rattus*
norvegicus Q8CH90_RAT, *Rattus norvegicus* Q91XJ7_RAT, *Rattus*
norvegicus Q80WX9_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB2_RAT, *Rattus*
norvegicus GCYA2_RAT, *Canis familiaris* Q4ZHR9_CANFA, *Bos*
taurus GCYB1_BOVIN, *Sus scrofa* Q4ZHR7_PIG, *Gryllus*
 20 *bimaculatus* Q59HN5_GRYBI, *Manduca sexta* O77106_MANSE,
Manduca sexta O76340_MANSE, *Apis mellifera* Q5UAFO_APIME,
Apis mellifera Q5FANO_APIME, *Apis mellifera* Q6L5L6_APIME,
Anopheles gambiae cepa PEST Q7PYK9_ANOGA, *Anopheles gambiae*
cepa PEST Q7Q9W6_ANOGA, *Anopheles gambiae* cepa PEST
 25 Q7QF31_ANOGA, *Anopheles gambiae* cepa PEST Q7PSO1_ANOGA,
Anopheles gambiae cepa PEST Q7PFY2_ANOGA, *Anopheles gambiae*
Q7KQ93_ANOGA, *Drosophila melanogaster* Q24086_DROME,
Drosophila melanogaster GCYH_DROME, *Drosophila melanogaster*
GCY8E_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYDA_DROME,
 30 *Drosophila melanogaster* GCYDB_DROME, *Drosophila*

melanogaster Q9VA09_DROME, *Drosophila pseudoobscura*
 Q29CE1_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C7_DROPS,
Drosophila pseudoobscura Q296C8_DROPS, *Drosophila*
pseudoobscura Q29BU7_DROPS, *Aplysia californica*
 5 Q7YWK7_APLCA, *Hemicentrotus pulcherrimus* Q95NK5_HEMPU,
Chlamydomonas reinhardtii Q5YLC2_CHLRE, *Anabaena* sp
 Q8YUQ7_ANASP, *Flavobacterium bacterium* BBFL7 Q26GR8_9BACT,
Psychroflexus torquis ATCC 700755 Q1VQE5_9FLAO,
proteobactéria marinha gama HTCC2207 Q1YPJ5_9GAMM,
 10 *proteobactéria* marinha gama HTCC2207 Q1YTK4_9GAMM,
Caulobacter crescentus Q9A451_CAUCR, *Acidiphilium cryptum*
 JF-5 Q2DG60_ACICY, *Rhodobacter sphaeroides* Q3J0U9 RHOS4,
Silicibacter pomeroyi Q5LPV 1_SILPO, *Paracoccus*
denitrificans PD1222, Q3PC67_PARDE, *Silicibacter* sp TMJ040
 15 Q3QNY2_9RHOB, *Jannaschia* sp Q28ML8_JANSC, *Magnetococcus* sp
 MC-1 Q3XT27_9PROT, *Legionella pneumophila* Q5WXP0_LEGPL,
Legionella pneumophila Q5WTZ5_LEGPL, *Legionella pneumophila*
 Q5X268_LEGPA, *Legionella pneumophila* Q5X2R2_LEGPA,
Legionella pneumophila subsp. *pneumophila* Q5ZWM9_LEGPH,
 20 *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* Q5ZSQ8_LEGPH,
Colwellia psychrerythraea Q47Y43_COLP3, *Pseudoalteromonas*
atlantica T6c Q3CSZ5_ALTAT, *Shewanella oneidensis*
 Q8EF49_SHEON, *Saccharophagus degradans* Q21E20_SACD2,
Saccharophagus degradans Q21ER7_SACD2, *Vibrio angustum* S14
 25 Q1ZWE5_9VIBR, *Vibrio vulnificus* Q8DAE2_VIBVU, *Vibrio*
alginolyticus 12G01 QiIVCP6_VIBAL, *Vibrio* sp DAT722
 Q2FA22_9VIBR, *Vibrio parahaemolyticus* Q87NJ1_VIBPA, *Vibrio*
fischeri Q5EIF5_VIBFI, *Vibrio vulnificus* Q7MJS8_VIBVY,
Photobacterium sp SKA34 Q2C6Z5_9GAMM, *Hahella chejuensis*
 30 Q2SFY7_HAHCH, *Oceanospirillum* sp MED92 Q2BKV0_9GAMM,

Oceanobacter sp RED65 Q1NO35_9GAMM, *Desulfovibrio*
desulfuricans Q310U7_DESDG, *Halothermothrix orenii* H 168
 Q2AIW5_9FIRM, *Thermoanaerobacter tengcongensis*
 Q8RBX6_THETN, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903
 5 Q2ZH17_CALSA, *Clostridium acetobutylicum* Q97E73_CLOAB,
Alkaliphilus metalliredigenes QYMF Q3C763_9CLOT,
Clostridium tetani Q899J9_CLOTE e *Clostridium beijerincki*
NCIMB 8052 Q2WVNO_CLOBE. Em algumas modalidades dos
 métodos, a proteína H-NOX não é sGC β 1 H-NOX C78S de *R.*
 10 *norvegicus* ou sGC β 1 H-NOX C78E de *R. norvegicus*. Em
 algumas modalidades dos métodos, a proteína H-NOX não
 possui uma mutação no motivo Y-S-R, que inclui Tyr135,
 Ser137 e Arg139 de H-NOX humana.

A menos que observado explicitamente ou ditado pelo
 15 contexto, todas as proteínas do tipo selvagem e mutantes e
 todas as composições farmacêuticas aqui descritas podem ser
 usadas em qualquer um dos métodos de liberação de oxigênio
 aqui descritos. A proteína H-NOX pode ter ou não heme e/ou
 oxigênio ligado, e pode estar ligada covalentemente ou não
 20 a outra molécula ou porção como, por exemplo, polietileno
 glicol. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX é uma
 proteína de fusão que inclui um domínio de H-NOX e parte de
 outra proteína ou outra proteína inteira, por exemplo,
 albumina (por exemplo, albumina sérica humana).

25 Em um aspecto, a invenção apresenta kits que incluem
 uma ou mais proteínas H-NOX. Em algumas modalidades, a
 invenção fornece um kit que inclui uma proteína H-NOX e
 instruções para utilização do kit para liberar oxigênio a
 um indivíduo. Em algumas modalidades, a constante de
 30 dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 1 nM a

cerca de 1 mM a 20°C, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C (por exemplo, menos do que cerca de 600 s⁻¹, 500 s⁻¹, 100 s⁻¹, 20 s⁻¹ ou 1,8 s⁻¹ a 20°C). Em algumas modalidades, a constante de
5 dissociação de O₂ da proteína H-NOX está dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 1 nM a
10 cerca de 1 mM a 20°C, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C (por exemplo, menos do que cerca de 600 s⁻¹, 500 s⁻¹, 100 s⁻¹, 20 s⁻¹ ou 1,8 s⁻¹ a 20°C). Em algumas modalidades, a proteína H-NOX não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*. A menos que
15 observado explicitamente ou ditado pelo contexto, todas as proteínas do tipo selvagem e mutantes e todas as composições farmacêuticas aqui descritas podem ser usadas em qualquer um dos kits aqui descritos. A proteína H-NOX pode ter ou não heme e/ou oxigênio ligado, e pode estar
20 ligada covalentemente ou não a outra molécula ou porção como, por exemplo, polietileno glicol. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX é uma proteína de fusão que inclui um domínio de H-NOX e parte de outra proteína ou outra proteína inteira, por exemplo, albumina (por exemplo,
25 albumina sérica humana).

Em um aspecto, a invenção apresenta uma proteína H-NOX (por exemplo, qualquer uma das proteínas do tipo selvagem ou mutantes aqui descritas) para uso como um medicamento. Em algumas modalidades, a invenção apresenta uma proteína
30 H-NOX para uso em um método de liberação de oxigênio a um

indivíduo. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX é usada para tratar qualquer condição para a qual a liberação de O₂ seja benéfica, por exemplo, uma doença cardiovascular, uma doença neurológica, hipóxia tumoral, uma perda sangüínea ou um ferimento.

Em algumas modalidades, a invenção apresenta o uso de uma proteína H-NOX (por exemplo, qualquer uma das proteínas do tipo selvagem ou mutantes aqui descritas) para a fabricação de um medicamento, por exemplo, um medicamento para a liberação de oxigênio a um indivíduo. Em algumas modalidades, a invenção apresenta o uso de uma proteína H-NOX para a liberação de oxigênio a um indivíduo. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX é usada para tratar qualquer condição para a qual a liberação de O₂ seja benéfica, por exemplo, uma doença cardiovascular, uma doença neurológica, hipóxia tumoral, uma perda sangüínea ou um ferimento.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1A é uma ilustração da estrutura tridimensional de resíduos da bolsa distal de proteínas H-NOX de ligação de NO e ligação de O₂ (acima de heme). Resíduos de coordenação de heme de proteínas H-NOX de ligação de NO e ligação de O₂ também são mostrados (abaixo de heme). A FIG. 1A é baseada na estrutura tridimensional de H-NOX de *T. tengcongensis* relatada por Pellicena, P. e cols. (31 de agosto de 2004), "Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(35): 12.854-12.859.

A FIG. 1B é uma visão lateral estérea da estrutura tridimensional de H-NOX de *T. tengcongensis* que ilustra características estruturais do domínio de H-NOX. A dobra da

proteína é representada por diagramas de fita. O heme, o ligante de di-oxigênio e a histidina proximal são mostrados como modelos *ball-and-stick*. As α -hélices são rotuladas A-G de acordo com a nomenclatura mostrada na FIG. 5B. As fitas β são rotuladas 1-4. A FIG. 1B é de Pellicena, P. e cols. (31 de agosto de 2004), "Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (35): 12.854-12.859.

As FIGS. 1C-1H são ilustrações da estrutura tridimensional de H-NOX de *T. tengcongensis* que ilustram resíduos exemplares da bolsa distal em H-NOX de *T. tengcongensis*. Os resíduos seguintes revelados nas FIGS. 1C-1H são os resíduos principais que compreendem a bolsa distal de H-NOX: Thr4, Ile5, Thr8, Trp9, Trp67, Asn74, Ile75, Phe78, Phe82, Tyr140 e Leu 144, que estão contidos dentro de hélices A, D, E e G. As FIGS. 1C-1H foram criadas com o uso de PYMOL (DeLano Scientific, LLP).

A FIG. 2 é um alinhamento de seqüências das proteínas H-NOX seguintes que se ligam ou que se prevê que se liguem ao O_2 e NO: Majority (ID. DE SEQ. N°: 1); Ce. gcy-31 (ID. DE SEQ. N°: 2); Ce. gcy-33 (ID. DE SEQ. N°: 3); Ce. gcy-35 (ID. DE SEQ. N°: 4); Dm. CG14885 H-NOX (ID. DE SEQ. N°: 5); Dm. CG4154 H-NOX (ID. DE SEQ. N°: 6); Ms. Beta3 H-NOX (ID. DE SEQ. N°: 7); Tt H-NOX (ID. DE SEQ. N°: 8); e Ca H-NOX (ID. DE SEQ. N°: 9). Prevê-se que essas proteínas H-NOX se liguem ao O_2 , bem como ao NO, porque possuem a tirosina na posição que corresponde ao Y140 de H-NOX de *T. tengcongensis*. A numeração de aminoácidos usada na FIG. 2 começa com o primeiro aminoácido no domínio de H-NOX ou na proteína de comprimento total como resíduo número 1. O

alinhamento foi gerado com o uso dos parâmetros padronizados no programa MegAlign. As abreviações usadas na FIG. 2 são descritas abaixo com relação às FIGS. 4A-4D.

As FIGS. 3A-3D são um alinhamento de seqüências das
 5 proteínas H-NOX seguintes que se ligam ou que se prevê que se liguem ao NO, mas não ao O₂: Majority (ID. DE SEQ. N°: 10); Dm. sGC betal proteína (ID. DE SEQ. N°: 11); sGC betal proteína (ID. DE SEQ. N°: 12); hs. sGC betal proteína (ID. DE SEQ. N°: 13); hs. beta2 proteína (ID. DE SEQ. N°: 14);
 10 Ms. sGC betal proteína (ID. DE SEQ. N°: 15); Mm. sGC betal proteína (ID. DE SEQ. N°: 16); Np. betal HD-like (ID. DE SEQ. N°: 17); Tr. sGC betal proteína (ID. DE SEQ. N°: 18); Anopheles_gambiae|XP_310919 (ID. DE SEQ. N°: 19); Apis_mellifera|NP_001011632 (ID. DE SEQ. N°: 20); Bt. sGC
 15 betal proteína (ID. DE SEQ. N°: 21); Chlamydomonas reinhardtii|AAR02 (ID. DE SEQ. N°: 22); Oryzias_curvinotus|BAC98396 (ID. DE SEQ. N°: 23); Oryzias_latipes|BAA7669I (ID. DE SEQ. N°: 24); Strongylocentrotus_purpuratus|X (ID. DE SEQ. N°: 25); e Sus
 20 scrofa betal|NP_001018042+ (ID. DE SEQ. N°: 26). O alinhamento foi gerado com o uso dos parâmetros padronizados no programa MegAlign. As abreviações usadas nas FIGS. 3A-3D são descritas abaixo com relação à FIG. 4.

As FIGS. 4A-4D são um alinhamento de seqüências de
 25 proteínas H-NOX das FIGS. 2 e 3A-3D: Majority (ID. DE SEQ. N°: 27); Dm. sGC betal proteína (ID. DE SEQ. N°: 11); sGC betal proteína (ID. DE SEQ. N°: 12); hs. sGC betal proteína (ID. DE SEQ. N°: 13); hs. beta2 proteína (ID. DE SEQ. N°: 14); Mm. sGC betal proteína (ID. DE SEQ. N°: 16); Np. betal
 30 HD-like (ID. DE SEQ. N°: 17); Tr. sGC betal proteína (ID.

DE SEQ. N°: 18); *Chlamydomonas reinhardtii*|AAR02 (ID. DE SEQ. N°: 22); *Oryzias curvinotus*|BAC98396 (ID. DE SEQ. N°: 23); *Strongylocentrotus purpuratus*|X (ID. DE SEQ. N°: 25); *Sus scrofa* beta1|NP_001018042 (ID. DE SEQ. N°: 26); gcy-31a (ID. DE SEQ. N°: 2); gcy-33 (ID. DE SEQ. N°: 3); Ca. H-NOX (ID. DE SEQ. N°: 9); T. beta1 HD-like (ID. DE SEQ. N°: 8); Ms. sGc beta 3 proteína (ID. DE SEQ. N°: 7); CG14885 (ID. DE SEQ. N°: 5); e Dm. sGC variante curta (ID. DE SEQ. N°: 6). O alinhamento foi gerado com o uso dos parâmetros padronizados no programa MegAlign. Para as FIGS. 2-4D, "Dm. sGC beta1 proteína" representa $\beta 1$ H-NOX de *Drosophila melanogaster*; "sGC beta1 proteína" representa $\beta 1$ H-NOX de *Rattus norvegicus*; "hs. sGC beta1 proteína" representa Homo $\beta 1$ H-NOX de *H. sapiens*; "hs. beta2 proteína" representa Homo $\beta 2$ H-NOX de *H. sapiens*; "Mm. sGC beta1 proteína" representa $\beta 1$ H-NOX de *Mus musculus*; "Np. beta1 HD-like" representa H-NOX de *Nostoc punctiforme*; "Tr. sGC beta1 proteína" representa $\beta 1$ H-NOX de *Takifugu rubripes*; "Anopheles gambiae|XP_310919" representa $\beta 1$ H-NOX de *Anopheles gambiae*; "Apis mellifera|NP_001011632" representa $\beta 1$ H-NOX de *Apis mellifera*; "Bt. sGC beta1 proteína" representa $\beta 1$ H-NOX de *Bos taurus*; "*Chlamydomonas reinhardtii*|AAR02" representa $\beta 1$ H-NOX de *Chlamydomonas reinhardtii*; "*Oryzias curvinotus*|BAC98396" representa $\beta 1$ H-NOX de *Oryzias curvinotus*; "*Oryzias latipes*|BAA76691" representa $\beta 1$ H-NOX de *Oryzias latipes*; "*Strongylocentrotus purpuratus*|X" representa $\beta 1$ H-NOX de *Strongylocentrotus purpuratus*; "*Sus scrofa* beta1 SNP 001018042+" representa $\beta 1$ H-NOX de *Sus scrofa*; "gcy-31a" representa Gcy-31a H-NOX de *Caenorhabditis elegans*; "gcy-

33" representa Gcy-33 H-NOX de *Caenorhabditis elegans*;
 "gcy-35" representa Gcy-35 H-NOX de *Caenorhabditis elegans*;
 "Ca. H-NOX" representa H-NOX de *Clostridium*
acetobutylicum; "T. betal HD-like" representa H-NOX de
 5 *Thermoanaerobacter tengcongensis*; "Ms. sGc beta 3 proteína"
 representa β 3 H-NOX de *Manduca sexta*; "CG14885" representa
 CG14885 H-NOX de *Drosophila melanogaster*; "Dm. sGC variante
 curta" representa Gcy-88-E-S H-NOX de *Drosophila*
melanogaster e "Dm. CG4154 H-NOX" representa CG4154 H-NOX
 10 de *Drosophila melanogaster*.

A FIG. 5A é um alinhamento de seqüências de membros da
 família de H-NOX. A numeração de seqüências é aquela de H-
 NOX de *T. tengcongensis*. Resíduos não variantes são
 indicados por um "V", resíduos muito altamente conservados
 15 são indicados por "s". Y140 de H-NOX de *T. tengcongensis* é
 indicado por um "H". Os resíduos de tirosina previstos da
 bolsa distal que podem estabilizar um complexo de FeII-O₂
 em outras proteínas H-NOX são: posição 70 para
Caenorhabditis elegans GCY-35; posição 140 em *Drosophila*
 20 *melanogaster* CG14885-PA; posição 138 de *Caenorhabditis*
elegans GCY-35; posição 140 de *Clostridium acetobutylicum*;
 numerado de acordo com *Thermoanaerobacter tengcongensis*. Os
 números de acesso são: Homo *H. sapiens* β 1 [gi: 2746083]
 (ID. DE SEQ. N°: 28), *Rattus norvegicus* β 1 [gi: 27127318]
 25 (ID. DE SEQ. N°: 29), *Drosophila melanogaster* β 1 [gi:
 861203] (ID. DE SEQ. N°: 30), *Drosophila melanogaster* CG
 14885-PA [gi: 23171476] (ID. DE SEQ. N°: 31),
Caenorhabditis elegans GCY-35 [gi: 52782806] (ID. DE SEQ.
 N°: 32), *Nostoc punctiforme* [gi: 23129606] (ID. DE SEQ. N°:
 30 33), *Caulobacter crescentus* [gi: 16127222] (ID. DE SEQ. N°:

34), *Shewanella oneidensis* [gi: 24373702] (ID. DE SEQ. N°: 35), *Legionella pneumophila* (ORF 2) [CUCGC_272624] (ID. DE SEQ. N°: 36), *Clostridium acetobutylicum* [gi: 15896488] (ID. DE SEQ. N°: 37) e *Thermoanaerobacter tengcongensis* [gi: 20807169] (ID. DE SEQ. N°: 38). Os alinhamentos foram gerados com o uso do programa MegAlign, Lasergene, DNA Star, (veja a página na Internet "dnastar.com/products/megalign.php"). Foram usados os parâmetros padronizados de Clustal-W.

10 A FIG. 5B é um alinhamento de seqüências de domínios de H-NOX exemplares. As anotações da estrutura secundária e a numeração no topo do alinhamento correspondem ao domínio de H-NOX de *T. tengcongensis*. As α -hélices são representadas por espirais, e fitas β por setas. A bolsa
15 distal é definida por α -hélices αA , αD , αE e αG . os números de acesso de Pubmed/NCBI são os seguintes:
Ther_tengcongensis gi | 208071691 (ID. DE SEQ. N°: 39),
Clos_acetobutylicum gi | 158964881 (ID. DE SEQ. N°: 40),
Clos_tetani GI: 75543266 (ID. DE SEQ. N°: 41),
20 Desu_desulfuricans gi | 23475919 | (ID. DE SEQ. N°: 42),
Vibr_vulnificus gi | 273617341 (ID. DE SEQ. N°: 43),
Caul_crescentus gi | 16127222 | (ID. DE SEQ. N°: 44),
Micr_degradans gi | 23027521 | (ID. DE SEQ. N°: 45),
Vibr_cholerae gi | 15601476 | (ID. DE SEQ. N°: 46),
25 Shew_oneidensis gi | 24373702 | (ID. DE SEQ. N°: 47),
Rat_beta1_sGC gi | 27127318 | (ID. DE SEQ. N°: 48),
Rat_beta2_sGC gi | 21956635 | (ID. DE SEQ. N°: 49),
Nost_junctiforme gi | 23129606 | (ID. DE SEQ. N°: 50) e
Nost_sp. gi | 17229770 | (ID. DE SEQ. N°: 51). A seqüência
30 de consenso é mostrada na parte de baixo da FIG. 5B (ID. DE

SEQ. N°: 52). Os alinhamentos foram gerados com o uso do programa MULTALIN (Corpet, F. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 10.881-10.890), e a FIG. 5B foi preparada com o uso do programa ESPRIPT (Gouet, P. e cols. (1999) *Bioinformatics* 5 15: 305-308).

As FIGS. 6A e 6B são ilustrações da estrutura tridimensional do ambiente heme do domínio de H-NOX de *T. tengcongensis*. As FIGS. 6A e 6B são de Pellicena, P. e cols. (31 de agosto de 2004), "Crystal Structure of An 10 Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 101(35): 12.854-12.859.

As FIGS. 7A-7F são gráficos da espectroscopia de UV visível de proteínas H-NOX após redução anaeróbica 15 (complexos não ligados de Fe^{II} ; linha de cima em cada gráfico), antes e depois de serem expostas ao ar (complexos de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$; a linha de baixo em cada gráfico) para *Tt* H-NOX (FIG. 7A), *Tt* Y140L (FIG. 7B), *Tt* W9F-Y140L (FIG. 7C), *Tt* F78Y-Y140L (FIG. 7D), *L2* H-NOX e *L2* F142Y (FIG. 7E) e $\beta 1(1-$ 20 385) e $\beta 1(1-385)$ I145Y (FIG. 7F). Além dos complexos de Fe^{II} e $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ de *L2* F142Y e $\beta 1(1-385)$ I145Y, o espectro de *L2* H-NOX e $\beta 1(1-385)$ H-NOX do tipo selvagem após redução e exposição ao ar são mostrados na linha do meio na FIG. 7E e 7F, respectivamente, para demonstrar que essas proteínas 25 não se ligam ao O_2 antes da adição de uma tirosina da bolsa distal. Os dois ou três números escritos no canto superior esquerdo de cada painel representam o comprimento de onda para o pico das linhas no gráfico. Os números são escritos verticalmente na ordem a qual as linhas correspondentes 30 aparecem verticalmente no gráfico. Por exemplo, o valor de

430 nm na FIG. 7A representa o pico do comprimento de onda para a linha de cima no gráfico (que representa um complexo de Fe^{II} não ligado), e o valor de 416 nm na FIG. 7A representa o pico do comprimento de onda para a linha de
5 baixo no gráfico (que representa um complexo de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$). Uma mudança no comprimento de onda na presença de ar indica que a proteína se liga ao O_2 . A formação de um pico duplo entre 500 e 600 nm na presença de ar também é indicativa de ligação de O_2 . As FIGS. 7A-7F são de Boon, E.M. e cols.
10 (2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chem. Biol.* 1: 53-59.

As FIGS. 8A-8DD contêm seqüências de polinucleotídeos de ácidos nucléicos exemplares que codificam proteínas H-NOX e as seqüências de aminoácidos das proteínas H-NOX
15 correspondentes (IDS. DE SEQ. N^{os}: 53-162).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se baseia, em parte, na descoberta surpreendente de que proteínas H-NOX possuem uma reatividade ao NO bem menor do que hemoglobina. Essa baixa
20 reatividade intrínseca ao NO (e alta estabilidade ao NO) torna as proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes substitutos do sangue desejáveis, por causa da baixa probabilidade de inativação de proteínas H-NOX por NO endógeno, e a menor probabilidade de remoção de NO endógeno
25 por proteínas H-NOX. Significativamente, a presença de uma tirosina da bolsa distal em algumas proteínas H-NOX (Pellicena, P. e cols. (31 de agosto de 2004), "Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
30 101(35): 12.854-12.859) é sugestiva de reatividade ao NO

alta, indesejável, contra-indicando o uso como um substituto do sangue. Por exemplo, por analogia, uma proteína de hemoglobina de *Mycobacterium tuberculosis*, com uma tirosina da bolsa distal estruturalmente análoga, reagem de forma extremamente rápida com NO, e é usada pelo *Mycobacterium* para remover e evitar eficazmente o NO defensivo produzido por um hospedeiro infectado (Ouellet, H. e cols. (30 de abril de 2002), "Truncated Hemoglobin HbN Protects *Mycobacterium Bovis* From Nitric Oxide", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9): 5.902-5.907). No entanto, descobrimos surpreendentemente que proteínas H-NOX na verdade possuem uma reatividade ao NO bem menor do que aquela da hemoglobina, o que torna possível seu uso como substitutos do sangue.

Adicionalmente, foi descoberto de forma surpreendente que proteínas H-NOX que se ligam ao NO, mas não ao O₂, podem ser convertidas em proteínas H-NOX que se ligam tanto ao NO quanto ao O₂ pela introdução de uma única mutação de aminoácido. Dessa forma, a afinidade de proteínas H-NOX por O₂ e NO e a habilidade de proteínas H-NOX para discriminar entre ligantes de O₂ e de NO podem ser alteradas pela introdução de uma ou mais mutações de aminoácidos, o que permite que as proteínas H-NOX sejam adaptadas para se ligar ao O₂ ou ao NO com afinidades desejadas. Podem ser introduzidas mutações adicionais para alterar ainda mais a afinidade por O₂ e/ou por NO. A família da proteína H-NOX pode, portanto ser manipulada para exibir propriedades cinéticas e termodinâmicas aumentadas ou ideais para a liberação de O₂. Por exemplo, podem ser geradas proteínas H-NOX mutantes com constantes de dissociação alteradas e/ou

taxas inferiores para ligação de O_2 que aumentam a utilidade das proteínas H-NOX para diversas aplicações clínicas e industriais. A habilidade para ajustar as proteínas H-NOX para se ligar e liberar O_2 é uma avenida
5 terapêutica que aborda e supera as desvantagens centrais dos transportadores de O_2 atuais. Conseqüentemente, a presente invenção fornece proteínas, composições, kits e métodos para a liberação de oxigênio.

Há vários benefícios da utilização de proteínas H-NOX
10 para a liberação de O_2 . O papel principal da transfusão sangüínea após trauma e cirurgia é a liberação de O_2 . Um substituto do sangue ideal evita os desafios do sangue convencional: contaminação viral, exigência de tipagem, validade limitada e disponibilidade limitada. As principais
15 limitações dos substitutos do sangue baseados em hemoglobina são sua afinidade elevada por O_2 e sua propensão para reagir com NO. Como mencionado acima, a destruição de níveis mesmo baixos de NO pode ter efeitos sérios sobre o estado de repouso tônico da vasculatura e
20 dos órgãos, e leva à hipertensão e ao sofrimento gastrointestinal. Adicionalmente, no processo de reação com NO, a hemoglobina perde sua habilidade para liberar O_2 em um intervalo de tempo clinicamente relevante. Foram feitas várias tentativas para minimizar a toxicidade dos
25 transportadores de oxigênio baseados em hemoglobina (HBOCs) de primeira geração, incluindo entrecruzamento intra- e intermolecular ("Blood Substitutes", R. Winslow ed. Academic Press, 2006). Embora essas modificações superem algumas das questões de toxicidade graves relacionadas ao
30 extravasamento de hemoglobina, permaneceu a destruição da

ligação de oxigênio em função da alta reatividade ao NO. Esses HBOCs de segunda geração exibem afinidade reduzida por oxigênio, com valores de p50 próximos ao valor de p50 de eritrócitos, embora não tenham obtido sucesso em
 5 experimentos clínicos. Foi proposta uma hipótese alternativa por Winslow e colaboradores: um HBOC de p50 baixa com uma viscosidade e pressão osmótica coloidal apropriadas é mais adequado para liberação de oxigênio sem células do que um HBOC com p50 elevada (Tsai, A. G. e cols.
 10 (2003), "Targeted O₂ Delivery by low-P50 hemoglobin: A New Basis for O₂ Therapeutics", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285: H1411-H1419; Winslow (2007), "Red Cell Substitutes", "Seminars in Hematology" 44: 51-59). Se a reatividade ao NO de um HBOC desse tipo se tornará um
 15 problema em experimentos clínicos ainda é uma questão a ser investigada. O planejamento de proteínas H-NOX para que se liguem e liberem O₂ com reatividade ao NO mínima fornece um novo transportador de O₂ gasoso sanguíneo para uso em substitutos do sangue, em que as proteínas H-NOX liberam
 20 O₂, sem remover NO ou serem inativadas como transportadores de O₂ pelo NO. Essas proteínas H-NOX, composições, kits e métodos serão descritos com mais detalhe nessa especificação.

Proteínas H-NOX

25 Visão geral da família de proteínas H-NOX

A menos que indicado de forma diferente, qualquer proteína H-NOX do tipo selvagem ou mutante pode ser usada nas composições, kits e métodos aqui descritos. Como aqui usado, o termo uma "proteína H-NOX" significa uma proteína
 30 que possui um domínio de H-NOX (denominada por

representação a domínio de ligação de Heme-Óxido nítrico e Oxigênio). Uma proteína H-NOX pode ou não conter um ou mais domínios diferentes, além do domínio de H-NOX. As proteínas H-NOX são membros de uma família altamente conservada, bem

5 caracterizada, de hemoproteínas (Iyer, L.M. e cols. (3 de fevereiro de 2003), "Ancient Conserved Domains Shared by Animal Soluble Guanylyl Cyclases And Bacterial Signaling Proteins", *BMC Genomics* 4(1): 5; Karow, D.S. e cols. (10 de agosto de 2004), "Spectroscopic Characterization of the

10 Soluble Guanylate Cyclase-Like Heme Domains From *Vibrio Cholerae* And *Thermoanaerobacter Tengcongensis*", *Biochemistry* 43(31): 10.203-10.211; Boon, E.M. e cols. (2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chem. Biol.* 1: 53-59; Boon, E.M.

15 e cols. (outubro de 2005), "Ligand Discrimination in Soluble Guanylate Cyclase and the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins", *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9(5): 441-446; Boon, E.M. e cols. (2005), "Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors", *J. Inorg.*

20 *Biochem.* 99(4): 892-902). As proteínas H-NOX também são denominadas proteínas Pfam 07700 ou proteínas HNOB (Pfam - uma base de dados de alinhamentos de família de domínios de proteínas e Modelos Ocultos de Markov, Marca Registrada (C) 1996-2006 "The Pfam Consortium; GNU LGPL Free Software

25 Foundation, Inc.", 59 Temple Place - Suite 330, Boston, MA 02111-1307, EUA). Em algumas modalidades, uma proteína H-NOX possui, ou prevê-se que possua, uma estrutura secundária que inclui seis hélices alfa, seguidas por duas fitas beta, seguidas por uma hélice alfa, seguida por duas

30 fitas beta. Uma proteína H-NOX pode ser uma apoproteína que

é capaz de ligação com heme ou uma holoproteína com heme ligado. Uma proteína H-NOX pode se ligar de forma covalente ou não covalente a um grupo heme. Algumas proteínas H-NOX se ligam ao NO, mas não ao O₂, e outras se ligam tanto ao NO quanto ao O₂. Os domínios de H-NOX de aeróbios facultativos que foram isolados se ligam ao NO, mas não ao O₂. As proteínas H-NOX de procariotas aeróbicos obrigatórios, *C. elegans* e *D. melanogaster*, se ligam ao NO e ao O₂. Mamíferos possuem duas proteínas H-NOX: $\beta 1$ e $\beta 2$.

Um alinhamento de seqüências de H-NOX de camundongo, rato, vaca e humanas mostra que essas espécies compartilham >99% de identidade. Em algumas modalidades, o domínio de H-NOX de uma proteína H-NOX ou toda a proteína H-NOX é pelo menos cerca de 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 ou 99,5% idêntico àquele da região correspondente de uma proteína H-NOX de *Thermoanaerobacter tengcongensis* de ocorrência natural ou uma proteína SGC de ocorrência natural (por exemplo, uma proteína SGC $\beta 1$ de ocorrência natural). Como aqui discutido anteriormente, uma proteína H-NOX pode opcionalmente conter uma ou mais mutações em relação à proteína H-NOX de ocorrência natural correspondente. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX inclui um ou mais domínios, além do domínio de H-NOX. Em modalidades específicas, a proteína H-NOX inclui um ou mais domínios ou toda a seqüência de outra proteína. Por exemplo, a proteína H-NOX pode ser uma proteína de fusão que inclui um domínio de H-NOX e parte de outra proteína ou outra proteína inteira, por exemplo, albumina (por exemplo, albumina sérica humana). Em algumas modalidades, apenas o domínio de H-NOX está presente.

Uma estrutura cristal de uma H-NOX de ligação de O₂ procariótica de *Thermoanaerobacter tengcongensis* (Nioche, P. e cols. (26 de novembro de 2004), "Femtomolar Sensitivity of a NO Sensor From Clostridium Botulinum", *Science* 306 (5.701): 1.550-1.553; Pellicena, P. e cols. (31 de agosto de 2004), "Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (35): 12.854-12.859) mostra que um grupo hidroxil da cadeia lateral de tirosina forma uma

10 ligação H crítica para a porção Fe^{II}-O₂. Essa rede de ligação de hidrogênio da bolsa distal, que envolve principalmente Y140, estabiliza um complexo de Fe^{II}-O₂ (FIG. 6B). Essa tirosina não está presente em proteínas H-NOX que discriminam contra O₂ e só se ligam ao NO. Por exemplo,

15 prevê-se que essa rede de ligação de hidrogênio esteja ausente nas proteínas H-NOX de sGCs e procariotas aeróbicos, sugerindo que esse é um fator molecular fundamental na seletividade de ligante acentuada contra O₂ exibida por essas proteínas heme. As FIGS. 7A-7G demonstram

20 nitidamente que a adição de uma tirosina na bolsa distal de uma proteína H-NOX do tipo selvagem que se liga ao NO, mas não ao O₂, pode permitir que a proteína H-NOX mutante se ligue ao O₂. Dessa forma, uma tirosina na bolsa heme distal da dobra heme de H-NOX atua como um interruptor para ativar

25 e desativar a ligação do O₂.

Como ilustrada nas FIGS. 6A e 6B, a estrutura da porfirina é altamente distorcida. Como ilustrado na FIG. 6A, o motivo conservado Y-S-R forma interações de ligação de hidrogênio com as cadeias laterais de ácido propiônico

30 do grupo heme. Na FIG. 6B, o H102 conservado é o ligante

proximal ao heme (FIG. 6B).

Como aqui usado, o termo "proteína" inclui proteínas e fragmentos de proteínas, sejam eles isolados de fontes naturais, produzidos por técnicas recombinantes ou sintetizados quimicamente. Uma proteína pode ter uma ou mais modificações, por exemplo, uma modificação pós-tradução (por exemplo, glicosilação etc.) ou qualquer outra modificação (por exemplo, PEGuilação etc.). A proteína pode conter um ou mais aminoácidos de ocorrência não natural (por exemplo, um aminoácido com uma modificação da cadeia lateral). Em várias modalidades, a proteína H-NOX possui pelo menos cerca de 50, 100, 150, 181, 200, 250, 300, 350, 400, ou mais aminoácidos. Em algumas modalidades, as proteínas H-NOX podem incluir de cerca de 50 a cerca de 600 aminoácidos como, por exemplo, cerca de 100 a cerca de 500 aminoácidos, cerca de 150 a cerca de 400 aminoácidos, cerca de 150 a cerca de 300 aminoácidos ou cerca de 175 a cerca de 200 aminoácidos.

Fontes de proteínas H-NOX

As proteínas H-NOX de qualquer gênero ou espécie podem ser usadas nas composições, kits e métodos aqui descritos. Em várias modalidades, a proteína H-NOX é uma proteína de um mamífero (por exemplo, um primata (por exemplo, um ser humano, um macaco, um gorila, um chimpanzé, um lêmure etc.), um bovino, um eqüino, um suíno, um canino ou um felino), um inseto, uma levedura ou uma bactéria, ou é derivada de uma proteína desse tipo. Proteínas H-NOX de mamíferos exemplares incluem guanilato ciclase solúvel humana e de rato do tipo selvagem (por exemplo, a subunidade $\beta 1$). Exemplos de proteínas H-NOX incluem proteínas H-NOX de

mamíferos do tipo selvagem, por exemplo, de *H. sapiens*, *M. musculus*, *C. familiaris*, *B. taurus* e *R. norvegicus*; e proteínas H-NOX do tipo selvagem de vertebrados não mamíferas, por exemplo, de *X. laevis*, *O. latipes*, *O. curivatus* e *F. rubripes*. Exemplos de proteínas H-NOX de ligação de NO do tipo selvagem não mamíferas incluem proteínas H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, *A. gambiae* e *M. sexta*; exemplos proteínas H-NOX de ligação de O₂ não mamíferas do tipo selvagem incluem proteínas H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans* gcy-31, gcy-32, gcy-33, gcy-34, gcy-35, gcy-36, e gcy-37; de *D. melanogaster* CG14885, CG14886 e CG4154; e de *M. sexta* beta-3; exemplos de proteínas H-NOX procarióticas do tipo selvagem incluem *T. tengcongensis*, *V. cholera*, *V. fischerii*, *N. punctiforme*, *D. desulfuricans*, *L. pneumophila* 1, *L. pneumophila* 2 e *C. acetobutylicum*.

Os números de Acesso no NCBI para proteínas H-NOX exemplares incluem os seguintes: *Homo sapiens* β 1 [gi: 2746083], *Rattus norvegicus* β 1 [gi: 27127318], *Drosophila melanogaster* β 1 [gi: 861203], *Drosophila melanogaster* CG14885-PA [gi: 23171476], *Caenorhabditis elegans* GCY35 [gi: 52782806], *Nostoc punctiforme* [gi: 23129606], *Caulobacter crescentus* [gi: 16127222], *Shewanella oneidensis* [gi: 24373702], *Legionella pneumophila* (ORF 2) [CUCGC 272624], *Clostridium acetobutylicum* [gi: 15896488] e *Thermoanaerobacter tengcongensis* [gi: 20807169].

Proteínas H-NOX exemplares também incluem as seguintes proteínas H-NOX que são listadas pelo nome de seu gene, seguido pela abreviatura de sua espécie e Identificadores no Genbank (por exemplo, as seguintes seqüências de

proteínas disponíveis em 21 de maio de 2006; 22 de maio de 2006; 21 de maio de 2007; ou 22 de maio de 2007, que são aqui incorporadas por referência em suas totalidades):

Npun5905_Npu_23129606, alr2278_Ana_17229770,
 5 SO2144_Sone_24373702, Mdeg1343_Mde_23027521,
 VCA0720_Vch_15601476, CC2992_Ccr_16127222,
 Rsph2043_Rhsp_22958463 (gi: 46192757),
 Mmc10739_Mcsp_22999020, Tar4_Tte_20807169,
 Ddes2822_Dde_23475919, CAC3243_Cac_15896488, gcy-
 10 31_Ce_17568389, CG_14885_Dm_24647455, GUCY1B3_Hs_4504215,
 HpGCS-beta1_Hpul_14245738, Gycbeta100B_Dm_24651577,
 CG4154_Dm_24646993 (gi: NP_650424.2, gi: 62484298), gcy-
 32_Ce_13539160, gcy-36_Ce_17568391 (gi: 32566352, gi:
 86564713), gcy-35_Ce-17507861 (gi: 71990146), gcy-
 15 37_Ce_17540904 (gi: 71985505), GCY1a3_Hs_20535603,
 GCY1a2-Hs_899477 ou GYCa-99B_Dm_729270 (gi: 68067738)
 (Lakshminarayan e cols. (2003), "Ancient conserved domains
 shared by animal soluble guanylyl ciclases and bacterial
 signaling proteins", *BMG Genomics* 4: 5-13). As abreviações
 20 de espécies usadas nesses nomes incluem: Ana = *Anabaena Sp*;
 Ccr = *Caulobacter crescentus*; Cac = *Clostridium*
acetobutylicum; Dde = *Desulfovibrio desulfuricans*; Mcsp =
Magnetococcus sp.; Mde = *Microbulbifer degradans*; Npu =
Nostoc punctiforme; Rhsp = *Rhodobacter sphaeroides*; Sone =
 25 *Shewanella oneidensis*; Tte = *Thermoanaerobacter*
tengcongensis; Vch = *Vibrio cholerae*; Ce = *Caenorhabditis*
elegans; Dm = *Drosophila melanogaster*; Hpul = *Hemicentrotus*
pulcherrimus; Hs = *Homo sapiens*.

Outras proteínas H-NOX exemplares incluem as seguintes
 30 proteínas H-NOX que estão listadas por seu nome do

organismo e número de acesso na base de dados Pfam (por exemplo, as seguintes seqüências de proteínas disponíveis em 21 de maio de 2006; 22 de maio de 2006; 17 de maio de 2007; 21 de maio de 2007; ou 22 de maio de 2007, que são aqui incorporadas por referência em suas totalidades):

5 *Caenorhabditis briggsae* Q622M5_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61P44_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61R54_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61V90_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61A94_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q60TP4_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q60M10_CAEBR, *Caenorhabditis elegans* GCY37_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY31_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY36_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY32_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY35_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY34_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY33_CAEEL, *Oryzias curvinotus* Q7T040_ORYCU, *Oryzias curvinotus* Q75WF0_ORYCU, *Oryzias latipes* P79998_ORYLA, *Oryzias latipes* Q7ZSZ5_ORYLA, *Tetraodon nigroviridis* Q4SW38_TETNG, *Tetraodon nigroviridis* Q4RZ94_TETNG, *Tetraodon nigroviridis* Q4S6K5_TETNG, *Fugu rubripes* Q9OVY5_FUGRU, *Xenopus laevis* Q6INK9_XENLA, *Homo sapiens* Q5T8J7_HUMAN, *Homo sapiens* GCYA2_HUMAN, *Homo sapiens* GCYB2_HUMAN, *Homo sapiens* GCYB1_HUMAN, *Gorilla gorilla* Q9N193_9PRIM, *Pongo pygmaeus* Q5RAN8_PONPY, *Pan troglodytes* Q9N192_PANTR, *Macaca mulatta* Q9N194_MACMU, *Hylobates lar* Q9N191_HYLLA, *Mus musculus* Q8BXH3_MOUSE, *Mus musculus* GCYB1_MOUSE, *Mus musculus* Q3UTI4_MOUSE, *Mus musculus* Q3UH83_MOUSE, *Mus musculus* Q6XE41_MOUSE, *Mus musculus* Q80YP4_MOUSE, *Rattus norvegicus* Q8OWX7_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WX8_RAT, *Rattus norvegicus* Q920Q1_RAT, *Rattus norvegicus* Q54A43_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY0_RAT, *Rattus*

10
15
20
25
30

norvegicus Q8OWY4_RAT, *Rattus norvegicus* Q8CH85_RAT, *Rattus norvegicus* Q8OWY5_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB 1_RAT, *Rattus norvegicus* Q8CH90_RAT, *Rattus norvegicus* Q91XJ7_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WX9_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB2_RAT, *Rattus norvegicus* GCYA2_RAT, *Canis familiaris* Q4ZHR9 CANFA, *Bos taurus* GCYB1_BOVIN, *Sus scrofa* Q4ZHR7_PIG, *Gryllus bimaculatus* Q59HN5_GRYBI, *Manduca sexta* O77106_MANSE, *Manduca sexta* O76340_MANSE, *Apis mellifera* Q5UAFO_APIME, *Apis mellifera* Q5FANO_APIME, *Apis mellifera* Q6L5L6_APIME,

5 *Anopheles gambiae* cepa PEST Q7PYK9_ANOGA, *Anopheles gambiae* cepa PEST Q7Q9W6_ANOGA, *Anopheles gambiae* cepa PEST Q7QF31_ANOGA, *Anopheles gambiae* cepa PEST Q7PS01_ANOGA, *Anopheles gambiae* cepa PEST Q7PFY2_ANOGA, *Anopheles gambiae* Q7KQ93_ANOGA, *Drosophila melanogaster* Q24086_DROME,

15 *Drosophila melanogaster* GCYH_DROME, *Drosophila melanogaster* GCY8E_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYDA_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYDB_DROME, *Drosophila melanogaster* Q9VA09_DROME, *Drosophila pseudoobscura* Q29CE1_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C7_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C8_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q29BU7_DROPS,

20 *Aplysia californica* Q7YWK7_APLCA, *Hemicentrotus pulcherrimus* Q95NK5_HEMPU, *Chlamydomonas reinhardtii*, Q5YLC2_CHLRE, *Anabaena* sp Q8YUQ7_ANASP, *Flavobacterium bacterium* BBFL7 Q26GR8_9BACT, *Psychroflexus torquis* ATCC 700755 Q1VQE5_9FLAO,

25 *proteobactéria* marinha gama HTCC2207 Q1YPJ5_9GAMM, *proteobactéria* marinha gama HTCC2207 Q1YTK4_9GAMM, *Caulobacter crescentus* Q9A451_CAUCR, *Acidiphilium cryptum* JF-5 Q2DG60_ACICY, *Rhodobacter sphaeroides* Q3J0U9 RHOS4, *Silicibacter pomeroyi*

30 Q5LPVI_SILPO, *Paracoccus denitrificans* PD1222,

Q3PC67_PARDE, *Silicibacter* sp TM1 040 Q3QNY2_9RHOB,
Jannaschia sp Q28ML8_JANSC, *Magnetococcus* sp MC-1
 Q3XT27_9PROT, *Legionella pneumophila* Q5WXP0_LEGPL,
Legionella pneumophila Q5WTZ5_LEGPL, *Legionella pneumophila*
 5 Q5X268_LEGPA, *Legionella pneumophila* Q5X2R2_LEGPA,
Legionella pneumophila subsp. *pneumophila* Q5ZWM9_LEGPH,
Legionella pneumophila subsp. *pneumophila* Q5ZSQ8_LEGPH,
Colwellia psychrerythraea Q47Y43_COLP3, *Pseudoalteromonas*
atlantica T6c Q3CSZ5_ALTAT, *Shewanella oneidensis*
 10 Q8EF49_SHEON, *Saccharophagus degradans* Q21E20_SACD2,
Saccharophagus degradans Q21ER7_SACD2, *Vibrio angustum* S14
 Q1ZWE5_9VIBR, *Vibrio vulnificus* Q8DAE2_VIBVU, *Vibrio*
alginolyticus 12G01 QIVCP6_VIBAL, *Vibrio* sp DAT722
 Q2FA22_9VIBR, *Vibrio parahaemolyticus* Q87NJ1_VIBPA, *Vibrio*
 15 *fischeri* Q5E1F5_VIBF1, *Vibrio vulnificus* Q7MJS8_VIBVY,
Photobacterium sp SKA34 Q2C6Z5_9GAMM, *Hahella chejuensis*
 Q2SFY7_HAHCH, *Oceanospirillum* sp MED92 Q2BKV0_9GAMM,
Oceanobacter sp RED65 Q1NO35_9GAMM, *Desulfovibrio*
desulfuricans Q310U7_DESDG, *Halothermothrix orenii* H 168
 20 Q2AIW5_9FIRM, *Thermoanaerobacter tengcongensis*
 Q8RBX6_THETN, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903
 Q2ZH17_CALSA, *Clostridium acetobutylicum* Q97E73_CLOAB,
Alkaliphilus metalliredigenes QYMF Q3C763_9CLOT,
Clostridium tetani Q899J9_CLOTE e *Clostridium beijerincki*
 25 NCIMB 8052 Q2WVN0_CLOBE. Prevê-se que essas seqüências
 codifiquem proteínas H-NOX com base na identificação dessas
 proteínas como pertencentes à família da proteína H-NOX com
 o uso da base de dados Pfam aqui descrita.

30 Proteínas H-NOX e ácidos nucleicos adicionais que
 podem ser adequados para uso nas composições farmacêuticas

e métodos aqui descritos podem ser identificados com o uso de métodos padronizados. Por exemplo, programas padronizados de alinhamento de seqüências e/ou de previsão de estrutura podem ser usados para identificar proteínas H-NOX e ácidos nucleicos adicionais com base na similaridade de sua estrutura primária e/ou secundária de proteína prevista com aquela de proteínas H-NOX e ácidos nucleicos conhecidos. Por exemplo, a base de dados Pfam usa algoritmos de alinhamento definidos e Modelos Ocultos de Markov (por exemplo, Pfam 21.0) para categorizar as proteínas em famílias como, por exemplo, a família da proteína H-NOX (Pfam - uma base de dados de alinhamentos de domínio de família de proteína e Modelos Ocultos de Markov, Marca Registrada (C) 1996-2006 "The Pfam Consortium; GNU LGPL Free Software Foundation, Inc.", 59 Temple Place - Suite 330, Boston, MA 02111-1307, EUA). Bases de dados padronizadas como, por exemplo, a base de dados "swissprot-treml" (na Internet em "expasy.org", "Swiss Institute of Bioinformatics Swiss-Prot group CMU" - 1 rue Michel Servet CH-1211 Genebra 4, Suíça) também podem ser usadas para identificar membros da família da proteína H-NOX. A estrutura secundária e/ou terciária de uma proteína H-NOX pode ser prevista com a utilização dos ajustes padronizados de programas padronizados de previsão de estrutura como, por exemplo, PredictProtein (630 West, 168 Street, BB217, Nova York, N.Y. 10032, EUA). Alternativamente, a estrutura secundária e/ou terciária real de uma proteína H-NOX pode ser determinada com a utilização de métodos padronizados.

Em algumas modalidades, a proteína H-NOX possui o mesmo aminoácido na posição correspondente que qualquer um

dos seguintes resíduos da bolsa distal em H-NOX de *T. tengcongensis*: Thr4, Ile5, Thr8, Trp9, Trp67, Asn74, Ile75, Phe78, Phe82, Tyr140, Leu144 ou qualquer combinação de dois ou mais dos citados anteriormente. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX possui uma prolina ou uma arginina em uma posição que corresponde àquela de Pro115 ou Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis*, respectivamente, com base no alinhamento de seqüências de suas seqüências de aminoácidos. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX possui uma histidina que corresponde a His105 de *R. norvegicus* β 1 H-NOX. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX possui ou prevê-se que tenha uma estrutura secundária que inclui seis hélices alfa, seguidas por duas fitas beta, seguidas por uma hélice alfa, seguida por duas fitas beta. Essa estrutura secundária foi relatada para proteínas H-NOX.

Se desejado, uma proteína H-NOX recém-identificada pode ser testada para determinar se ela se liga ao heme com a utilização de métodos padronizados. A habilidade de uma proteína H-NOX para funcionar como um transportador de O₂ pode ser testada determinando-se se a proteína H-NOX se liga ao O₂ com a utilização de métodos padronizados como, por exemplo, aqueles aqui descritos. Se desejado, uma ou mais das mutações aqui descritas podem ser introduzidas na proteína H-NOX para otimizar suas características como transportador de O₂. Por exemplo, podem ser introduzidas uma ou mais mutações para alterar sua constante de dissociação de O₂, a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme, a reatividade ao NO, a estabilidade ao NO ou qualquer combinação de dois ou mais das citadas

anteriormente. Técnicas padronizadas, tais como aquelas aqui descritas, podem ser usadas para medir esses parâmetros.

Como aqui discutido, proteínas H-NOX mutantes (por exemplo, mutantes de classe I e de classe II discutidos abaixo) podem ser derivados por mutagênese a partir dessas ou de outras seqüências-fonte naturais do tipo selvagem (por exemplo, as seqüências listadas nas FIGS. 2-4D ou 8A-8DD ou qualquer outra seqüência aqui descrita). Como aqui usado, o termo "derivada de" refere-se à fonte da proteína na qual uma ou mais mutações é introduzida. Por exemplo, uma proteína que é "derivada de uma proteína de mamífero" refere-se à proteína de interesse que resulta da introdução de uma ou mais mutações na seqüência de uma proteína do tipo selvagem de mamífero (ou seja, uma seqüência que ocorre na natureza).

Proteínas H-NOX mutantes

Como aqui discutido anteriormente, uma proteína H-NOX pode conter uma ou mais mutações, por exemplo, uma mutação que altera a constante de dissociação de O_2 , a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme, a reatividade ao NO, a estabilidade ao NO, ou qualquer combinação de dois ou mais das citadas anteriormente, comparadas com aquelas da proteína do tipo selvagem correspondente. Podem ser gerados painéis de proteínas H-NOX projetadas por mutagênese aleatória, seguida por rastreamento empírico para constantes de dissociação, taxas de dissociação, reatividade ao NO, estabilidade, compatibilidade fisiológica necessárias ou desejadas, ou qualquer combinação de dois ou mais das citadas anteriormente, à luz

dos ensinamentos aqui fornecidos com a utilização de técnicas aqui descritas e, adicionalmente, como conhecido por aqueles habilitados na técnica. Alternativamente, a mutagênese pode ser direcionada seletivamente para regiões ou resíduos específicos, tais como resíduos da bolsa distal aparentes a partir da estrutura tridimensional determinada experimentalmente ou prevista de uma proteína H-NOX (FIG. 1A nessa especificação; e veja, por exemplo, Boon, E.M. e cols. (2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chemical Biology* 1: 53-59, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade, particularmente com relação às seqüências de proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes) ou resíduos conservados evolutivamente identificados a partir de alinhamentos de seqüências (FIGS. 2-4 nessa especificação; e veja, por exemplo, Boon E.M. e cols. (2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chemical Biology* 1: 53-59, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade, particularmente com relação às seqüências de proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes).

Como aqui usado, o termo "proteína mutante" significa uma proteína com uma ou mais mutações, comparada com uma proteína que ocorre na natureza. Em uma modalidade, a proteína mutante possui uma seqüência que difere daquela de todas as proteínas que ocorrem na natureza. Em várias modalidades, a seqüência de aminoácidos da proteína mutante é pelo menos cerca de 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 ou 99,5% idêntica àquela da região correspondente de uma proteína que ocorre na natureza. Em

algumas modalidades, a proteína mutante é um fragmento de proteína que contém pelo menos cerca de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 ou 400 aminoácidos contíguos de uma proteína de comprimento total. A identidade de seqüência pode ser
5 medida, por exemplo, com o uso de um software de análise de seqüências com os parâmetros padronizados aqui especificados (por exemplo, Pacote de Softwares de Análise de Seqüências do "Genetics Computer Group", "University of Wisconsin Biotechnology Center", 1710 University Avenue,
10 Madison, WI 53705). Esse programa combina seqüências similares por atribuição de graus de homologia para várias substituições, eliminações e outras modificações de aminoácidos.

Como aqui usado, o termo "mutação" significa uma
15 alteração em um ácido nucléico ou em uma seqüência de aminoácidos de referência que ocorre na natureza. Mutações de ácidos nucléicos exemplares incluem uma inserção, eliminação, mutação estrutural, mutação silenciosa, mutação do tipo *nonsense* ou mutação do tipo *missense*. Em algumas
20 modalidades, a mutação do ácido nucléico não é uma mutação silenciosa. Mutações de proteínas exemplares incluem a inserção de um ou mais aminoácidos (por exemplo, a inserção de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos), a eliminação de um ou mais aminoácidos (por exemplo, a eliminação de
25 resíduos do terminal N, do terminal C e/ou internos como, por exemplo, a eliminação de pelo menos cerca de 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 ou mais aminoácidos, ou uma eliminação de cerca de 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 ou 400 aminoácidos), a substituição de um ou mais
30 aminoácidos (por exemplo, a substituição de 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9 ou 10 aminoácidos), ou combinações de dois ou mais dos citados anteriormente. Um truncamento funcional exemplar de uma proteína H-NOX inclui os resíduos 1-385 da seqüência de $\beta 1$. Em algumas modalidades, uma proteína mutante possui pelo menos uma alteração de aminoácido, comparada com uma proteína que ocorre na natureza. Em algumas modalidades, uma seqüência de ácidos nucleicos mutante codifica uma proteína que possui pelo menos uma alteração de aminoácido, comparada com uma proteína que ocorre na natureza. Em algumas modalidades, o ácido nucleico não é uma versão degenerada de um ácido nucleico que ocorre na natureza que codifica uma proteína com uma seqüência de aminoácidos idêntica a uma proteína que ocorre na natureza. A nomenclatura usada para se referir a uma mutação de aminoácido em particular identifica, inicialmente, o aminoácido do tipo selvagem, seguido pelo número do resíduo e, finalmente, o aminoácido substituto. Por exemplo, Y140L significa que tirosina foi substituída por uma leucina no número de resíduo 140.

Uma "mutação conservada evolutivamente" é a substituição de um aminoácido em uma proteína por um aminoácido na posição correspondente de outra proteína na mesma família de proteína. Mutações conservadas evolutivamente exemplares (também denominadas mutações da classe I) estão listadas na Tabela 1A. Na Tabela 1A, as mutações são numeradas/anotadas de acordo com a seqüência de H-NOX $\beta 1$ humana, mas são análogas para todas as seqüências de H-NOX. Dessa forma, a posição correspondente em qualquer outra proteína H-NOX pode ser mutada para o resíduo indicado. Por exemplo, Phe4 de H-NOX $\beta 1$ humana

podem ser mutada para uma tirosina, uma vez que outras proteínas H-NOX possuem uma tirosina nessa posição. O resíduo de fenilalanina correspondente pode ser mutado para uma tirosina em qualquer outra proteína H-NOX. Em

5 modalidades específicas, uma ou mais mutações estão confinadas aos resíduos conservados evolutivamente. Em algumas modalidades, uma ou mais mutações podem incluir pelo menos uma mutação conservada evolutivamente e pelo menos uma mutação não conservada evolutivamente. Se

10 desejado, essas proteínas H-NOX mutantes são submetidas ao rastreamento empírico para constantes de dissociação de NO/O₂, reatividade ao NO, estabilidade e compatibilidade fisiológica à luz dos ensinamentos aqui fornecidos.

Tabela 1A. Mutações de H-NOX da Classe I exemplares

15 **dirigidas aos resíduos conservados evolutivamente**

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

Em algumas modalidades, a mutação é uma mutação da bolsa distal, por exemplo, uma mutação de um resíduo na hélice alfa A, D, E ou G (Pellicena, P. e cols. (31 de agosto de 2004), "Crystal Structure of An Oxygen-Binding

20 Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(35): 12.854-12.859). Mutações exemplares da bolsa distal (também denominadas mutações da classe II) estão listadas na Tabela 1B. Na Tabela 1B, as mutações são numeradas/anotadas de acordo com a sequência

25 de H-NOX β 1 humana, mas são análogas para todas as

seqüências de H-NOX. Como várias substituições fornecem mutações viáveis em cada resíduo citado, o resíduo em cada posição indicada pode ser alterado para qualquer outro aminoácido de ocorrência natural ou de ocorrência não natural (denominado "X"). Estas mutações podem produzir proteínas H-NOX com diversas características desejadas de afinidade, estabilidade e reatividade.

Tabela 1B. Mutações de H-NOX da Classe II exemplares direcionadas aos resíduos da bolsa distal

| | | |
|------|------|-------|
| V8X | M73X | I145X |
| L9X | F77X | I149X |
| F70X | C78X | |

Em modalidades específicas, a mutação é uma mutação de heme da bolsa distal. Como aqui descrito, um determinante molecular crucial que evita a ligação ao O₂ em membros da família de H-NOX de ligação ao NO é a ausência de um doador de ligação H na bolsa distal do heme. Conseqüentemente, em algumas modalidades, a mutação altera a ligação de H entre o domínio de H-NOX e o ligante dentro da bolsa distal. Em algumas modalidades, a mutação rompe um doador de ligação H da bolsa distal e/ou transmite redução de ligação de ligante de O₂ em relação ao domínio de H-NOX do tipo selvagem correspondente. Resíduos da bolsa distal exemplares incluem hr4, Ile5, Thr8, Trp9, Trp67, Asn74, Ile75, Phe78, Phe82, Tyr140 e Leu144 de H-NOX de *T. tengcongensis* e os resíduos correspondentes em qualquer outra proteína H-NOX.

Resíduos que não estejam na bolsa distal também podem afetar a estrutura tridimensional do grupo heme; essa estrutura, por sua vez, afeta a ligação de O₂ e de NO ao

ferro no grupo heme. Conseqüentemente, em algumas modalidades, a proteína H-NOX possui uma ou mais mutações fora da bolsa distal. Exemplos de resíduos que podem ser mutados, mas que não estão na bolsa distal, incluem Pro115
5 e Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis*. Em algumas modalidades, a mutação está na bolsa proximal que inclui His105 como um resíduo que se liga ao ferro de heme.

Em algumas modalidades, quando duas ou mais mutações estão presentes, pelo menos uma mutação está na bolsa
10 distal, e pelo menos uma mutação está fora da bolsa distal (por exemplo, uma mutação na bolsa proximal). Em algumas modalidades, todas as mutações estão na bolsa distal.

Em algumas modalidades, a seqüência de aminoácidos da proteína H-NOX não é idêntica à seqüência de uma proteína
15 que é produzida por um organismo na natureza. Em algumas modalidades, a seqüência de aminoácidos da proteína H-NOX não é idêntica a uma seqüência encontrada em qualquer base de dados em 21 de maio de 2006 ou em 22 de maio de 2006 (por exemplo, todas as seqüências previstas conhecidas ou
20 conhecidas como sendo uma seqüência de ácidos nucleicos ou de aminoácidos de H-NOX). Em algumas modalidades, a seqüência de aminoácidos da proteína H-NOX não é idêntica a uma seqüência encontrada em qualquer base de dados em 21 de maio de 2007 ou em 22 de maio de 2007 (por exemplo, todas
25 as seqüências previstas conhecidas ou conhecidas como sendo uma seqüência de ácidos nucleicos ou de aminoácidos de H-NOX).

Para reduzir a imunogenicidade de proteínas H-NOX derivadas de outras fontes que não seres humanos, os
30 aminoácidos em uma proteína H-NOX podem ser mutados para os

aminoácidos correspondentes em uma H-NOX humana. Por exemplo, um ou mais aminoácidos na superfície da estrutura terciária de uma proteína H-NOX não humana podem ser mutados para o aminoácido correspondente em uma proteína H-NOX humana. Em algumas variações, uma mutação de um ou mais aminoácidos de superfície pode ser combinada com uma mutação de dois ou mais resíduos da bolsa distal, uma mutação de um ou mais resíduos fora da bolsa distal (por exemplo, uma mutação na bolsa proximal), ou combinações de dois ou mais dos citados anteriormente.

Mutações exemplares são mostradas na Tabela 2. Além disso, qualquer um dos resíduos listados na Tabela 2 pode ser mutado para qualquer outro aminoácido. A invenção também está relacionada a qualquer combinação de mutações aqui descritas como, por exemplo, mutações duplas, triplas ou maiores. Por exemplo, combinações de qualquer uma das mutações aqui descritas podem ser feitas na mesma proteína H-NOX. Observe que mutações em posições equivalentes em outras proteínas H-NOX de mamíferos ou não mamíferos também são englobadas por essa invenção. Se desejado, resíduos diferentes daqueles mencionados na Tabela 2 também podem ser mutados. Proteínas H-NOX mutantes exemplares compreendem uma ou mais mutações que transmitem alteração da ligação de ligante de O_2 ou NO em relação ao domínio de H-NOX do tipo selvagem correspondente, e são operacionais como um transportador de O_2 gasoso sangüíneo fisiologicamente compatível de mamíferos.

Na Tabela 2 e em todas as tabelas subseqüentes, o número de resíduo para uma mutação indica a posição na seqüência da proteína H-NOX em particular descrita. Por

exemplo, *T. tengcongensis* I5A refere-se à substituição de isoleucina por alanina na quinta posição em H-NOX de *T. tengcongensis*. A mesma mutação de isoleucina em alanina pode ser feita no resíduo correspondente em qualquer outra proteína H-NOX (esse resíduo pode ou não ser o quinto resíduo na seqüência de outras proteínas H-NOX). Como a seqüências de aminoácidos dos domínios de $\beta 1$ H-NOX mamíferos diferem em, no máximo, dois aminoácidos, espera-se também que as mutações que produzem as proteínas H-NOX mutantes desejáveis, quando introduzidas nas proteínas $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de rato, produzam proteínas H-NOX mutantes desejáveis quando introduzidas em proteínas $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de outros mamíferos, por exemplo, seres humanos.

Tabela 2. H-NOX mutantes exemplares de *T. tengcongensis* (Tt), *L. pneumophila* (Lp), *D. desulfuricans* (Dd), *V. cholera* (Vc), *N. punctiforme* (Np), *C. botulinum* (Cb), *C. acetobutylicum*, (Ca), de rato, humanas, de *C. elegans* (Ce).

| | <i>Tt</i> | <i>Lp</i> | <i>Dd</i> | Outras bactérias | Rato | Humana | Verme |
|----|----------------------|---------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 20 | <i>Tt</i> H-NOX | <i>L2</i> H-NOX | <i>Dd</i> H-NOX(728-899) | <i>Vc</i> H-NOX | $\beta 1$ (1-385) | $\beta 1$ (1-385) | <i>Ce</i> GCY-35(1-252) |
| | <i>Tt</i> H-NOX His6 | <i>L2</i> F142Y | <i>Dd</i> Y139L | <i>Np</i> H-NOX | $\beta 1$ (1-385) I145Y | $\beta 1$ (1-385) I145Y | |
| | | <i>L2</i> F9W-F142Y | | <i>Cb</i> H-NOX(1-175) | $\beta 1$ (1-385) I145H | $\beta 1$ (1-385) I145H | |
| 25 | <i>Tt</i> I5A | | | <i>Cb</i> H-NOX(1-186) | $\beta 1$ (1-385) C78Y | $\beta 1$ (1-385) C78Y | |
| | <i>Tt</i> I5L | <i>L1</i> H-NOX | | | | | |

| | | | | | |
|----|---|-----------------|--|---|---|
| | <i>Tt</i> I5L- P115A <i>Tt</i> W9F | <i>Lt</i> F142Y | <i>Ca</i> H- NOX(1- 197) <i>Ca</i> H- NOX(1- 183) | β 1(1-194) β 1 H105F | β 1(1-194) β 1 H105F |
| 5 | <i>Tt</i> W9F- Y140L <i>Tt</i> W9F- Y140H | | | β 1 H105G β 1(1-194) I145Y | β 1 H105G β 1(1-194) I145Y |
| | <i>Tt</i> W9F- N74A | | | β 1(1-194) L9W-I145Y | β 1(1-194) L9W- I145Y |
| | <i>Tt</i> W9Y | | | β 2(1-217) β 2(1-217) I142Y | β 2(1-217) β 2(1-217) I142Y |
| 10 | <i>Tt</i> W9N <i>Tt</i> W9H <i>Tt</i> N74E <i>Tt</i> N74A | | | | |
| 15 | <i>Tt</i> N74H <i>Tt</i> N74A- Y140H <i>Tt</i> I75F His6 <i>Tt</i> F78Y- Y140L <i>Tt</i> F78Y- Y140F | | | | |
| 20 | <i>Tt</i> P115A <i>Tt</i> R135Q His6 <i>Tt</i> Y140F <i>Tt</i> Y140L <i>Tt</i> Y140H <i>Tt</i> Y140A <i>Tt</i> L144F His6 | | | | |

25 **Modificações nas proteínas H-NOX**

Qualquer uma das proteínas H-NOX do tipo selvagem ou
mutantes pode ser modificada e/ou formulada com a
utilização de métodos padronizados para aprimorar as
aplicações terapêuticas ou industriais. Por exemplo, e
30 particularmente aplicados às proteínas H-NOX heterólogas

projetadas, diversos métodos são conhecidos na técnica para o isolamento desses agentes da vigilância imunológica, incluindo entrecruzamento, PEGuilação, decoração de carboidrato etc. (por exemplo, Rohlfis, R.J. e cols. (15 de maio de 1998), "Arterial Blood Pressure Responses to Cell-Free Hemoglobin Solutions And The Reaction With Nitric Oxide", *J. Biol. Chem.* 273(20): 12.128-12.134; Migita, R. e cols. (junho de 1997), "Blood Volume And Cardiac Index in Rats After Exchange Transfusion With Hemoglobin-Based Oxygen Carriers", *J. Appl. Physiol.* 82(6): 1.995-2.002; Vandegriff, K.D. e cols. (15 de agosto de 2004), "Kinetics of NO and O₂ Binding to a Maleimide Poly(ethylene glycol)-Conjugated Human Haemoglobin", *Biochem. J.* 382 (Pt 1): 183-189, que são aqui incorporados por referência em suas totalidades, particularmente com relação à modificação de proteínas), bem como outras técnicas conhecidas por aqueles habilitados na técnica. A fusão de uma proteína H-NOX com uma proteína humana como, por exemplo, albumina sérica humana, pode aumentar a meia-vida sérica, a viscosidade e a pressão oncótica coloidal. Em algumas modalidades, uma proteína H-NOX é modificada durante ou depois de sua síntese para diminuir sua imunogenicidade e/ou para aumentar seu tempo de retenção plasmática. As proteínas H-NOX também podem ser encapsuladas (por exemplo, encapsulação dentro de lipossomos ou nanopartículas).

Características de proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes

Como aqui descrito, foi gerado um grande número de proteínas H-NOX mutantes variadas que fornecem intervalos de constantes de dissociação de NO e de O₂, de k_{off} de O₂, de

reatividade ao NO e de estabilidade. Para fornecer transportadores de gases sangüíneos operacionais, as proteínas H-NOX podem ser usadas para substituir funcionalmente ou suplementar os transportadores endógenos de O₂ como, por exemplo, hemoglobina. Conseqüentemente, em algumas modalidades, uma proteína H-NOX possui uma taxa de associação de O₂, uma taxa de dissociação de O₂, uma constante de dissociação para ligação de O₂, uma estabilidade ao NO, uma reatividade ao NO, uma taxa de auto-oxidação, um tempo de retenção plasmática similares ou aperfeiçoados, ou qualquer combinação de dois ou mais dos citados anteriormente, comparados com um transportador de O₂ endógeno como, por exemplo, hemoglobina.

Como aqui usado, o termo "hemoglobina" significa uma proteína ou um mutante desta da família bem caracterizada de hemoglobinas, que são metaloproteínas de transporte de O₂ que contêm ferro, em células sangüíneas vermelhas. A hemoglobina humana purificada, sem estroma, possui uma K_D cinética para o O₂ de cerca de 200-500 nM. Esse valor depende da subunidade.

Como aqui usado, o termo "k_{off}" significa uma taxa de dissociação, por exemplo, a taxa de liberação de O₂ ou de NO por uma proteína. Um valor numérico de k_{off} menor indica uma taxa de dissociação mais lenta. Em várias modalidades, a k_{off} para O₂ para uma proteína H-NOX é entre cerca de 0,01 a cerca de 200 s⁻¹ a 20°C como, por exemplo, cerca de 0,1 a cerca de 200 s⁻¹, cerca de 0,1 a 100 s⁻¹, cerca de 1,0 a cerca de 16,0 s⁻¹, cerca de 1,35 a cerca de 23,4 s⁻¹, cerca de 1,34 a cerca de 18 s⁻¹, cerca de 1,35 a cerca de 14,5 s⁻¹, cerca de 0,21 a cerca de 23,4 s⁻¹, cerca de 1,35 a cerca

de $2,9 \text{ s}^{-1}$, cerca de 2 a cerca de 3 s^{-1} , cerca de 5 a cerca de 15 s^{-1} ou cerca de 0,1 a cerca de 1 s^{-1} . Em algumas modalidades, a proteína H-NOX possui uma k_{off} para oxigênio que é menor ou igual a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C (por exemplo, entre cerca de $0,21 \text{ s}^{-1}$ a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C).

O termo " k_{on} " significa uma taxa de associação, por exemplo, a taxa de ligação de O_2 ou NO a uma proteína. Um valor numérico menor da k_{on} indica uma taxa de associação mais lenta. Em várias modalidades, a k_{off} para O_2 para uma proteína H-NOX é entre cerca de 0,14 a cerca de $60 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 20°C como, por exemplo, cerca de 6 a cerca de $60 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, cerca de 6 a $12 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, cerca de 15 a cerca de $60 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, cerca de 5 a cerca de $18 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou cerca de 6 a cerca de $15 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

O termo "constante de dissociação" significa uma "constante de dissociação cinética" ou uma "constante de dissociação calculada". Uma "constante de dissociação cinética" ou " K_{D} " significa uma proporção de taxa cinética off (k_{off}) para a taxa cinética on (k_{on}), por exemplo, um valor de K_{D} determinado como um valor absoluto com a utilização de métodos padronizados (por exemplo, métodos espectroscópicos, de fluxo interrompido ou de fotólise instantânea padronizados), incluindo métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica e/ou aqui descritos. A "constante de dissociação calculada" ou " K_{D} calculada" refere-se a uma aproximação da constante de dissociação cinética com base em uma k_{off} medida. Um valor para a k_{on} é derivado por meio da correlação entre a K_{D} cinética e a k_{off} , como aqui descritas.

Em várias modalidades, a K_D cinética ou calculada para a ligação de O_2 por uma proteína H-NOX é entre cerca de 1 nM a 1 mM como, por exemplo, cerca de 2 nM a cerca de 2 μ M, cerca de 2 μ M a cerca de 1 mM, cerca de 100 nM a cerca de 1 μ M, cerca de 9 μ M a cerca de 50 μ M, cerca de 100 μ M a cerca de 1 mM, cerca de 50 nM a cerca de 10 μ M, cerca de 2 nM a cerca de 50 μ M, cerca de 100 nM a cerca de 1,9 μ M, cerca de 150 nM a cerca de 1 μ M ou cerca de 100 nM a cerca de 255 nM, cerca de 20 nM a cerca de 2 μ M, 20 nM a cerca de 75 nM, cerca de 1 μ M a cerca de 2 μ M, cerca de 2 μ M a cerca de 10 μ M, cerca de 2 μ M a cerca de 9 μ M ou cerca de 100 nM a 500 nM a 20°C. Em algumas modalidades, a K_D cinética ou calculada para a ligação de O_2 é de menos do que cerca de 100 nM, 80 nM, 50 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM ou 10 nM a 20°C.

Em várias modalidades, a K_D cinética ou calculada para a ligação de O_2 por uma proteína H-NOX está dentro de cerca de 0,01 a cerca de 100 vezes a da hemoglobina sob as mesmas condições (por exemplo, a 20°C), por exemplo, entre cerca de 0,1 a cerca de 10 vezes ou entre cerca de 0,5 a cerca de 2 vezes a da hemoglobina sob as mesmas condições (por exemplo, a 20°C). Em várias modalidades, a K_D cinética ou calculada para a ligação de NO por uma proteína H-NOX está dentro de cerca de 0,01 a cerca de 100 vezes a da hemoglobina sob as mesmas condições (por exemplo, a 20°C), por exemplo, entre cerca de 0,1 a cerca de 10 vezes ou entre cerca de 0,5 a cerca de 2 vezes a da hemoglobina sob as mesmas condições (por exemplo, a 20°C).

Como aqui usado, o termo "afinidade por oxigênio" é um termo qualitativo que se refere à potência da ligação de oxigênio à porção heme de uma proteína. Essa afinidade é

afetada tanto pela k_{off} quanto pela k_{on} por oxigênio. Um valor de K_D por oxigênio numericamente inferior significa uma afinidade maior. "Afinidade por NO" é um termo qualitativo que se refere à potência da ligação de NO a uma proteína (por exemplo, ligação a um grupo heme ou a um oxigênio ligado a um grupo heme associado a uma proteína). Essa afinidade é afetada tanto pela k_{off} quanto pela k_{on} por NO. Um valor de K_D por NO numericamente inferior significa uma afinidade maior.

Como aqui usado, o termo "estabilidade ao NO" refere-se à estabilidade ou resistência de uma proteína à oxidação por NO na presença de oxigênio. Por exemplo, a habilidade da proteína para não ser oxidada quando ligada ao NO na presença de oxigênio é indicativa da estabilidade da proteína ao NO. Em algumas modalidades, menos do que cerca de 50, 40, 30, 10 ou 5% de uma proteína H-NOX são oxidados após incubação por cerca de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 ou 20 horas a 20°C.

Como aqui usado, o termo "reatividade ao NO" refere-se à taxa na qual o ferro no heme de uma proteína de ligação de heme é oxidado por NO na presença de oxigênio em uma concentração de 2 μM de proteína. Um menor valor numérico para a reatividade ao NO em unidades de s^{-1} indica uma reatividade ao NO menor. Em várias modalidades, a reatividade ao NO de uma proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C como, por exemplo, menos do que cerca de 600 s^{-1} , 500 s^{-1} , 400 s^{-1} , 300 s^{-1} , 200 s^{-1} , 100 s^{-1} , 75 s^{-1} , 50 s^{-1} , 25 s^{-1} , 20 s^{-1} , 10 s^{-1} , 5 s^{-1} , 3 s^{-1} , 2 s^{-1} , 1,8 s^{-1} , 1,5 s^{-1} , 1,2 s^{-1} , 1,0 s^{-1} , 0,8 s^{-1} , 0,7 s^{-1} ou 0,6 s^{-1} a 20°C. Em várias modalidades, a reatividade ao NO de uma

proteína H-NOX é entre cerca de 0,1 a cerca de 600 s^{-1} a 20°C como, por exemplo, entre cerca de 0,5 a cerca de 400 s^{-1} , cerca de 0,5 a cerca de 100 s^{-1} , cerca de 0,5 a cerca de 50 s^{-1} , cerca de 0,5 a cerca de 10 s^{-1} , cerca de 1 a cerca de 5 s^{-1} ou cerca de 0,5 a cerca de 2,1 s^{-1} a 20°C. Em várias modalidades, a reatividade de uma proteína H-NOX é pelo menos cerca de 10, 100, 1.000 ou 10.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina sob as mesmas condições, por exemplo, a 20°C.

10 Como aqui usado, o termo "taxa de auto-oxidação" refere-se à taxa na qual o ferro no heme de uma proteína de ligação de heme é auto-oxidado. Um valor numérico menor da taxa de auto-oxidação em unidades de s^{-1} indica uma taxa de auto-oxidação menor. Em várias modalidades, a taxa de auto-oxidação de heme de uma proteína H-NOX é de menos do que
15 cerca de 1,0 h^{-1} a 37°C como, por exemplo, menos do que cerca de 0,9 h^{-1} , 0,8 h^{-1} , 0,7 h^{-1} , 0,6 h^{-1} , 0,5 h^{-1} , 0,4 h^{-1} , 0,3 h^{-1} , 0,2 h^{-1} , 0,1 h^{-1} ou 0,05 h^{-1} a 37°C. Em várias modalidades, a taxa de auto-oxidação de heme de uma
20 proteína H-NOX é entre cerca de 0,006 a cerca de 5,0 h^{-1} a 37°C como, por exemplo, cerca de 0,006 a cerca de 1,0 h^{-1} , 0,006 a cerca de 0,9 h^{-1} ou cerca de 0,06 a cerca de 0,5 h^{-1} a 37°C.

Em várias modalidades, uma proteína H-NOX mutante
25 possui: (a) uma constante de dissociação de O_2 ou NO, uma taxa de associação (k_{on} para O_2 ou NO) ou uma taxa de dissociação (k_{off} para O_2 ou NO) dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina, (b) possui uma afinidade por NO mais fraca (por exemplo, pelo menos cerca de 10
30 vezes, 100 vezes ou 1.000 vezes mais fraca) do que aquela

de sGC $\beta 1$, respectivamente, (c) uma reatividade ao NO com O_2 ligado pelo menos 1.000 vezes menor do que a hemoglobina, (d) um tempo de retenção plasmática *in vivo* pelo menos 2, 10, 100 ou 1.000 vezes maior do que aquele da hemoglobina, ou (e) qualquer combinação de dois ou mais dos citados anteriormente.

Transportadores de O_2 adequados exemplares fornecem constantes de dissociação dentro de duas ordens de magnitude daquela da hemoglobina, ou seja entre cerca de 0,01 e 100 vezes, por exemplo, entre cerca de 0,1 e 10 vezes, ou entre cerca de 0,5 e 2 vezes daquelas da hemoglobina. Podem ser usadas diversas técnicas estabelecidas para quantificar as constantes de dissociação, por exemplo, as técnicas aqui descritas (Boon, E.M. e cols. (2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chem. Biol.* 1: 53-59; Boon, E.M. e cols. (outubro de 2005), "Ligand Discrimination in Soluble Guanylate Cyclase and the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins", *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9(5): 441-446; Boon, E.M. e cols. (2005), "Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors", *J. Inorg. Biochem.* 99(4): 892-902), Vandegriff, K.D. e cols. (15 de agosto de 2004), "Kinetics of NO and O_2 Binding to a Maleimide Poly(ethylene glycol)-Conjugated Human Haemoglobin", *Biochem. J.* 382(Pt 1): 183-189, que são aqui incorporados por referência em suas totalidades, particularmente com relação à medida de constantes de dissociação), além daquelas conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Transportadores de O_2 exemplares fornecem reatividade da proteína H-NOX ao NO baixa ou

minimizada com O₂ ligado, por exemplo, uma reatividade ao NO menor do que aquela da hemoglobina. Em algumas modalidades, a reatividade ao NO é bem menor como, por exemplo, pelo menos cerca de 10, 100, 1.000 ou 10.000 vezes

5 menor do que aquela da hemoglobina. Podem ser usadas diversas técnicas estabelecidas para quantificar a reatividade ao NO (Boon, E.M. e cols. (2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chem. Biol.* 1: 53-59; Boon, E.M. e cols. (outubro de

10 2005), "Ligand Discrimination in Soluble Guanylate Cyclase and the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins", *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9(5): 441-446; Boon, E.M. e cols. (2005), "Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors", *J. Inorg. Biochem.* 99(4): 892-902),

15 Vandegriff, K.D. e cols. (15 de agosto de 2004), "Kinetics of NO and O₂ Binding to a Maleimide Poly(ethylene glycol)-Conjugated Human Haemoglobin", *Biochem. J.* 382(Pt 1): 183-189, que são aqui incorporados por referência em suas totalidades, particularmente com relação à medida da

20 reatividade ao NO), além daquelas conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Como as H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis* possuem uma reatividade ao NO muito baixa, outras proteínas H-NOX do tipo selvagem e proteínas H-NOX mutantes podem ter uma baixa reatividade ao NO similar. Por

25 exemplo, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis* possui uma reatividade ao NO similar àquela da H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*.

Além disso, transportadores de O₂ adequados fornecem estabilidade elevada ou maximizada, particularmente

30 estabilidade *in vivo*. Podem ser utilizadas diversas medidas

da estabilidade, por exemplo, a estabilidade oxidativa (por exemplo, estabilidade à auto-oxidação ou à oxidação por NO), estabilidade à temperatura e a estabilidade *in vivo*. Podem ser usadas diversas técnicas estabelecidas para

5 quantificar a estabilidade, por exemplo, as técnicas aqui descritas (Boon, E.M. e cols. (2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chem. Biol.* 1:53-59; Boon, E.M. e cols. (outubro de 2005), "Ligand Discrimination in Soluble. Guanylate Cyclase and

10 the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins", *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9(5): 441-446; Boon, E.M. e cols. (2005), "Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors", *J. Inorg. Biochem.* 99(4): 892-902), além daquelas conhecidas por aqueles habilitados na técnica.

15 Para a estabilidade *in vivo* no plasma, sangue ou tecido, medidas exemplares da estabilidade incluem o tempo de retenção, a taxa de depuração e a meia-vida. Espera-se que as proteínas H-NOX de organismos termofílicos sejam estáveis em temperaturas elevadas. Em várias modalidades,

20 os tempos de retenção plasmática são pelo menos cerca de 2, 10, 100 ou 1.000 vezes maior do que aquela da hemoglobina (por exemplo, Bobofchak, K.M. e cols. (agosto de 2003), "A Recombinant Polymeric Hemoglobin With Conformational, Functional, And Physiological Characteristics of an *in vivo*

25 O₂ transporter", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285(2): H549-H561). Como será observado por aqueles habilitados na técnica, substitutos do sangue baseados em hemoglobina são limitados pela depuração rápida da hemoglobina sem células do plasma em função da presença de

30 receptores para hemoglobina que removem hemoglobina sem

células do plasma. Como não há receptores para proteínas H-NOX no plasma, espera-se que as proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes tenham um tempo de retenção plasmática mais longo do que o da hemoglobina. Se desejado, o tempo de retenção plasmática pode ser aumentado por PEGuilação ou entrecruzamento de uma proteína H-NOX ou por fusão de uma proteína H-NOX com outra proteína com a utilização de métodos padronizados (por exemplo, aqueles aqui descritos e aqueles conhecidos por aqueles habilitados na técnica).

10 Em várias modalidades, a proteína H-NOX possui uma constante de dissociação de O_2 entre cerca de 1 nM a cerca de 1 mM a 20°C, e uma reatividade ao NO pelo menos cerca de 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina sob as mesmas condições, por exemplo, a 20°C. Em algumas modalidades, a

15 proteína H-NOX possui uma constante de dissociação de O_2 entre cerca de 1 nM a cerca de 1 mM a 20°C e uma reatividade ao NO menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C (por exemplo, menos do que cerca de 600 s^{-1} , 500 s^{-1} , 100 s^{-1} , 20 s^{-1} ou $1,8\text{ s}^{-1}$ a 20°C). Em algumas modalidades, a

20 proteína H-NOX possui uma constante de dissociação de O_2 dentro de 2 ordens de magnitude a da hemoglobina, e uma reatividade ao NO pelo menos cerca de 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina sob as mesmas condições, por exemplo, a 20°C. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX possui uma k_{off}

25 para oxigênio entre cerca de 0,01 a cerca de 200 s^{-1} a 20°C, e uma reatividade ao NO pelo menos cerca de 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina sob as mesmas condições, por exemplo, a 20°C. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX possui uma k_{off} para oxigênio que é de menos do que

30 cerca de $0,65\text{ s}^{-1}$ a 20°C (por exemplo, entre cerca de 0,21

s^{-1} a cerca de $0,64 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$), e uma reatividade ao NO pelo menos cerca de 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina sob as mesmas condições, por exemplo, a $20^{\circ}C$. Em modalidades específicas, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 2 nM a cerca de 50 μM , cerca de 50 nM a cerca de 10 μM , cerca de 100 nM a cerca de 1,9 μM , cerca de 150 nM a cerca de 1 μM ou cerca de 100 nM a cerca de 255 nM a $20^{\circ}C$. Em várias modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 80 nM a $20^{\circ}C$ como, por exemplo, entre cerca de 20 nM a cerca de 75 nM a $20^{\circ}C$. Em algumas modalidades, a reatividade ao NO da proteína H-NOX é pelo menos cerca de 100 vezes menor ou cerca de 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina, sob as mesmas condições, por exemplo, a $20^{\circ}C$. Em algumas modalidades, a reatividade ao NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de $700 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$ como, por exemplo, menos do que cerca de $600 s^{-1}$, $500 s^{-1}$, $400 s^{-1}$, $300 s^{-1}$, $200 s^{-1}$, $100 s^{-1}$, $75 s^{-1}$, $50 s^{-1}$, $25 s^{-1}$, $20 s^{-1}$, $10 s^{-1}$, $50 s^{-1}$, $3 s^{-1}$, $2 s^{-1}$, $1,8 s^{-1}$, $1,5 s^{-1}$, $1,2 s^{-1}$, $1,0 s^{-1}$, $0,8 s^{-1}$, $0,7 s^{-1}$ ou $0,6 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$. Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre $0,01$ a $200 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$ como, por exemplo, cerca de $0,1$ a cerca de $200 s^{-1}$, cerca de $0,1$ a $100 s^{-1}$, cerca de $1,35$ a cerca de $23,4 s^{-1}$, cerca de $1,34$ a cerca de $18 s^{-1}$, cerca de $1,35$ a cerca de $14,5 s^{-1}$, cerca de $0,21$ a cerca de $23,4 s^{-1}$, cerca de 2 a cerca de $3 s^{-1}$, cerca de 5 a cerca de $15 s^{-1}$ ou cerca de $0,1$ a cerca de $1 s^{-1}$. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 100 nM a cerca de 1,9 μM a $20^{\circ}C$, e a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,35

s^{-1} a cerca de $14,5 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$. Em algumas modalidades, a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de $1 h^{-1}$ a $37^{\circ}C$ como, por exemplo, menos do que cerca de $0,9 h^{-1}$, $0,8 h^{-1}$, $0,7 h^{-1}$, $0,6 h^{-1}$, $0,5 h^{-1}$, $0,4 h^{-1}$, $0,3 h^{-1}$, $0,2 h^{-1}$ ou $0,1 h^{-1}$. Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,35 s^{-1}$ a cerca de $14,5 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$, e a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de $1 h^{-1}$ a $37^{\circ}C$. Em algumas modalidades, a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,35 s^{-1}$ a cerca de $14,5 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de $700 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$ (por exemplo, menos do que cerca de $600 s^{-1}$, $500 s^{-1}$, $100 s^{-1}$, $20 s^{-1}$ ou $1,8 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$). Em algumas modalidades, a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de $1 h^{-1}$ a $37^{\circ}C$, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de $700 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$ (por exemplo, menos do que cerca de $600 s^{-1}$, $500 s^{-1}$, $100 s^{-1}$, $20 s^{-1}$ ou $1,8 s^{-1}$ a $20^{\circ}C$).

Em algumas modalidades, a viscosidade da solução de proteína H-NOX é entre 1 e 4 centipoise (cP). Em algumas modalidades, a pressão oncótica coloidal da solução de proteína H-NOX é entre 2,67 e 6,67 kPa.

A Tabela 3 lista tamanhos, afinidades por oxigênio, estabilidades à auto-oxidação, taxas de reatividade ao NO e modificações exemplares para proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes. Na Tabela 3, o tamanho do veículo refere-se ao peso molecular de uma proteína H-NOX modificada (por exemplo, PEGuilada) ou não modificada.

Tabela 3: Modalidades exemplares para proteínas H-NOX

| Tamanho do veículo | Afinidade ao oxigênio | Estabilidade (auto- oxidação) | Reatividade ao NO (s^{-1}) | Decoração da partícula |
|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| >1 MD | < 1 nM | 1 hora | 0,01 a 0,1 | Entrecruzamento |
| 0,5 kD a 1 MD | 1 nM a 100 nM | 1 h a 12 h | 0,1 a 1 | PEGuilação |
| 0,1 kD a 0,5 kD | 100 nM a 1 μ M | 12 h a 48 h | 1 a 10 | Encapsulação |
| 0,01 kD a 0,1 kD | 1 μ M a 10 μ M | 48 h a 2 semanas | 10 a 100 | |

Dados exemplares para mutantes específicos são registrados nas Tabelas 4-12. Nas Tabelas 4-12, $\beta 1$ e $\beta 2$ referem-se às proteínas derivadas de proteínas H-NOX de rato. Como as seqüências de aminoácidos de domínios de proteínas $\beta 1$ H-NOX de mamíferos diferem em, no máximo, dois aminoácidos, esperam-se resultados similares para as mutações correspondentes em proteínas $\beta 1$ H-NOX de outros mamíferos, por exemplo, $\beta 1$ humana. Como mostrado na Tabela 4, a introdução de uma ou mais mutações em proteínas H-NOX do tipo selvagem permite que a taxa de auto-oxidação e a taxa de dissociação de O_2 sejam alteradas. Se desejado, a taxa de auto-oxidação ou a taxa de dissociação de O_2 pode ser ainda alterada por combinação de qualquer uma das mutações simples ou duplas listadas na Tabela 4 ou por introdução de uma ou mais mutações adicionais em uma proteína H-NOX, como aqui descrito.

Tabela 4. Estabilidade à auto-oxidação, propriedades de ligação de O_2 (por exemplo, taxa de dissociação de O_2) e resíduos de ligação de H da bolsa distal estão listados

para proteínas H-NOX da classe II do tipo selvagem e mutantes

| Proteína | Estabilidade | Atividade de ligação de O ₂ | Resíduos da bolsa distal |
|---|-------------------------|--|--------------------------|
| Tt H-NOX, uma H-NOX procariótica e um forte ligante de O ₂ | | | |
| Tt H-NOX | $k_{ox} \sim 0^\circ$ | $k_{off} = 1,22$ | Trp9, Phe78, Tyr140 |
| Tt Y140F | $k_{ox} = 0,05$ | $k_{off} = 15,7^d$ | Trp9, Phe78, Phe140 |
| Tt Y140L | $k_{ox} = 0,19$ | $k_{off} = 20^d$ | Trp9, Phe78, Leu140 |
| Tt Y140H | $K_{ox} = 0,87$ | $k_{off} = 5,03$ | Trp9, Phe78, His140 |
| Tt Y140A | Estável ^a | Complexo parcial | Trp9, Phe78, Ala140 |
| Tt W9F | $k_{ox} \sim 0^\circ^c$ | $k_{off} = 1,84$ | Phe9, Phe78, Tyr140 |
| Tt W9F-Y140L | $K_{ox} = 0,12$ | Sem complexo formado | Phe9, Phe78, Leu140 |
| Tt W9F-Y140H | $K_{ox} = 0,11$ | $k_{off} = 23,4$ | Phe9, Phe78, His140 |
| Tt F78Y-Y140L | $k_{ox} \sim 0^\circ$ | $k_{off} = 0,83$ | Trp9, Tyr78, Leu140 |
| Tt F78Y-Y140F | $k_{ox} \sim 0^\circ$ | $k_{off} = 1,48$ | Trp9, Tyr78, Phe140 |
| Proteínas H-NOX procarióticas para as quais a proteína do tipo selvagem não se liga ao O ₂ | | | |
| L2 H-NOX | Estável ^a | Sem complexo formado | Phe9, Phe78, Phe142 |
| L2 F142Y | Estável ^f | $k_{off} = 3,68$ | Phe9, Phe78, |

| | | | |
|---|----------------------|--|------------------------|
| | | | Tyr142 |
| L2 F9W-F142Y | Estável ^f | Se liga ao O ₂ ^e | Trp9, Phe78, Tyr142 |
| L1 H-NOX | $k_{ox} = 0,31$ | Sem complexo formado | Leu9, Leu78, Phe142 |
| L1 F142Y | $k_{ox} = 1,8$ | $k_{off} = 1,73$ ^d | Leu9, Leu78, Tyr142 |
| H-NOX eucariótica para a qual a proteína do tipo selvagem não se liga ao O ₂ | | | |
| $\beta 2(1-217)$ | $k_{ox} = 0,18$ | Sem complexo formado | Leu9, Cys76, Ile142 |
| $\beta 2(1-217)$ I142Y | | g | Leu9, Cys76, Tyr142 |
| $\beta 1(1-194)$ | $k_{ox} = 4,3$ | Sem complexo formado | Leu9, Cys78, Ile145 |
| $\beta 1(1-194)$ I145Y | $k_{ox} = 2,8$ | g | Leu9, Cys78, Tyr145 |
| $\beta 1(1-194)$ L9W-I145Y | $k_{ox} \sim 10$ | g | Trp9, Cys78, Tyr145 |
| $\beta 1(1-385)$ | Estável ^e | Sem complexo formado | Leu9, Cys78, Ile145 |
| $\beta 1(1-385)$ I145Y | $k_{ox} = 0,72$ | $k_{off} = 2.69$ | Leu9, Cys78, Tyr145 |
| $\beta 1(1-385)$ I145H | | | Leu9, Cys78, His145 |
| $\beta 1(1-385)$ C78Y | | | Leu9, Tyr78, Ile145 |
| Outra H-NOX prevista para se ligar ao O ₂ como a construção do tipo selvagem | | | |

| | | | |
|-----------------------|---|--|------------------------|
| Dd H- NOX(728-899) | $k_{ox} = 0,98$ | $k_{off} = 5,80$ | Phe9, Phe75, Tyr139 |
| Dd Y 139L | | | Phe9, Phe75, Leu139 |
| Cb H-NOX(1- 175) | Construção não estável ^h | g | Trp9, Phe78, Tyr140 |
| Cb H-NOX(1- 186) | Ligeiramente mais estável ⁱ | g | Trp9, Phe78, Tyr140 |
| Ca H-NOX(1- 197) | Construção não estável ^h | g | Trp9, Phe78, Tyr140 |
| Ca H-NOX(1- 183) | Ligeiramente mais estável ⁱ | g | Trp9, Phe78, Tyr140 |
| Ce GCY-35(1- 252) | Estável | Se liga ao O ₂ ^e | Phe9, Thr78, Tyr144 |

^a A construção é estável à oxidação (avaliada pela taxa de auto-oxidação, k_{ox} [h⁻¹] a 37°C) e/ou perda de heme. ^b A atividade de ligação de O₂ foi avaliada pela taxa de dissociação de O₂ do heme a 20°C (s⁻¹). ^c Após 24 horas a 37°C, ainda não há indicação de auto-oxidação. ^d Apenas uma pequena porção da proteína forma um complexo com O₂; a taxa relatada representa a cinética para essa população. ^e A proteína se liga ao O₂, mas a k_{off} não foi determinada. ^f Embora relativamente estável, essa proteína se precipitava à medida que era oxidada, tornando difícil medir a k_{ox} . ^g Não aplicável em função da instabilidade ou da oxidação rápida. ^h "Construção não estável" significa que a proteína se oxida imediatamente sob as condições testadas. ⁱ "Ligeiramente mais estável" significa que a proteína se oxida ao longo de um período de minutos a horas, mas não permanece estável além de 24 horas sob as condições

testadas.

A Tabela 5 ilustra a alteração da taxa de associação de O_2 (k_{on}), a taxa de dissociação de O_2 (k_{off}), a constante de dissociação de O_2 (K_D) e a taxa de auto-oxidação (k_{ox}) em proteínas H-NOX pela introdução de uma ou mais mutações. Em algumas modalidades, qualquer uma das mutações simples ou duplas listadas na Tabela 5 é combinada com outra mutação (por exemplo, outra mutação na Tabela 5 ou qualquer outra mutação aqui descrita) para alterar ainda mais a taxa de associação de O_2 , a taxa de dissociação de O_2 , a constante de dissociação de O_2 , a taxa de auto-oxidação ou combinações de dois ou mais dos citados anteriormente.

Tabela 5. Constantes de cinética de ligação de O_2 para proteínas heme Fe^{II} ligadas por histidil

| Proteína | K_D ^a | k_{on} ^b | k_{off} | k_{ox} ^d | Ref, |
|--------------|--------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|------|
| Tt H-NOX | $89,7 \pm 6,2$ | $13,61 \pm 1,0$ | $1,22 \pm 0,09$ | e | i |
| Tt P115A | $21,2 \pm 2,1$ | $10,4 \pm 1,1$ | $0,22 \pm 0,01$ | e | j |
| Tt I5A | ~80 | | $0,82 \pm 0,03$ | 0,7 | j |
| Tt I5L | ~1.000 | | $9,50 \pm 0,64$ | 0,6 | j |
| Tt 15L-P115A | ~30 | | $0,28 \pm 0,01$ | 0,6 | j |
| Tt W9F | 305 ± 31 | $6,02 \pm 0,62$ | $1,84 \pm 0,17$ | e | i |
| Tt Y140F | f | $15,7 \pm 1,4$ | $15,7 \pm 9,8$ | 0,05 | j |

| | | | | | |
|-----------------|--|----------------|----------------|-------|---|
| Tt Y140L | ~2.000 | Geminada | 20,1 ± 2,0 | 0,19 | i |
| Tt Y140H | ~500 | | 5,03 ± 0,69 | 0,87 | j |
| Tt W9F-Y140H | ~2.500 | | 23,4 ± 3,7 | 0,11 | j |
| Tt W9F-Y140L | Nenhum complexo com O ₂ observado | | | 0,12 | i |
| Tt F78Y-Y140F | ~150 | | 1,48 ± 0,33 | e | j |
| Tt F78Y-Y140L | ~80 | | 0,83 ± 0,17 | e | i |
| Tt W9F-N74A | Milimolar | Muito lenta | | | j |
| Dd H-NOX | Milimolar | Muito lenta | 7,13 ± 0,45 | 0,14 | j |
| Dd Y139L | Nenhum complexo com O ₂ observado | | | | j |
| β1(1-385) I145Y | 70.000,00 | 0,00004 | 2,69 ± 0,61 | 0,72 | i |
| L2 F142Y | 9.200 ± 3.000 | 0,40 ± 0,14 | 3,68 ± 0,71 | | i |
| Hs Hb beta | 267 | 60 | 16 | | n |
| Hs Hb alfa | 560 | 50 | 28 | | k |
| Sw Mb | 880 | 17 | 15 | 0,006 | k |
| Bj FixL | 140.000 | 0,14 | 20 | 2,7 | L |
| HemAT-B | 720 | 32 | 23 | 0,06 | m |

^a Constante de dissociação a 20°C (nM); ^b Taxa de associação de O₂ ao heme a 20°C (μM⁻¹s⁻¹); ^c Taxa de dissociação de O₂ do heme a 20°C (s⁻¹); ^d Taxa de auto-oxidação de heme (h⁻¹) a 37°C; ^e Após 24 horas a 37°C,

ainda não havia indicação de auto-oxidação; ^f Apenas uma pequena porção da proteína forma um complexo com O₂, embora a cinética para essa população pudesse ser medida; ⁱ Boon, E.M. e cols. (junho de 2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chemical Biology* 1(1): 53-59, ^j Dados não publicados; ^k Springer, B.A. e cols. (1994) "Family Physicians Key Partners in Preventing Suicide Among Youth", *Chem. Rev.* 94: 699-714; ^l Gilles-Gonzalez e cols. (1994) "Heme-Based Sensors, Exemplified by the Kinase FixL, are a New Class of Heme Protein with Distinctive Ligand Binding and Autoxidation", *Biochemistry* 33: 8.067-8.073. ^m Aono, S. e cols. (2002) "Resonance Raman and Ligand Binding Studies of the Oxygen-Sensing Signal Transducer Protein HemAT from *Bacillus Subtilis*", *J. Biol. Chem.* 277: 13.528-13.538. "Antonini, E. e cols. (1971), "Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands", *North-Holland Publ.*, Amsterdam.

A Tabela 6 ilustra que a taxa de associação de O₂, a taxa de dissociação de O₂, o O₂, a taxa de auto-oxidação, a reatividade ao NO e a estabilidade de complexos de Fe^{II}-O₂ em proteínas H-NOX podem ser alterados pela introdução de
5 uma ou mais mutações. Em algumas modalidades, qualquer uma das mutações simples ou duplas listadas na Tabela 6 é combinada com outra mutação (por exemplo, outra mutação na Tabela 6 ou qualquer outra mutação aqui descrita) para alterar ainda mais a taxa de associação de O₂, a taxa de
10 dissociação de O₂, o O₂, a taxa de auto-oxidação, a reatividade ao NO ou a estabilidade dos complexos de Fe^{II}-O₂ em uma proteína H-NOX. Como será observado por aqueles

habilitados na técnica, a introdução de uma ou mais mutações adicionais, tais como aquelas aqui descritas, pode ser usada para alterar ainda mais esses valores.

5 Tabela 6. Taxa de associação de O_2 , taxa de dissociação de O_2 , taxa de auto-oxidação, reatividade ao NO e estabilidade de complexos de $Fe^{II}-O_2$ em proteínas H-NOX.

| Proteína | k_{on} ^a | k_{of} ^b | k_{ox} ^c | Reatividade ao NO ^d | Estabilidade do complexo de $Fe^{II}-O_2$ |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|---|
| Hs Hb | 23 | 11 | 0,006 | $<0,001\text{ s}$ $(\sim 7.000\text{ s}^{-1})^c$ | Oxida-se o/n no ar em temperatura ambiente, estável a 4°C no ar, anaeróbica estável |
| Tt H-NOX | 13,6 | 1,22 | Muito lenta | $0,54 \pm 0,07$ s^{-1} | Sempre estável |
| Tt Y140H | ~10 | 5,03 | 0,87 | $1,7 : 0,4\text{ s}^{-1}$ | Oxida-se o/n no ar em temperatura ambiente, estável a 4°C no ar, anaeróbica estável |
| $\beta 1(1-385)$ I145Y | ~105 | 2,69 | 0,72 | Lenta para $Fe^{II}-NO$ | Oxida-se o/n no ar em temperatura ambiente, estável a 4°C no ar, anaeróbica estável |

^a Taxa de O_2 associação ao heme a 20°C ($\mu M^{-1}\text{ s}^{-1}$); ^b Taxa de dissociação de O_2 do heme a 20°C (s^{-1}); ^c Taxa de auto-oxidação de heme (h^{-1}) a 37°C; ^d Para determinação de reatividades ao NO: proteínas purificadas (Tt WT H-NOX, Tt V140H H-NOX, hemoglobina de *Homo sapiens* (Hs Hb)) foram

preparadas a 2 μM em Tampão A, e óxido nítrico (NO) foi preparado a 200 μM em Tampão A (Tampão A: 50 mM Hepes, pH 7,5, 50 mM NaCl) a 20°C. Com o uso de espectroscopia de fluxo interrompido, a proteína foi rapidamente misturada com NO em uma proporção 1:1 com um tempo de integração de 0,00125 segundo. Os comprimentos de onda de mudança máxima foram ajustados para uma exponencial simples, medindo basicamente a etapa de taxa limitante da oxidação por NO. Os produtos finais da reação foram férrico-NO para as proteínas H-NOX e férrico-água para Hs Hb. ^e Para Hs Hb, a reação da proteína com NO foi tão rápida que a reação estava completa dentro do tempo morto do experimento (0,001 segundo). A reatividade ao NO para a hemoglobina é de aproximadamente 7.000 s^{-1} a 20°C, com base em Eich, R.F. e cols. (1996) "Mechanism of NO-Induced Oxidation of Myoglobin and Hemoglobin", *Biochemistry* 35: 6.976-6.983.

A Tabela 7 demonstra que a constante de dissociação para ligação de O_2 pode ser alterada significativamente por mutação de um ou mais resíduos nas proteínas H-NOX. Os valores da K_D cinética para essas proteínas H-NOX exemplares variam de 21,20 nM a 1.000.000,00 nM a 20°C. Se desejado, a constante de dissociação para ligação de O_2 pode ainda ser alterada por combinação de qualquer uma das mutações simples ou duplas listadas na Tabela 7 ou por introdução de uma ou mais mutações adicionais em uma proteína H-NOX, como aqui descrito.

Tabela 7. Proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes e proteínas de referência dispostas pelo valor da constante de dissociação para ligação de O_2

| Proteína | K _D cinética (nM) | ± | K _D calculada |
|---------------|---------------------------------|-------|--------------------------|
| Tt P115A | 21,2 | 2,1 | |
| Tt N74H | | | 27 |
| Tt 15L-P115A | | | 30 |
| Tt N74A | | | 32 |
| Tt I5A | | | 80 |
| Tt F78Y-Y140L | | | 80 |
| Tt H-NOX His6 | | | 89 |
| Tt H-NOX | 89,7 | 6,2 | |
| Tt wt | | | 90, |
| Tt F78Y-Y140F | | | 150 |
| Tt W 9 | | | 218 |
| Tt R135Q His6 | | | 252 |
| Hs Hb beta | | | 267 |
| Tt W9F | 305 | 31 | |
| Tt W9H | | | 456 |
| Tt Y140H | | | 500 |
| Hs Hb alfa | | | 560 |
| Tt W9N | | | 573 |
| Tt I75F-His6 | | | 713-773 |
| HemAT-B | | | 720 |
| Sw Mb | | | 880 |
| Tt I5L | | | 1.000 |
| Tt L144F-His6 | | | 1.092-1.185 |
| Tt Y140L | | | 2.000 |
| Tt W9F-Y140H | | | 2.500 |
| L2 F142Y | 9.200 | 3.000 | |
| Bj FixL | | | 140.000 |

| | | | |
|------------------------|--|--|-----------|
| <i>Tt</i> W9F-N74A | | | 1.000.000 |
| <i>Dd</i> H-NOX | | | 1.000.000 |
| β 1(1-385) I145Y | | | 1.000.000 |

A Tabela 8 demonstra que as taxas de dissociação para a ligação de O₂ podem ser alteradas significativamente por mutação de um ou mais resíduos nas proteínas H-NOX. As taxas de dissociação para essas proteínas H-NOX exemplares
5 variam de 0,21 s⁻¹ a 23,4 s⁻¹ a 20°C. Se desejado, a taxa de dissociação para a ligação de O₂ pode ainda ser alterada por combinação de qualquer uma das mutações simples ou duplas listadas na Tabela 8 ou por introdução de uma ou mais mutações adicionais em uma proteína H-NOX, como aqui
10 descrito.

Tabela 8. Proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes e proteínas de referência dispostas pelo valor da taxa de dissociação para a ligação de O₂

| Proteína | k_{off} (s ⁻¹) | ± |
|------------------------|------------------------------|-------|
| <i>Tt</i> N74A | 0,21 | 0,004 |
| <i>Tt</i> P115A | 0,22 | 0,01 |
| <i>Tt</i> 15L-P115A | 0,28 | 0,03 |
| <i>Tt</i> N74E | 0,38 | 0,01 |
| <i>Tt</i> N74H | 0,44 | 0,01 |
| <i>Tt</i> I5A | 0,82 | 0,03 |
| <i>Tt</i> F78Y-Y140L | 0,83 | 0,17 |
| <i>Tt</i> H-NOX His6 | 1,2 | 0,02 |
| <i>Tt</i> H-NOX | 1,22 | 0,09 |
| <i>Tt</i> F78Y-Y140F | 1,48 | 0,33 |
| LI F142Y | 1,73 | |
| <i>Tt</i> W9F | 1,84 | 0,17 |
| β 1(1-385) I145Y | 2,69 | 0,61 |

| | | |
|----------------------|-------|------|
| <i>Tt</i> W9Y | 3,07 | 0,1 |
| <i>Tt</i> R135Q His6 | 3,56 | 0,08 |
| L2 F142Y | 3,68 | 0,71 |
| <i>Tt</i> Y140H | 5,03 | 0,69 |
| <i>Tt</i> W9H | 6,42 | 0,11 |
| <i>Dd</i> H-NOX | 7,13 | 0,45 |
| <i>Tt</i> W9N | 8,09 | 0,14 |
| <i>Tt</i> 15L | 9,5 | 0,64 |
| <i>Tt</i> I75F-His6 | 10,48 | 0,12 |
| <i>Sw</i> Mb | 15 | |
| <i>Tt</i> Y140F | 15,7 | 9,8 |
| <i>Hs</i> Hb beta | 16 | |
| <i>Tt</i> L144F-His6 | 16,06 | 0,21 |
| B FixL | 20 | |
| <i>Tt</i> Y140L | 20,1 | 2 |
| HemAT-B | 23 | |
| <i>Tt</i> W9F-Y140H | 23,4 | 3,7 |
| <i>Hs</i> Hb alfa | 28 | |

A Tabela 9 demonstra que as taxas de associação para a ligação de O₂ podem ser alteradas significativamente por mutação de um ou mais resíduos nas proteínas H-NOX. As taxas de associação para essas proteínas H-NOX exemplares variam de 60 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 0,14 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 20°C. Se desejado, a taxa de associação para a ligação de O₂ pode ainda ser alterada por combinação de qualquer uma das mutações simples ou duplas listadas na Tabela 9 ou por introdução de uma ou mais mutações adicionais em uma proteína H-NOX, como aqui descrito.

Tabela 9. Proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes e proteínas de referência dispostas pelo valor da taxa de

associação para a ligação de O₂

| Proteína | k_{on} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) | \pm |
|--|--|-------|
| Hs Hb beta | 60 | |
| Hs Hb alfa | 50 | |
| HemAT-B | 32 | |
| Sw Mb | 17 | |
| Tt Y 140 | 15,7 | 1,4 |
| Tt H-NOX | 13,6 | 1 |
| TtP115A | 10,4 | 1,1 |
| Tt W9F | 6,02 | 0,62 |
| L2 F142Y | 0,4 | 0,14 |
| Bj FixL | 0,14 | |
| Tt W9F-N74A | muito lenta ^a | |
| Dd H-NOX | muito lenta ^a | |
| β 1(1-385) I145Y | muito lenta ^a | |
| ^a "Muito lenta" significa mais lenta do que hemoglobina, por exemplo, aproximadamente uma a duas ordens de magnitude mais lenta do que hemoglobina. | | |

A Tabela 10 ilustra o efeito de mutações de H-NOX exemplares sobre a ligação de O₂ e NO. Cada número listado na Tabela 10 para a forma de Fe não ligada é para um pico único (que está listado entre as colunas β e α). Quando o O₂ ou o NO se liga, esse pico único se divide em dois picos, β e α (que estão listados abaixo das colunas β e α , respectivamente). Se desejado, a ligação de O₂ ou NO pode ainda ser alterada por combinação de qualquer uma das mutações simples ou duplas listadas na Tabela 10 ou por introdução de uma ou mais mutações adicionais em uma proteína H-NOX, como aqui descrito.

Tabela 10: Posições ^a do UV visível para alguns complexos de proteína heme FeII ligados por histidil

| Proteína | Soret | β | α |
|--|---------------------------|---------|----------|
| Complexo de Fe^{II} não ligado | | | |
| sGC | 431 | 555 | |
| β 1 (1-385) I145Y | 429 | 549 | |
| Tt H-NOX | 431 | 565 | |
| Tt W9F-Y140L | 430 | 560 | |
| Vc H-NOX | 429 | 568 | |
| Np H-NOX | 430 | 555 | |
| L2 H-NOX | 428 | 557 | |
| L2 F142Y | 428 | 557 | |
| Tt I75F-His6 | 431 | 569 | |
| Tt L144F-His6 | 433 | 564 | |
| Hb | 430 | 555 | |
| Complexo de Fe^{II}-NO | | | |
| sGC | 398 | 537 | 572 |
| β 1 (1-385) I145Y | 399/416 | 542 | 574 |
| Tt H-NOX | 420 | 547 | 575 |
| Tt W9F-Y140L | 423 | 540 | 573 |
| Vc H-NOX | 398 | 540 | 573 |
| Np H-NOX | 416/400 | 543 | 576 |
| L2 H-NOX | 399/416 | 544 | 575 |
| L2 F142Y | 417 | 544 | 578 |
| Tt I75F-His6 | 418 | 545 | 574 |
| Tt L144F-His6 | 416 | 544 | 574 |
| Hb | 418 | 545 | 575 |
| Complexo de Fe^{II}-O₂ | | | |
| SGC | Nenhum complexo observado | | |
| β 1 (1-385) I145Y | 416 | 541 | 575 |

| | | | |
|--------------------------|---------------------------|-----|-----|
| Tt H-NOX | 416 | 556 | 591 |
| Tt W9F-Y140L | Nenhum complexo observado | | |
| Vc H-NOX | Nenhum complexo observado | | |
| Np H-NOX | Nenhum complexo observado | | |
| L2 H-NOX | Nenhum complexo observado | | |
| L2 F142Y | 417 | 542 | 577 |
| Tt I75F-His6 | 416 | 552 | 589 |
| Tt L144F-His6 | 416 | 544 | 574 |
| Hb | 415 | 541 | 577 |
| <hr/> | | | |
| ^a nm (a 20°C) | | | |
| <hr/> | | | |

A Tabela 11 contém posições de pico UV visível para alguns complexos de Fe (II), Fe (III), Fe (II)NO e Fe(II)-O₂. Quando uma hemoglobina ou proteína H-NOX é anaeróbica, ela possui um pico de Soret a ~431 nm, e está em um estado não ligado. Caso a proteína H-NOX não se ligue ao O₂, então o pico de Soret não será alterado quando o O₂ for adicionado. Caso a proteína H-NOX não se ligue ao O₂, então seu pico de Soret irá mudar entre 414 nm e 418 nm quando o O₂ for adicionado, que é a mesma mudança que ocorre na hemoglobina, indicativa de O₂ ligado ao heme. Os picos de Soret para H-NOX (Fe(III)) oxidada ou H-NOX ligada ao NO em um estado de 6 coordenadas podem ser relevantes para o estado da proteína H-NOX após armazenamento ou uso. Caso a proteína H-NOX não se ligue ao NO, então o pico de Soret não irá se alterar quando o NO for adicionado. Caso a proteína H-NOX se ligue ao NO e forme um complexo de ferroso-nitrosil de 6 coordenadas, então seu pico de Soret irá mudar para entre 420 nm e 424 nm quando o NO for adicionado. Caso a proteína H-NOX se ligue ao NO e forme um complexo de ferroso-nitrosil de 5 coordenadas, o pico de

Soret irá mudar para ~399 nm. Se desejado, a ligação de O₂ ou NO pode ainda ser alterada por combinação de qualquer uma das mutações simples ou duplas listadas na Tabela 11 ou por introdução de uma ou mais mutações adicionais em uma proteína H-NOX, como aqui descrito.

Tabela 11. Posições possíveis do pico de UV visível para alguns complexos de Fe (II), Fe (III), Fe(II)-NO e Fe(II)-O₂.

| Complexo | Proteína | Soret | β | α |
|----------|----------------------|-------|-----------|----------|
| Fe (II) | <i>Tt</i> wt | 430 | 563 | |
| | <i>Tt</i> W9Y | 430 | 569 | |
| | <i>Tt</i> N74A | 433 | 558 | |
| | <i>Tt</i> N74H | 431 | 561 | |
| | <i>Tt</i> N74A-Y140H | 430 | 567 | |
| | <i>Tt</i> W9H | 431 | 563 | |
| | <i>Tt</i> N74E | 433 | 559 | |
| | <i>Tt</i> W9N | 431 | 569 | |
| | <i>Tt</i> wt His6 | 430 | 565 | |
| | | | | |
| Complexo | Proteína | Soret | β^a | α |
| Fe (III) | <i>Tt</i> wt | 413 | 550 | 585 |
| | <i>Tt</i> W9Y | 409 | N.A. | |
| | <i>Tt</i> N74A | 416 | 554 | 586 |
| | <i>Tt</i> N74H | 408 | N.A. | |
| | <i>Tt</i> N74A-Y140H | 407 | N.A. | |
| | <i>Tt</i> W9H | 407 | N.A. | |
| | <i>Tt</i> N74E | 408 | N.A. | |
| | <i>Tt</i> W9N | 408 | N.A. | |
| | <i>Tt</i> wt His6 | 413 | 550 | 586 |

^a "N.A." representa bandas α e β não atribuíveis em consequência de sinal baixo em comprimentos de onda mais longos.

| Complexo | Proteína | Soret | β | α |
|------------------------|---------------|-------|---------|----------|
| Fe(II) -NO | Tt wt | 420 | 550 | 578 |
| | Tt W9Y | 420 | 552 | 576 |
| | Tt N74A | 421 | 572 | |
| | Tt N74H | 424 | 562 | |
| | Tt N74A-Y140H | 421 | 549 | 576 |
| | Tt W9H | 420 | 548 | 575 |
| | Tt N74E | 422 | 544 | 571 |
| | Tt W9N | 421 | 541 | 576 |
| | Tt wt His6 | 420 | 547 | 576 |
| | | | | |
| Complexo | Proteína | Soret | β | α |
| Fe(II) -O ₂ | Tt wt | 416 | 556 | 591 |
| | Tt W9Y | 416 | 555 | 590 |
| | Tt N7 4A | 418 | 553 | 589 |
| | Tt N74H | 418 | 553 | 589 |
| | Tt N74A-Y140H | 414 | 555 | 584 |
| | Tt W9H | 418 | 556 | 589 |
| | Tt N74E | 417 | 555 | 587 |
| | Tt W9N | 416 | 588 | 553 |
| | Tt wt His6 | 416 | 556 | 591 |

A Tabela 12 contém taxas de auto-oxidação para 5 proteínas H-NOX de *T. tengcongensis* exemplares. Se desejado, a taxa de auto-oxidação pode ainda ser alterada por combinação de qualquer uma das mutações listadas na Tabela 12 ou por introdução de uma ou mais mutações

adicionais em uma proteína H-NOX, como aqui descrito. Os valores médios de 2 nm e 3 nm na Tabela 12 referem-se a uma mudança no pico de Soret de UV-Vis por 2 a 3 nm ao longo do período de tempo da observação; essa mudança extremamente pequena pode ser causada por auto-oxidação.

Tabela 12. Taxas de auto-oxidação para proteínas H-NOX de *T. tengcongensis* (Tt)

| Proteína | Taxa de auto-oxidação (25°C, hora ⁻¹) ^a |
|---------------|---|
| Tt wt | Estável |
| Tt W9Y | Estável |
| Tt N74A | Estável |
| Tt N74H | Estável a 4°C, muito lenta em temperatura ambiente (2 nm) |
| Tt W9H | Estável |
| Tt N74E | Muito lenta a 4°C (2 nm), lenta em temperatura ambiente |
| Tt W9N | Estável a 4°C, muito lenta em temperatura ambiente (3 nm) |
| Tt wt His6 | Estável |
| Tt I75F-His6 | Estável |
| Tt L144F-His6 | Estável |

^a "Estável" representa ausência de oxidação de heme após pelo menos 24 horas.

10 Ácidos nucleicos de H-NOX

A invenção também apresenta ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das proteínas H-NOX mutantes aqui descritas. Como aqui usado, o termo "ácido nucleico" refere-se a dois ou mais desoxirribonucleotídeos e/ou ribonucleotídeos na forma de fita simples ou dupla e, a

menos que limitado de forma diferente, engloba análogos conhecidos de nucleotídeos de ocorrência natural que hibridizam para os ácidos nucléicos de forma similar aos nucleotídeos que ocorrem na natureza. Em algumas

5 modalidades, o ácido nucléico é um ácido nucléico recombinante. O termo "ácido nucléico recombinante" significa um ácido nucléico de interesse que é livre de um ou mais ácidos nucléicos (por exemplo, genes), os quais, no genoma que ocorre na natureza do organismo do qual o ácido

10 nucléico de interesse é derivado, flanqueia o ácido nucléico de interesse. Em algumas modalidades, um ácido nucléico de H-NOX está ligado operacionalmente a outro ácido nucléico que codifica toda ou uma porção de outra proteína, de tal forma que o ácido nucléico recombinante

15 codifique uma proteína de fusão que inclui uma proteína H-NOX (por exemplo, um domínio de H-NOX, com ou sem outro domínio de uma proteína H-NOX) e toda ou parte de outra proteína, por exemplo, albumina sérica humana. Portanto, o termo inclui, por exemplo, um DNA recombinante que é

20 incorporado em um vetor, em um plasmídeo ou vírus que se replica de forma autônoma, ou no DNA genômico de um procariota ou eucariota, ou que existe como uma molécula separada (por exemplo, um cDNA, um fragmento de DNA genômico ou um fragmento de cDNA produzido por PCR ou

25 digestão por endonuclease de restrição) independente de outras seqüências.

A invenção também apresenta vetores com um ou mais ácidos nucléicos que codificam qualquer uma das proteínas H-NOX mutantes que são aqui descritas. Como aqui usado, o

30 termo "vetor" significa uma construção que é capaz de

liberação e, opcionalmente expressar, um ou mais ácidos nucleicos de interesse em uma célula hospedeira. Exemplos de vetores incluem, sem limitação, plasmídeos, vetores virais, vetores de expressão de DNA ou RNA, cosmídeos e
5 vetores de fago. Em algumas modalidades, o vetor contém um ácido nucleico sob o controle de uma sequência de controle de expressão. Uma "sequência de controle de expressão" significa uma sequência de ácidos nucleicos que dirige a transcrição de um ácido nucleico de interesse. Uma
10 sequência de controle de expressão pode ser um promotor, por exemplo, um promotor constitutivo ou um promotor indutível, ou um intensificador. A sequência de controle de expressão está ligada operacionalmente ao segmento de ácido nucleico a ser transcrito.

15 Em modalidades específicas, o ácido nucleico inclui um segmento ou toda a sequência de ácidos nucleicos de qualquer um dos ácidos nucleicos mostrados nas FIGS. 2-4D ou 8A-8DD. Em algumas modalidades, o ácido nucleico inclui pelo menos cerca de 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600,
20 700, 800 ou mais nucleotídeos contíguos de um ácido nucleico de H-NOX, e contém uma ou mais mutações (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 mutações), comparado com o ácido nucleico de H-NOX do qual foi derivado. Em várias modalidades, um ácido nucleico de H-NOX
25 mutante contém menos do que cerca de 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ou 2 mutações, comparado com o ácido nucleico de H-NOX do qual foi derivado. A invenção também apresenta variantes degeneradas de qualquer ácido nucleico que codifica uma proteína H-NOX mutante.

30 A invenção também inclui uma célula ou uma população

de células que contêm pelo menos um ácido nucléico que codifica uma proteína H-NOX mutante aqui descrita. Células exemplares incluem células de insetos, plantas, leveduras, bacterianas e mamíferas. Essas células são úteis para a
5 produção de proteínas H-NOX mutantes com a utilização de métodos padronizados como, por exemplo, aqueles aqui descritos.

Formulações de proteínas H-NOX

Qualquer proteína H-NOX do tipo selvagem ou mutante
10 aqui descrita pode ser usada para a formulação de composições farmacêuticas ou não farmacêuticas. Como discutido com mais detalhe anteriormente, essas formulações são úteis em diversas aplicações terapêuticas e industriais.

15 Em algumas modalidades, a composição farmacêutica inclui uma ou mais das proteínas H-NOX do tipo selvagem ou mutantes (por exemplo, qualquer uma das proteínas H-NOX do tipo selvagem ou mutantes aqui descritas) e um veículo farmacêuticamente aceitável. Em várias modalidades, a
20 proteína H-NOX é uma proteína isolada ou purificada. O termo "veículo farmacêuticamente aceitável" significa qualquer material que, quando combinado com um ingrediente ativo, permite que o ingrediente retenha a atividade biológica e não provoque uma resposta imune inaceitável
25 (por exemplo, uma alergia grave ou um choque anafilático) à luz dos conhecimentos daqueles habilitados na técnica. Exemplos incluem, sem limitação, qualquer um dos veículos farmacêuticos padronizados como, por exemplo, soluções salinas tamponadas com fosfato, água, emulsões como, por
30 exemplo, emulsão óleo/água, e vários tipos de agentes

umidificantes. Um diluente exemplar para administração em aerossol ou parenteral é a solução salina tamponada com fosfato ou solução salina normal (0,9%). Composições que compreendem esses veículos são formuladas por métodos
5 convencionais bem conhecidos (veja, por exemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª edição, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; e "Remington, The Science and Practice of Pharmacy", 20ª Ed. Mack Publishing, 2000, que são aqui incorporados por
10 referência em suas totalidades, particularmente com relação às formulações).

Embora qualquer veículo adequado conhecido por aqueles habilitados na técnica possa ser empregado nas composições farmacêuticas dessa invenção, o tipo de veículo irá variar,
15 dependendo do modo de administração. As composições podem ser formuladas por qualquer meio de administração adequado, incluindo, por exemplo, administração intravenosa, intra-arterial, intravesicular, por inalação, intraperitoneal, intrapulmonar, intramuscular, subcutânea, intratraqueal,
20 transmucosa, intra-ocular, intratecal ou transdérmica. Para administração parenteral, por exemplo, injeção subcutânea, o veículo pode incluir, por exemplo, água, solução salina, álcool, uma gordura, uma cera ou um tampão. Para administração oral, pode ser empregado qualquer um dos
25 veículos acima ou um veículo sólido, por exemplo, manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glicose, sacarose ou carbonato de magnésio. Microesferas biodegradáveis (por exemplo, polilactato poliglicolato) também podem ser usadas como
30 veículos.

Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas ou não farmacêuticas incluem um tampão (por exemplo, solução salina tamponada neutra, solução salina tamponada com fosfato etc.), um carboidrato (por exemplo, glicose, manose, sacarose, dextrana etc.), um antioxidante, um agente quelante (por exemplo, EDTA, glutathione etc.), um conservante, outro composto útil para ligação e/ou transporte de oxigênio, um ingrediente inativo (por exemplo, um estabilizante, um enchimento etc.), ou combinações de dois ou mais dos citados anteriormente. Em algumas modalidades, a composição é formulada como um liofilizado. As proteínas H-NOX também podem ser encapsuladas dentro de lipossomos ou nanopartículas com a utilização de tecnologia bem conhecida. Outras formulações exemplares que podem ser usadas para proteínas H-NOX são descritas, por exemplo, nas Patentes U.S. Nºs 6.974.795 e 6.432.918, que são aqui incorporadas por referência em suas totalidades, particularmente com relação às formulações de proteínas.

As composições aqui descritas podem ser administradas como parte de uma formulação de liberação sustentada (por exemplo, uma formulação como uma cápsula ou esponja que produz a liberação lenta do composto após administração). Essas formulações podem geralmente ser preparadas com a utilização de tecnologia bem conhecida, e administradas, por exemplo, por via oral, retal ou implantação subcutânea, ou por implantação no local-alvo desejado. Formulações de liberação sustentada podem conter uma proteína H-NOX dispersa em uma matriz de veículo e/ou contida dentro de um reservatório, circundada por uma membrana que controla a

taxa de liberação. Veículos para uso com estas formulações são biocompatíveis, e também podem ser biodegradáveis. Em algumas modalidades, a formulação fornece um nível relativamente constante de liberação de proteína H-NOX. A
5 quantidade de proteína H-NOX contida dentro de uma formulação de liberação sustentada depende do local de implantação, da taxa e da duração da liberação esperadas, e da natureza da condição a ser tratada ou evitada.

Em algumas modalidades, a composição farmacêutica
10 contém uma quantidade eficaz de uma proteína H-NOX do tipo selvagem ou mutante. O termo "quantidade eficaz" significa uma quantidade de uma ou mais proteínas aqui descritas que, em combinação com seus parâmetros de eficácia e toxicidade, deve ser eficaz em certa forma terapêutica com base no
15 conhecimento do profissional especialista. Como é do conhecimento da técnica, uma quantidade eficaz pode ser em uma ou mais doses. Como faz parte do contexto clínico, uma dosagem eficaz de uma composição farmacêutica pode ou não ser obtida em conjunto com outro fármaco, composto ou
20 composição farmacêutica. Dessa forma, uma quantidade eficaz pode ser considerada no contexto da administração de um ou mais agentes terapêuticos, e um único agente pode ser considerado para ser dado em uma quantidade eficaz se, em conjunto com um ou mais outros agentes, um resultado
25 desejável ou benéfico puder ser ou for obtido.

Uma dose exemplar de hemoglobina como substituto do sangue é de cerca de 10 mg a cerca de 5 gramas ou mais de hemoglobina extracelular por quilograma de peso corporal do paciente. Dessa forma, em algumas modalidades, uma
30 quantidade eficaz de uma proteína H-NOX para administração

a um ser humano é entre poucas gramas a até mais de cerca de 350 gramas. Outras doses exemplares de uma proteína H-NOX incluem cerca de 4,4, 5, 10 ou 13 g/dl (em que g/dl é a concentração da solução de proteína H-NOX, antes da infusão na circulação) em uma taxa de infusão apropriada como, por exemplo, cerca de 0,5 ml/min (veja, por exemplo, Winslow, R. Capítulo 12 em "Blood Substitutes"). Será observado que o teor da unidade de ingredientes ativos contido em uma dose individual de cada forma de dosagem não precisa, por si mesmo, constituir uma quantidade eficaz, na medida em que a quantidade eficaz necessária poderia ser obtida pelo efeito combinado de várias administrações. A seleção da quantidade de uma proteína H-NOX a ser incluída em uma composição farmacêutica depende da forma de dosagem utilizada, da condição tratada e do objetivo específico a ser obtido de acordo com a determinação daqueles habilitados na técnica.

Composições exemplares incluem proteínas H-NOX recombinantes projetadas geneticamente, que podem ser isoladas ou purificadas, que compreendem uma ou mais mutações que coletivamente transmitem ligação de ligante de O₂ ou NO alterada em relação à proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente, e operacional como um transportador de gás sanguíneo de mamífero fisiologicamente compatível. Por exemplo, as proteínas H-NOX mutantes aqui descritas.

A invenção também fornece substitutos do sangue que compreendem ou consistem basicamente em uma ou mais das proteínas H-NOX do tipo selvagem ou mutantes. Tampões e outros ingredientes adequados à formulação de substitutos

do sangue são conhecidos na técnica.

Para reduzir ou evitar uma resposta imune em indivíduos humanos que recebem a administração de uma composição farmacêutica, podem ser usadas proteínas H-NOX humanas (proteínas humanas do tipo selvagem ou proteínas humanas nas quais uma ou mais mutações foram introduzidas) ou outras proteínas H-NOX não antigênicas (por exemplo, proteínas H-NOX de mamíferos). Para reduzir ou eliminar a imunogenicidade de proteínas H-NOX derivadas de outras fontes não humanas, os aminoácidos em uma proteína H-NOX podem ser mutados para os aminoácidos correspondentes em uma H-NOX humana. Por exemplo, um ou mais aminoácidos na superfície da estrutura terciária de uma proteína H-NOX não humana podem ser mutados para o aminoácido correspondente em uma proteína H-NOX humana.

Aplicações terapêuticas das proteínas H-NOX

Qualquer uma das proteínas H-NOX do tipo selvagem ou mutantes (por exemplo, proteínas H-NOX isoladas ou purificadas) ou composições farmacêuticas aqui descritas podem ser usadas em aplicações terapêuticas. Proteínas H-NOX específicas podem ser selecionadas para estas aplicações com base na taxa de associação de O_2 , na taxa de dissociação de O_2 , na constante de dissociação para ligação de O_2 , na estabilidade ao NO, na reatividade ao NO, na taxa de auto-oxidação, no tempo de retenção plasmática desejado, ou qualquer combinação de dois ou mais dos citados anteriormente para a indicação específica tratada. As proteínas H-NOX podem ser usadas para o tratamento de doença cardiovascular, doença neurológica, hipóxia tumoral, perda sangüínea ou ferimentos. Por exemplo, uma proteína H-

NOX de ligação de O_2 pode ser usada na maioria das situações em que células sangüíneas vermelhas ou expansores plasmáticos são usados atualmente. Especificamente, a proteína H-NOX pode ser usada como substituto das células sangüíneas vermelhas para o tratamento de trauma (por exemplo, no campo de batalha, alívio em desastres ou acidentes), hemorragias, choque hemorrágico, cirurgia (por exemplo, cirurgia de aneurisma abdominal, cirurgia ortopédica como, por exemplo, cirurgia de substituição do quadril, ou qualquer outra cirurgia que produza grande perda sangüínea), hemodiluição, usos intensos de sangue (por exemplo, suplementação de autodoação), e qualquer outra situação na qual seja perdido um volume sangüíneo ou em que a capacidade de transporte de O_2 seja reduzida. Exemplos de aplicações no cuidado de ferimentos incluem o cuidado de feridas pós-irradiação (por exemplo, efeito do oxigênio hiperbárico), reparo pós-cirúrgico, reparo de úlcera diabética e feridas por queimadura.

Uma H-NOX de ligação de oxigênio também pode ser usada para aumentar temporariamente a liberação de O_2 durante ou após a pré-doação de sangue autólogo, antes do retorno do sangue autólogo ao indivíduo (por exemplo, uma substituição para o sangue que é removido durante procedimentos cirúrgicos nos quais o sangue do indivíduo é removido e salvo para re-infusão ao final da cirurgia ou durante sua recuperação). Em algumas modalidades, as proteínas H-NOX também funcionam como simples expansores de volume que fornecem pressão oncótica em função da presença da molécula grande da proteína H-NOX.

Como a distribuição na vasculatura de proteínas H-NOX

extracelulares não é limitada pelo tamanho das células sangüíneas vermelhas, as proteínas H-NOX da presente invenção podem ser usadas para libera O₂ às áreas nas quais as células sangüíneas vermelhas não podem penetrar. Essas

5 áreas podem incluir quaisquer áreas de tecidos que estejam localizadas abaixo de obstruções ao fluxo de células sangüíneas vermelhas como, por exemplo, áreas abaixo de um ou mais trombos, oclusões por células falciformes, oclusões arteriais, oclusões vasculares periféricas, balões de

10 angioplastia, instrumentos cirúrgicos, tecidos que sofrem de privação de oxigênio ou estejam hipóxicos, e semelhantes. Adicionalmente, todos os tipos de isquemia tecidual podem ser tratados com a utilização das proteínas H-NOX. Essas isquemias teciduais incluem, por exemplo,

15 isquemia peroperatória, acidente vascular cerebral, acidente vascular cerebral emergente, ataques isquêmicos transitórios, abalo e hibernação miocárdicos, angina aguda ou instável, angina emergente e infarto do miocárdio (por exemplo, infarto do miocárdio com elevação do segmento ST).

20 Outras indicações cardiovasculares exemplares que podem ser tratadas com o uso das proteínas H-NOX incluem cardioplegia e anemia falciforme. Indicações-alvo exemplares incluem condições de deficiência funcional de hemoglobina, por exemplo, quando um substituto do sangue ou transportador de

25 O₂ estiver indicado, incluindo perda sangüínea, hipóxia etc.

As proteínas H-NOX também podem ser usadas como um auxiliar na radioterapia ou quimioterapia para o tratamento de câncer. Em algumas modalidades, uma proteína H-NOX é

30 usada como um auxiliar da radioterapia em tumores sólidos

(por exemplo, indivíduos com prognóstico pré-metastático ruim) ou como um adjuvante da terapia com PDT em tumores de superfície (por exemplo, câncer de cólon, pulmão ou cutâneo, ou câncer em outra superfície ou localização acessível). As proteínas H-NOX podem ser usadas para o tratamento de anemia ao fornecerem capacidade de transporte de oxigênio adicional em um paciente que sofre de anemia. Indicações neurológicas exemplares incluem acidente vascular cerebral isquêmico, lesão cerebral traumática e lesão da medula espinhal. Os métodos e as composições são aplicáveis em situações agudas (fornecendo rapidamente oxigênio aos tecidos ou um local específico, por exemplo, infarto agudo do miocárdio, oxigenação tecidual aguda local ou sistêmica, ou transfusão sangüínea) e crônicas (por exemplo, recuperação pós-aguda de infarto cardíaco).

Em várias modalidades, a invenção apresenta um método de liberação de O_2 a um indivíduo (por exemplo, um mamífero, como um primata (por exemplo, um ser humano, um macaco, um gorila, um chipanzé, um lêmure etc.), um bovino, um eqüino, um suíno, um canino ou um felino) pela administração a um indivíduo que dela necessita de uma proteína H-NOX do tipo selvagem ou mutante em uma quantidade suficiente para liberar O_2 ao indivíduo. Em algumas modalidades, a invenção fornece métodos de transporte ou liberação de gás sangüíneo a um indivíduo como, por exemplo, um mamífero, que compreendem a etapa de liberação (por exemplo, por transfusão etc.) ao sangue do indivíduo (por exemplo, um mamífero) de uma ou mais das composições de H-NOX. Métodos para a liberação de transportadores de O_2 ao sangue ou aos tecidos (por

exemplo, sangue ou tecidos de mamíferos) são conhecidos na técnica. Em várias modalidades, a proteína H-NOX é uma apoproteína que é capaz de se ligar ao heme, ou é uma holoproteína com heme ligado. A proteína H-NOX pode ter ou
5 não heme ligado, antes da administração da proteína H-NOX ao indivíduo. Em algumas modalidades, O₂ é ligado à proteína H-NOX, antes de ser liberada ao indivíduo. Em outras modalidades, O₂ não está ligado à proteína H-NOX antes da administração da proteína ao indivíduo, e a
10 proteína H-NOX transporta O₂ de uma localização no indivíduo para outra localização no indivíduo.

Os métodos da presente invenção podem ser usados para o tratamento de qualquer indivíduo. Para uso nesta especificação, a menos que claramente indicado de forma
15 diferente, "um indivíduo", como aqui usado, significa um mamífero, incluindo, sem limitação, um primata (por exemplo, um ser humano, macaco, gorila, chimpanzé, lêmure etc.), um bovino, um eqüino, um suíno, um canino e um felino. Dessa forma, a invenção encontra utilidade tanto na
20 medicina humana quanto no contexto veterinário, incluindo uso em animais agrícolas e animais domésticos de estimação. O indivíduo pode ter sido diagnosticado, ser suspeito de ter ou está em risco de desenvolver uma indicação, por exemplo, uma doença cardiovascular, uma doença neurológica,
25 hipóxia (por exemplo, hipóxia tumoral), uma perda sangüínea ou um ferimento. O indivíduo pode exibir um ou mais sintomas associados à indicação. O indivíduo pode estar geneticamente ou de algum outro modo predisposto ao desenvolvimento desta condição.

30 Como aqui usado, o termo "que necessita deste" inclui

indivíduos que possuem uma condição ou doença (por exemplo, uma doença cardiovascular, uma doença neurológica, hipóxia, por exemplo, hipóxia tumoral, uma perda sangüínea ou um ferimento) ou estão "em risco" para a condição ou doença.

- 5 Como aqui usado, o termo um indivíduo "em risco" é um indivíduo que está em risco para o desenvolvimento de uma condição, por exemplo, uma doença cardiovascular, uma doença neurológica, hipóxia (por exemplo, hipóxia tumoral), uma perda sangüínea ou um ferimento. Um indivíduo "em
- 10 risco" pode ter ou não uma doença ou condição detectável, e pode ter ou não exibido doença detectável antes dos métodos de tratamento aqui descritos. "Em risco" representa que um indivíduo possui um ou mais dos denominados fatores de risco, que são parâmetros mensuráveis que estão
- 15 correlacionados com o desenvolvimento de uma doença ou condição, e são conhecidos na técnica. Um indivíduo que possui um ou mais desses fatores de risco possui uma probabilidade maior para o desenvolvimento da doença ou condição do que um indivíduo sem esses fatores de riscos.
- 20 Esses fatores de risco incluem, sem limitação, idade, sexo, raça, dieta, história de doença prévia, presença de doença precursora, fatores genéticos (ou seja, hereditários) considerações e exposição ambiental. Cirurgia, presença (ou proximidade) em uma zona militar ou de guerra, ou condições
- 25 que predispõe um indivíduo à perda sangüínea (por exemplo, hemofilia) são fatores de risco exemplares para perda sangüínea.

Esses métodos podem ser usados para tratar ou retardar qualquer condição para a qual a liberação de O₂ seja

30 benéfica. O termo "tratamento" ou "que trata" significa uma

abordagem para a obtenção de um resultado benéfico ou desejado, incluindo resultados clínicos. Para as finalidades dessa invenção, resultados benéficos ou desejados incluem, sem limitação, o alívio dos sintomas associados a uma condição (por exemplo, sem limitação, uma doença cardiovascular, uma doença neurológica, hipóxia, por exemplo, hipóxia tumoral, uma perda sangüínea ou um ferimento), diminuição da extensão dos sintomas associados a uma condição ou prevenção de uma piora dos sintomas associados a uma condição. Em algumas modalidades, o tratamento com uma ou mais proteínas aqui reveladas é acompanhado por ausência ou redução dos efeitos colaterais em relação aos que estão associados às terapias atualmente disponíveis.

15 Como aqui usado, o termo "retardo" do desenvolvimento de uma doença ou condição significa adiar, impedir, tornar mais lento, retardar, estabilizar e/ou postergar o desenvolvimento da doença ou condição, por exemplo, uma doença cardiovascular, uma doença neurológica, hipóxia (por exemplo, hipóxia tumoral), uma perda sangüínea ou um ferimento. Esse retardo pode ser de durações de tempo variáveis, dependendo da história da doença e/ou do indivíduo tratado. Como é evidente para aqueles habilitados na técnica, um retardo suficiente ou significativo pode, na verdade, englobar a prevenção, em que o indivíduo não desenvolve a doença ou condição. Por exemplo, o método pode reduzir a probabilidade do desenvolvimento da doença em certo intervalo de tempo e/ou reduzir a extensão da doença em certo intervalo de tempo, quando comparado com a não utilização do método. Em algumas modalidades, essas

comparações se baseiam em estudos clínicos com a utilização de um número estatisticamente significativo de indivíduos. O desenvolvimento da doença pode ser detectável com a utilização de técnicas clínicas padronizadas. O desenvolvimento também se refere à progressão da doença que pode ser inicialmente não detectável, e inclui ocorrência, recorrência e surgimento.

Espera-se que proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes com uma K_D para O_2 relativamente baixa (por exemplo, menos do que cerca de 80 nM ou menos do que cerca de 50 nM) sejam particularmente úteis para o tratamento de tecidos com baixa tensão de oxigênio (por exemplo, tumores, alguns ferimentos ou outras áreas nas quais a tensão de oxigênio seja muito baixa, por exemplo, uma $p50$ abaixo de 133,3 Pa). A alta afinidade destas proteínas H-NOX pelo O_2 pode aumentar a duração do tempo em que o O_2 permanece ligado à proteína H-NOX reduzindo, dessa forma, a quantidade de O_2 que é liberada antes da proteína H-NOX alcançar o tecido a ser tratado.

Embora sem a intenção de se prender a uma teoria específica, acredita-se que a utilidade de um substituto de células vermelhas sem células como líquido de ressuscitamento seja influenciada pela $p50$ do transportador de O_2 . Por exemplo, um transportador de O_2 PEGuilado baseado em hemoglobina denominado MP4 parece liberar O_2 mais eficientemente à microvasculatura do que alguns transportadores de O_2 baseados em hemoglobina com afinidade menor. Há relatos de que MP4 possui uma $p50$ de aproximadamente 666,6 Pa, (K_D de talvez 100 a 200 nm), e a $p50$ de hemoglobina sem estroma é de 1,67 kPa (K_D de

aproximadamente 400 nm). Como o MP4 é capaz de liberar oxigênio em tecidos (PO_2 de aproximadamente 666,6 Pa a 1,33 kPa), é provável que a afinidade por O_2 apropriada para que transportadores liberem O_2 aos tecidos hipóxicos é de menos
5 do que cerca de 666,6 Pa, e talvez menos do que cerca de 266,6 Pa, o que corresponde aproximadamente a uma K_D de menos do que cerca de 80 nm. Esses valores indicam que MP4 foi projetado com uma afinidade por O_2 maior ($p50$ menor) do que a hemoglobina nativa. Da perspectiva do equilíbrio,
10 isso sugere que proteínas de ligação de O_2 de alta afinidade podem ter mais sucesso na liberação de O_2 às áreas de tensão de O_2 baixa, por exemplo, a vasculatura periférica.

Em algumas modalidades, para a liberação direta de uma
15 proteína H-NOX com O_2 ligado a um local específico no corpo (por exemplo, um tecido, órgão, ferimento ou tumor), a k_{off} para O_2 é mais importante do que o valor de K_D , pois o O_2 já está ligado à proteína (o que torna o k_{on} menos importante), e o oxigênio precisa ser liberado em um local
20 específico (ou próximo a ele) no corpo (em uma taxa influenciada pela k_{off}). Em algumas modalidades, a k_{off} também pode ser importante quando as proteínas H-NOX estiverem na presença de células vermelhas na circulação, onde facilitam a difusão de O_2 das células vermelhas e,
25 talvez, prolonguem a habilidade de células vermelhas diluídas para o transporte de O_2 para pontos mais distantes na vasculatura.

Em algumas modalidades, para a liberação de uma proteína H-NOX que circula na corrente sanguínea de um
30 indivíduo, a proteína H-NOX se liga ao O_2 nos pulmões e

libera O_2 em um ou mais outros locais no corpo. Para algumas dessas aplicações, o valor de K_D é mais importante do que a k_{off} , na medida em que a ligação de O_2 está no equilíbrio ou próximo a ele. Em algumas modalidades, para hemodiluição extrema, a K_D é mais importante do que a k_{off} quando a proteína H-NOX for o transportador de O_2 primário, pois a proteína H-NOX irá se ligar e liberar O_2 continuamente à medida que ela passa ao longo da circulação. Como a hemoglobina possui uma $p50$ de 1,67 kPa, as células vermelhas (que atuam como capacitores) possuem uma $p50$ de aproximadamente 4,00 kPa, e foram desenvolvidos HBOCs com faixas entre 666,6 Pa e 12,0 kPa, a faixa de K_D ótima para proteínas H-NOX pode, portanto, ser entre aproximadamente 266,6 Pa a aproximadamente 13,3 kPa para algumas aplicações.

As proteínas H-NOX também podem ser usadas para exames de imagem. Em particular, imagens ópticas (por exemplo, tomografia de coerência óptica; veja, por exemplo, Villard, J.W. (2002), "Use of a Blood Substitute to Determine Instantaneous Murine Right Ventricular Thickening with Optical Coherence Tomography", *Circulation* 105: 1.843-1.849, que é incorporado por referência em sua totalidade, particularmente com relação à tomografia de coerência óptica) são ofuscadas por eritrócitos. A perfusão com uma solução de H-NOX permite imagens mais nítidas da circulação e das paredes dos vasos, pois a proteína H-NOX é bem menor do que os eritrócitos.

As proteínas H-NOX e as composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas a um indivíduo por qualquer meio convencional como, por exemplo, por

administração oral, tópica, intra-ocular, intratecal, intrapulmonar, intratraqueal, ou por aerossol; por adsorção transdérmica ou por membrana mucosa; ou por injeção (por exemplo, por injeção subcutânea, intravenosa, intra-
5 arterial, intravesicular ou intramuscular). As proteínas H-NOX também podem ser incluídas em soluções parenterais de grande volume para uso como substitutos do sangue. Em modalidades exemplares, a proteína H-NOX é administrada no sangue (por exemplo, administração a um vaso sangüíneo
10 como, por exemplo, uma veia, uma artéria ou um capilar), um ferimento, um tumor, um tecido hipóxico ou um órgão hipóxico do indivíduo.

Em algumas modalidades, é usada uma formulação de liberação contínua sustentada da composição. A
15 administração de uma proteína H-NOX pode ocorrer, por exemplo, por um período de segundos a horas, dependendo da finalidade da administração. Por exemplo, como um veículo de liberação de sangue, um período de tempo de administração exemplar é o mais rápido possível. Outros
20 períodos de tempo exemplares incluem cerca de 10, 20, 30, 40, 60, 90 ou 120 minutos. Taxas de infusão exemplares para soluções de H-NOX como substitutos do sangue são de cerca de 30 ml/hora a cerca de 13.260 ml/hora como, por exemplo, cerca de 100 ml/hora a cerca de 3.000 ml/hora. Uma dose
25 total exemplar de proteína H-NOX é de cerca de 900 mg/kg administrada ao longo de 20 minutos a 13.260 ml/hora. Uma dose total exemplar de proteína H-NOX para um suíno é de cerca de 18,9 gramas.

Freqüências de dosagem exemplares incluem, sem
30 limitação, pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 vezes (ou seja,

diariamente) por semana. Em algumas modalidades, uma proteína H-NOX é administrada pelo menos 2, 3, 4 ou 6 vezes ao dia. A proteína H-NOX pode ser administrada, por exemplo, ao longo de um período de poucos dias ou semanas.

5 Em algumas modalidades, a proteína H-NOX é administrada por um período mais longo como, por exemplo, poucos meses ou anos. A frequência de dosagem da composição pode ser ajustada ao longo do período do tratamento, com base na avaliação do médico responsável pela administração.

10 Como observado anteriormente, a seleção de quantidades de dosagem para as proteínas H-NOX depende da forma de dosagem utilizada, da frequência e do número de administrações, da condição tratada e da finalidade específica a ser obtida de acordo com a determinação
15 daqueles habilitados na técnica. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de uma proteína H-NOX para administração a seres humanos é entre poucas gramas a mais de 350 gramas.

Em algumas modalidades, duas ou mais proteínas H-NOX
20 diferentes são administradas simultânea, seqüencial ou concomitantemente. Em algumas modalidades, outro composto ou terapia útil para a liberação de O₂ é administrado simultânea, seqüencial ou concomitantemente à administração de uma ou mais proteínas H-NOX.

25 Outras aplicações terapêuticas exemplares para as quais as proteínas H-NOX podem ser usadas são descritas, por exemplo, nas Patentes U.S. Nºs 6.974.795 e 6.432.918, que são aqui incorporadas por referência em suas totalidades, particularmente com relação às aplicações
30 terapêuticas para transportadores de O₂.

Aplicações industriais das proteínas H-NOX

As proteínas H-NOX e composições aqui descritas também podem ser usadas para diversas aplicações *in vitro* ou industriais (veja, por exemplo, a Patente U.S. N° 6.455.676, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade, particularmente com relação às aplicações *in vitro* ou industriais). Proteínas H-NOX específicas podem ser selecionadas para essas aplicações com base na taxa de associação de O₂, na taxa de dissociação de O₂, na constante de dissociação para ligação de O₂, na estabilidade ao NO, na reatividade ao NO, na taxa de auto-oxidação, na meia-vida desejada, ou qualquer combinação de dois ou mais das citadas anteriormente para a aplicação específica. Em várias modalidades de aplicações industriais, a proteína H-NOX é uma apoproteína que é capaz de se ligar ao heme, ou é uma holoproteína com heme ligado.

As proteínas H-NOX podem ser usadas, por exemplo, como padrões de referência para uma instrumentação analítica que necessite desses padrões de referência. A liberação de O₂ pelas proteínas H-NOX pode ser usada para aumento do crescimento celular em culturas de células por manutenção ou aumento dos níveis de O₂ *in vitro*. Para essas aplicações, as proteínas H-NOX podem ser adicionadas a um meio de cultura de células para liberar O₂ ao meio (e às células no meio). Em algumas modalidades, o O₂ é ligado à proteína H-NOX, antes dela ser adicionada ao meio de cultura de células. Em outras modalidades, o O₂ não é ligado à proteína H-NOX antes de sua adição ao meio de cultura de células, e a proteína H-NOX transporta O₂ de uma localização no meio para outra localização no meio.

Alternativamente, as células podem ser modificadas geneticamente para codificar uma proteína H-NOX para aumentar a quantidade de O₂ obtida pelas células. Por exemplo, células que expressam um composto de interesse (por exemplo, uma pequena molécula ou proteína útil em aplicações farmacêuticas) podem ser modificadas geneticamente para também produzirem uma proteína H-NOX que facilite o crescimento das células, especialmente sob condições de O₂ reduzido (Sullivan e cols. (2006), "Targeted Oxygen Delivery within Hepatic Hollow Fiber Bioreactors via Supplementation of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers", *Biotechnol. Prog.* 22: 1.374-87; Frey e cols. (2001), "Dissection of Central Carbon Metabolism of Hemoglobin-Expressing *Escherichia Coli* by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Flux Distribution Analysis in Microaerobic Bioprocesses", *Applied and Environmental Biology* 67(2): 680-687). Além disso, as proteínas H-NOX podem ser usadas para remover O₂ de soluções que necessitem da remoção de O₂.

Kits com proteínas H-NOX

Também são fornecidos artigos manufaturados e kits que incluem qualquer uma das proteínas H-NOX aqui descritas e uma embalagem adequada. Em algumas modalidades, a invenção inclui um kit com: (i) uma proteína H-NOX (por exemplo, uma proteína H-NOX do tipo selvagem ou mutante aqui descrita, ou formulações desta, como aqui descritas) e (ii) instruções para utilização do kit para a liberação de O₂ a um indivíduo. Em várias modalidades, a invenção apresenta um kit com: (i) uma proteína H-NOX (por exemplo, uma proteína H-NOX do tipo selvagem ou mutante aqui descrita,

ou formulações desta, como aqui descritas) e (ii) instruções para utilização do kit para qualquer um dos usos industriais aqui descritos (por exemplo, o uso de uma proteína H-NOX como padrão de referência para 5 instrumentação analítica que necessita deste padrão de referência, aumento do crescimento celular em cultura de células por manutenção ou aumento dos níveis de O_2 *in vitro*, adição de O_2 a uma solução ou remoção de O_2 de uma solução).

10 Embalagens adequadas às composições aqui descritas são conhecidas na técnica, e incluem, por exemplo, frascos (por exemplo, frascos lacrados), vasos, ampolas, garrafas, jarras, embalagens flexíveis (por exemplo, bolsas Mylar ou plásticas), e semelhantes. Esses artigos manufaturados 15 podem ainda ser esterilizados e/ou lacrados. Também são fornecidas formas de dosagem unitária que compreendem as composições aqui descritas. Essas formas de dosagem unitária podem ser armazenadas em uma embalagem adequada em dosagens unitárias únicas ou múltiplas, e também podem 20 ainda ser esterilizadas e lacradas. As instruções fornecidas nos kits da invenção são tipicamente instruções escritas em um rótulo ou bula (por exemplo, uma folha de papel incluída no kit), mas instruções que possam ser lidas por máquinas (por exemplo, instruções fornecidas em um 25 disco de armazenamento magnético ou óptico) também são aceitáveis. As instruções relacionadas ao uso de proteínas H-NOX geralmente incluem informações sobre a dosagem, esquema de dosagem e via de administração para o tratamento ou uso industrial desejado. O kit pode ainda compreender 30 uma descrição da seleção de um indivíduo adequado ou

tratamento.

Os recipientes podem ser doses unitárias, embalagens a granel (por exemplo, embalagens multidoses) ou doses subunitárias. Por exemplo, também podem ser fornecidos kits
5 que contêm dosagens suficientes de proteínas H-NOX aqui reveladas para fornecer tratamento eficaz para um indivíduo por um período de tempo prolongado como, por exemplo, cerca de uma semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8
10 meses, 9 meses, ou mais. Os kits também podem incluir doses unitárias múltiplas de proteínas H-NOX e instruções para uso, e embaladas em quantidades suficientes para armazenamento e uso em farmácias, por exemplo, farmácias hospitalares e farmácias de manipulação. Em algumas
15 modalidades, o kit inclui uma composição seca (por exemplo, liofilizada) que pode ser reconstituída, re-suspensa ou re-hidratada para formar geralmente uma suspensão aquosa estável de proteína H-NOX.

Métodos exemplares para a produção de proteínas H-NOX

20 A presente invenção também fornece métodos para a produção de qualquer uma das proteínas H-NOX mutantes aqui descritas. Em algumas modalidades, o método envolve o cultivo de uma célula que possui um ácido nucléico que codifica uma proteína H-NOX mutante sob condições adequadas
25 à produção da proteína H-NOX mutante. Em várias modalidades, a H-NOX mutante também é purificada (por exemplo, purificação da proteína H-NOX das células ou do meio de cultura).

Como observado anteriormente, as seqüências de várias
30 proteínas H-NOX do tipo selvagem e de ácidos nucléicos são

conhecidas e podem ser utilizadas para a geração de proteínas H-NOX mutantes e ácidos nucleicos da presente invenção. Técnicas para a mutação, expressão e purificação de proteínas H-NOX recombinantes foram descritas, por exemplo, por Boon, E.M. e cols. (2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chemical Biology* 1: 53-59 e Karow, D.S. e cols. (10 de agosto de 2004), "Spectroscopic Characterization of The Soluble Guanylate Cyclase-Like Herne Domains From *Vibrio Cholerae* And *Thermoanaerobacter Tengcongensis*", *Biochemistry* 43(31): 10.203-10.211, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade, particularmente com relação à mutação, expressão e purificação de proteínas H-NOX recombinantes. Essas técnicas ou outras técnicas padronizadas podem ser usadas para a geração de proteína H-NOX mutante.

Em particular, as proteínas H-NOX mutantes aqui descritas podem ser geradas por diversos métodos que são conhecidos na técnica. A mutação pode ocorrer no nível de aminoácido por modificação química de um aminoácido ou no nível de códon por alteração da sequência de nucleotídeos que codifica certo aminoácido. A substituição de um aminoácido em certa posição em uma proteína pode ser obtida por alteração do códon que codifica aquele aminoácido. Isso pode ser obtido por mutagênese sítio-dirigida, por exemplo: (i) a técnica de Amersham (kit de mutagênese Amersham, Amersham, Inc., Cníveland, Ohio) com base nos métodos de Taylor, J.W. e cols. (20 de dezembro de 1985), "The Use of Phosphorothioate-Modified DNA in Restriction Enzyme Reactions to Prepare Nicked DNA", *Nucleic Acids Res.*

13(24): 8.749-8.764; Taylor, J.W. e cols. (20 de dezembro de 1985), "The Rapid Generation of Oligonucleotide-Directed Mutations at High Frequency Using Phosphorothioate-Modified DNA", *Nucleic Acids Res.* 13(24): 8.765-8.785; Nakamaye, K.L. e cols. (22 de dezembro de 1986), "Inhibition of Restriction Endonuclease Nci I Cleavage by Phosphorothioate Groups and its Application to Oligonucleotide-Directed Mutagenesis", *Nucleic Acids Res.* 14(24): 9.679-9.698; e Dente e cols. (1985), em "DNA Cloning", Glover, Ed., IRL Press, páginas 791-802, (ii) o kit Promega (Promega Inc., Madison, Wis.), ou (iii) o kit Biorad (Biorad Inc., Richmond, Calif.), com base nos métodos de Kunkel, T.A. (janeiro de 1985), "Rapid And Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(2): 488-492; Kunkel, T.A. (1987), "Rapid And Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection", *Methods Enzymol.* 154: 367-382; Kunkel, Patente U.S. N° 4.873.192, que são aqui incorporados por referência em suas totalidades, particularmente com relação à mutagênese de proteínas. A mutagênese também pode ser obtida por outros meios comercialmente disponíveis ou não-comerciais, por exemplo, aqueles que utilizam mutagênese sítio-dirigido com oligonucleotídeos mutantes.

A mutagênese sítio-dirigido também pode ser obtida com o uso de mutagênese baseada em PCR, por exemplo, aquela descrita em Zhengbin e cols. (1992), páginas 205-207 em "PCR Methods and Applications", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York; Jones, D.H. e cols. (fevereiro 1990), "A Rapid Method For Site-Specific Mutagenesis And Directional Subcloning by Using the Polymerase Chain

Reaction to Generate Recombinant Circles", *Biotechniques* 8(2): 178-183; Jones, D. Fl. e cols. (janeiro 1991), "A Rapid Method For Recombination And Site-Specific Mutagenesis by Placing Homologous Ends on DNA Using
5 Polymerase Chain Reaction", *Biotechniques* 10(1): 62-66, que são aqui incorporadas por referência em suas totalidades, particularmente com relação à mutagênese de proteínas. A mutagênese sítio-dirigida também pode ser obtida com o uso de mutagênese por cassete com técnicas que são conhecidas
10 por aqueles habilitados na técnica.

Um ácido nucléico de H-NOX mutante pode ser incorporado em um vetor, por exemplo, um vetor de expressão, com o uso de técnicas padronizadas. Por exemplo, podem ser usadas enzimas de restrição para clivar o ácido
15 nucléico de H-NOX mutante e o vetor. A seguir, as extremidades compatíveis do ácido nucléico clivado de H-NOX mutante e o vetor clivado podem ser ligados. O vetor resultante pode ser inserido em uma célula (por exemplo, uma célula de inseto, uma célula de planta, uma célula de
20 levedura ou uma célula bacteriana) com o uso de técnicas padronizadas (por exemplo, eletroporação) para expressão da proteína H-NOX codificada.

Em particular, foram expressas proteínas heterólogas em diversos sistemas de expressão biológicos, por exemplo,
25 células de inseto, células de planta, células de levedura e células bacterianas. Dessa forma, qualquer sistema de expressão biológico de proteína adequado pode ser utilizado para a produção de grandes quantidades de proteína H-NOX recombinante. Em algumas modalidades, a proteína H-NOX (por
30 exemplo, uma proteína H-NOX mutante ou do tipo selvagem) é

uma proteína isolada. Como aqui usado, uma "proteína isolada" significa uma proteína separada de um ou mais componentes com os quais a proteína está naturalmente associada na natureza, incluindo, por exemplo, ácidos
5 nucleicos, lipídeos e outras proteínas. Uma proteína isolada também não ocorre em uma biblioteca de proteínas, por exemplo, uma biblioteca de 2, 5, 10, 20, 50 ou mais proteínas diferentes. Uma proteína isolada pode ser obtida, por exemplo, por expressão de um ácido nucleico
10 recombinante que codifica a proteína ou por síntese química da proteína.

Se desejado, as proteínas H-NOX podem ser purificadas com o uso de técnicas padronizadas. Como aqui usado, o termo "proteína purificada" significa uma proteína (por
15 exemplo, uma proteína H-NOX mutante ou do tipo selvagem) que foi separada de um ou mais componentes que estão presentes quando a proteína é produzida. Em algumas modalidades, a proteína é pelo menos cerca de 60%, por peso, livre de outros componentes que estão presentes
20 quando a proteína é produzida. Em várias modalidades, a proteína é pelo menos cerca de 75%, 90% ou 99%, por peso, pura. Uma proteína purificada pode ser obtida, por exemplo, por purificação (por exemplo, extração) de uma fonte natural, de um sistema de expressão recombinante ou de uma
25 mistura de reação para síntese química. Métodos de purificação exemplares incluem imunoprecipitação, cromatografia em coluna, por exemplo, cromatografia por imunoafinidade, purificação por imunoafinidade com glóbulo magnético e cozimento com um anticorpo ligado à placa, além
30 de outras técnicas conhecidas por aqueles habilitados na

técnica. A pureza pode ser avaliada por qualquer método apropriado, por exemplo, por cromatografia em coluna, eletroforese em gel de poliacrilamida ou análise por HPLC. Em algumas modalidades, a proteína purificada é incorporada em uma composição farmacêutica da invenção ou usada em um método da invenção. A composição farmacêutica da invenção pode ter aditivos, veículos ou outros componentes, além da proteína purificada.

EXEMPLOS

Os exemplos, que têm a intenção de serem puramente exemplares da invenção e, portanto, não devem ser considerados como limitantes da invenção de forma alguma, também descrevem e detalham aspectos e modalidades da invenção discutidos acima. Os exemplos não visam representar que os experimentos abaixo são todos ou os únicos experimentos realizados. A menos que indicado de forma diferente, a temperatura está em graus Centígrados e a pressão está na pressão atmosférica ou próxima a ela.

Exemplo 1: Produção de proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes

As proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes foram produzidas, expressas e purificadas com a utilização de métodos padronizados, basicamente como descrito por Boon, E.M. e cols. (2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chemical Biology* 1: 53-59 e Karow, D.S. e cols. (10 de agosto de 2004), "Spectroscopic Characterization of The Soluble Guanylate Cyclase-Like Heme Domains From *Vibrio Cholerae* And *Thermoanaerobacter Tengcongensis*", *Biochemistry* 43(31): 10.203-10.211, ambos aqui incorporados por referência em

suas totalidades, particularmente com relação à mutagênese, expressão e purificação de proteínas H-NOX. A mutagênese foi efetuada com a utilização do protocolo QuickChange® de Strategene (La Jolla, CA). A expressão das proteínas em
 5 cultura de células e a purificação subsequente das proteínas foram realizadas como descrito por Karow, D. S. e cols. (10 de agosto de 2004), "Spectroscopic Characterization of The Soluble Guanylate Cyclase-Like Heme Domains From *Vibrio Cholerae* And *Thermoanaerobacter*
 10 *Tengcongensis*", *Biochemistry* 43(31): 10.203-10.211.

Exemplo 2: Caracterização de proteínas H-NOX mutantes como veículos de liberação de oxigênio

K_D cinética: proporção de k_{off} para k_{on}

O valor da K_D cinética foi determinado para as
 15 proteínas H-NOX do tipo selvagem e mutantes basicamente como descrito por Boon, E.M. e cols. (2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chemical Biology* 1: 53-59, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade, particularmente com
 20 relação à medida das taxas de associação de O_2 , das taxas de dissociação de O_2 , das constantes de dissociação para a ligação de O_2 , das taxas de auto-oxidação e das taxas de dissociação de NO.

k_{on} (taxa de associação de O_2)

25 A associação de O_2 ao heme foi medida com o uso de fotólise instantânea a 20°C. Não foi possível vaporizar o complexo de $Fe^{II}-O_2$ em consequência da cinética de recombinação geminada muito rápida; dessa forma, o complexo de $Fe^{II}-O_2$ foi submetido à fotólise instantânea com luz de
 30 laser a 560 nm (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), produzindo

o intermediário de Fe^{II} de 5 coordenadas, do qual a ligação de O_2 molecular foi seguida em vários comprimentos de onda. As amostras de proteína foram feitas por redução anaeróbica com 10 mM ditionita, seguida por dessalinização em uma
5 coluna PD-10 (Millipore, Inc., Billerica, MA). As amostras foram então diluídas até 20 μM de heme em tampão de 50 mM de TEA, 50 mM de NaCl, pH 7,5, em um cadinho de quartzo com atmosfera controlada, com um tamanho de 100 μl até 1 ml, e um comprimento de trajeto de 1 cm. O gás CO foi fluído
10 sobre o *headspace* desse cadinho por 10 minutos para formar o complexo de Fe^{II} -CO, cuja formação foi verificada por espectroscopia de UV visível (Soret máximo de 423 nm). Essa amostra ou foi usada para medir a cinética da re-ligação de CO após fotólise instantânea, enquanto ainda sob 1
15 atmosfera de gás CO, ou foi aberta e agitada no ar por 30 minutos para oxigenar completamente o tampão, antes da fotólise instantânea para observar os eventos de re-ligação de O_2 . A associação de O_2 ao heme foi monitorada em vários comprimentos de onda versus tempo. Esses traços foram
20 ajustados com uma exponencial única com o uso do software Igor Pro (Wavemetrics, Inc., Oswego, OR; última versão - 2005). Essa taxa era independente do comprimento de onda de observação, mas dependente da concentração de O_2 . A espectroscopia de UV visível foi usada ao longo do
25 experimento para confirmar todos os complexos e intermediários (Cary 3K, Varian, Inc. Palo Alto, CA). Os dados da adsorção transitória foram coletados com o uso de instrumentos descritos em Dmochowski, I.J. e cols. (31 de agosto de 2000), "Enantiomeric Discrimination of Ru-
30 Substrates by Cytochrome P450cam", *J. Inorg. Biochem.*

81(3): 221-228, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade, particularmente com relação à instrumentação. O instrumento possui um tempo de resposta de 20 ns, e os dados são digitalizados a 200 mega-amstras
 5 s⁻¹.

k_{off} (taxa de dissociação de O₂)

Para medir a k_{off} , complexos de Fe^{II}-O₂-proteína (5 µM de heme), diluídos em tampão anaeróbico de 50 mM de TEA, 50 mM de NaCl, pH 7,5, foram misturados rapidamente com um
 10 volume igual do mesmo tampão (anaeróbico) contendo várias concentrações de ditionita e/ou gás CO saturante. Os dados foram adquiridos em um espectrofotômetro de fluxo interrompido HI-TECH Scientific SF-61 equipado com um banho Neslab RTE-100 em temperatura constante ajustado em 20°C
 15 (TGH Scientific LTD., Bradford On Avon, Reino Unido). A dissociação de O₂ do heme foi monitorada como um aumento na absorvência a 437 nm, um máximo no espectro de diferença de Fe^{II}-Fe^{II}-O₂, ou 425 nm, um máximo no espectro de diferença de Fe^{II}-Fe^{II}-CO. Os traços finais foram ajustados para uma
 20 exponencial única com o uso do software que é parte do instrumento. Cada experimento foi feito um mínimo de seis vezes, e foram calculadas as médias das taxas resultantes. As taxas de dissociação medidas são independentes da concentração de ditionita (100, 50, 25, 10, 5 e 2,5 mM de
 25 ditionita foram testadas) e independentes do CO saturante como um cerco para a espécie reduzida, com e sem a presença de 10 mM de ditionita.

K_D cinética

A K_D cinética é determinada pelo cálculo da proporção
 30 de k_{off} para k_{on} com a utilização das medidas de k_{off} e k_{on}

descritas acima.

K_D calculada

Para medir a K_D calculada, os valores para a k_{off} e K_D cinética que foram obtidos como descritos acima foram colocados em um gráfico. Um relacionamento linear entre k_{off} e a K_D cinética foi definido pela equação ($y = mx + b$). Os valores de k_{off} foram então interpolados ao longo da linha, para derivar a K_D calculada usando Excel: MAC 2004 (Microsoft, Redmond, WA). Na ausência de uma k_{on} medida, essa interpolação fornece uma forma para relacionar k_{off} à K_D.

Taxa de auto-oxidação

Para medir a taxa de auto-oxidação, as amostras de proteína foram reduzidas anaerobicamente, depois diluídas até 5 µM de heme em tampão aeróbico de 50 mM de TEA, 50 mM de NaCl, pH 7.5. Essas amostras foram então incubadas em um espectrofotômetro Cary 3E equipado com um banho Neslab RTE-100 em temperatura constante ajustado em 37°C, e rastreadas periodicamente (Cary 3E, Varian, Inc., Palo Alto, CA). A taxa de auto-oxidação foi determinada pela diferença entre o máximo e mínimo no espectro de diferença Fe^{II}-Fe^{II} plotado versus tempo, e ajustada com uma exponencial única usando Excel: MAC 2004 (Microsoft, Redmond, WA).

Taxa de reação com NO

A reatividade ao NO foi medida com o uso das proteínas purificadas (Tt WT H-NOX, Tt Y140H H-NOX e hemoglobina de *Homo sapiens* (Hs Hb)) preparadas a 2 µM em tampão A, e o NO foi preparado a 200 µM em Tampão A (Tampão A: 50 mM de Hepes, pH 7.5, 50 mM de NaCl). Os dados foram adquiridos em um espectrofotômetro de fluxo interrompido HI-TECH

Scientific SF-61 equipado com um banho Neslab RTE-100 em temperatura constante a 20°C (TGK Scientific LTD., Bradford On Avon, Reino Unido). A proteína foi misturada rapidamente com NO em uma proporção de 1:1 com um tempo de integração
5 de 0,00125 segundo. Os comprimentos de onda de mudança máxima foram ajustados até uma exponencial única com o uso do software que é parte do espectrômetro, medindo-se basicamente a etapa de taxa limitante da oxidação por NO. Os produtos finais da reação foram férrico-NO para as
10 proteínas H-NOX e férrico-água para Hs Hb.

Medidas da p50

Se desejado, o valor de p50 para proteínas H-NOX mutante ou do tipo selvagem pode ser medido como descrito por Guarnone, R. e cols. (setembro/outubro de 1995),
15 "Performance Characteristics of Hemox-Analyzer For Assessment of The Hemoglobin Dissociation Curve", *Haematologica* S0(5): 426-430, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade, particularmente com relação à medida de valores de p50. O valor de p50 é determinado com
20 o uso de um analisador HemOx. A câmara de medida começa a 0% de oxigênio e é lentamente elevada, de forma incremental, em direção a 100% de oxigênio. Uma sonda de oxigênio na câmara mede o % de saturação de oxigênio. Uma segunda sonda (luz UV-Vis) mede dois comprimentos de onda
25 de adsorção, ajustados para os espectros UV-Vis dos picos alfa e beta da hemoproteína (por exemplo, uma proteína como H-NOX em complexo com heme). Esses picos de adsorção aumentam linearmente à medida que a hemoproteína se liga ao oxigênio. A mudança percentual de não ligado a 100% ligado
30 é então plotada contra os valores do % de oxigênio para

gerar uma curva. A p50 é o ponto na curva onde 50% da hemoproteína estão ligados ao oxigênio.

Especificamente, o Analisador Hemox (TCS Scientific Corporation, New Hope, PA) determina a curva de dissociação de oxi-hemoproteína (ODC) por exposição de 50 µl de sangue ou hemoproteína a uma pressão parcial crescente de oxigênio e sua desoxigenação com gás nitrogênio. Um eletrodo de oxigênio Clark detecta a mudança da tensão de oxigênio, que é registrada no eixo x de um gravador x-y. O aumento resultante na fração de oxi-hemoproteína é simultaneamente monitorado por espectrofotometria de comprimento de onda duplo a 560 nm e 576 nm, e exibida no eixo y. São coletadas amostras de sangue da veia medial do antebraço, anticoaguladas com heparina e mantidas a 4°C em gelo úmido até o ensaio. Cinquenta µl de sangue total são diluídos em 5 µl de solução Hemox, um tampão fornecido pelo fabricante que mantém o pH da solução em um valor de $7,4 \pm 0,01$. A amostra-tampão é aspirada para um cadinho que é parte do analisador Hemox, e a temperatura da mistura é equilibrada e elevada até 37°C; a amostra é então oxigenada até 100% com ar. Após ajuste do valor de pO_2 , a amostra é desoxigenada com nitrogênio; durante o processo de desoxigenação, a curva é registrada em um papel de gráfico. O valor de P50 é extrapolado no eixo x como o ponto no qual a saturação de O_2 é de 50% com o uso do software que é parte do analisador Hemox. O tempo necessário para um registro completo é de aproximadamente 30 minutos.

Os valores de p50 para qualquer uma das proteínas H-NOX podem ser comparados com aqueles da hemoglobina como uma indicação da afinidade relativa da proteína H-NOX por

O₂, comparados com aquele da hemoglobina. A Tabela 13 lista os valores de p50 relatados previamente para hemoglobina.

Tabela 13. Variantes de hemoglobina e suas afinidades registradas por oxigênio

| Nome | Modificação | K _D (nM) | p50 (133,3 Pa) | Referência/ fabricante |
|-------------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|---------------------------|
| Hemoglobina (sem estroma) | | ~400 | 14 | |
| Hemoglobina (RBC's) | | | 27 | |
| <i>Hemopure</i> (HBOC-201) | Polimerizada bovina | | 36 | Biopure |
| Oxiglobina (14130C- 301 | Polimerizada bovina | | 54 | Biopure |
| <i>Hemospan</i> (MP4) | Maleimida- PEG | | 5 | Sangart |
| <i>PoliHEME</i> | Piridoxal | | 28-30 | Northfield Labs |
| <i>Hemolink</i> | O-rafinoase | | 40 | Hemosol |
| <i>Hemassist</i> | Diaspirin | | 32 | Baxter |

5 Medidas da viscosidade

Se desejado, a viscosidade das soluções de H-NOX pode ser medida com o uso de um reômetro de cone/placa (modelo DV-III, Brookfield; Middleboro, MA) com o fuso cone CPE-40 em uma taxa de cisalhamento de 200/s. As soluções com viscosidades entre 1 e 4 centipoise (cP) administradas em experimentos de liberação de oxigênio em hemodiluição são relatadas como seguras (Winslow, R.M. e cols. (outubro de 2004), "Comparison of PEG-Modified Albumin And Hemoglobin in Extreme Hemodilution in the Rat", *J. Appl Physiol.*

97(4): 1.527-1.534, Patentes U.S. Nºs 6.974.795 e 6.432.918, que são aqui incorporados por referência em suas totalidades, particularmente com relação à medida de viscosidade). Conseqüentemente, em algumas modalidades, a viscosidade da solução de proteína H-NOX é entre 1 e 4 cP.

Medidas da pressão oncótica coloidal

Se desejado, a pressão oncótica coloidal pode ser medida usando um osmômetro colóide de acordo com as instruções do fabricante (modelo 4420, Wescor; Logan, UT).

Métodos exemplares para medir a pressão oncótica coloidal são descritos em Vandegriff, K.D. e cols. (novembro de 1997), "Colloid Osmotic Properties of Modified Hemoglobins: Chemically Cross-Linked Versus Polyethylene Glycol Surface-Conjugated", *Biophys. Chem.* 69(1): 23-30, em uma página na Internet "anaesthesiamcq.com/FluidBook/fl12_4.php"; Patentes U.S. Nºs 6.974.795 e 6.432.918, que são aqui incorporados por referência em suas totalidades, particularmente com relação à medida da pressão oncótica coloidal. Soluções com pressão oncótica coloidal entre 2,67 e 6,67 kPa administradas em experimentos de liberação de oxigênio em hemodiluição são relatadas como seguras (Winslow, R. M. e cols. (outubro de 2004), "Comparison of PEG-Modified Albumin And Hemoglobin in Extreme Hemodilution in the Rat", *J. Appl. Physiol.* 97(4): 1.527-1.534). Conseqüentemente, em algumas modalidades, a pressão oncótica coloidal da solução de proteína H-NOX é entre 2,67 e 6,67 kPa.

Exemplo 3: Modelo de cirurgia para mutantes H-NOX transportadores de O₂: comparação de um painel de mutantes H-NOX transportadores de O₂ e H-NOX em hemodiluição extrema no rato.

Para avaliar a habilidade de mutantes de H-NOX para transportar O₂ em um modelo de cirurgia, pode ser realizada uma adaptação de um protocolo estabelecido (Winslow, R.M. e cols. (outubro 2004), "Comparison of PEG-Modified Albumin
5 And Hemoglobin in Extreme Hemodilution in the Rat", *J. Appl. Physiol.* 97(4): 1.527-1.534, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade, particularmente com relação aos modelos de cirurgia) com o uso de transfusão por troca contínua no rato.

10 Machos de ratos Sprague-Dawley aclimatados são anestesiados por injeção intramuscular de um coquetel de roedor contendo uma mistura de quetamina (40 mg/kg), acepromazina (0,75 mg/kg) e xilazina (3 mg/kg). Cateteres feitos de tubos de polietileno (Clay Adams PE-50 e PE-10)
15 são implantados em ambas as artérias femorais e em uma veia femoral. Os cateteres são externalizados na base da cauda e cobertos por uma bainha da cauda para proteção e acesso futuro. Após fechamento das feridas cirúrgicas, os animais retornam às suas gaiolas e é permitido que acordem e se
20 recuperem por 24 horas, antes do início do experimento. Os animais possuem livre acesso a alimento e água durante a recuperação. Para as medidas hemodinâmicas, o cateter da artéria femoral é conectado por meio de uma válvula reguladora e uma agulha de 23 gauge até um transdutor de
25 pressão, e a pressão arterial é medida continuamente a 100 Hz.

O pH, a PCO₂ e a PO₂ arteriais são medidos em um analisador de gasometria modelo Bayer 248 com o uso de amostras heparinizadas de sangue de 100 µl. O ácido lático
30 é medido no sangue da artéria femoral com o uso de um

analisador de lactato YSI (Yellow Springs Institute, Yellow Springs, OH). O CO_2 total, o bicarbonato padronizado (HCO) e o excesso de base (BE) são calculados a partir da PCO_2 , pH e concentração de Hb.

5 Animais totalmente conscientes ($n = 5$ para cada grupo de tratamento) são colocados em dispositivos de contenção de Plexiglas. As cânulas arteriais e venosas são enxaguadas com 200 e 100 μl , respectivamente, de solução salina heparinizada (100 U/ml). Os cateteres arteriais e venosos
10 são conectados a uma bomba de infusão (Labconco modelo 4262000, Kansas City, MO), e a transfusão por troca é efetuada em uma taxa de 0,5 ml/min por 100 minutos. Dessa forma, o volume total de solução trocada é de 50 ml ou 2,5 volumes sanguíneos. A bomba peristáltica é operada de tal
15 forma que o sangue seja removido exatamente na mesma taxa em que o material de teste é infundido. As soluções de teste são aquecidas até 37°C em um banho-maria, antes da infusão, e mantidas aquecidas durante a infusão por uma placa de aquecimento. Ao final do período de troca de 100
20 minutos, os animais que sobrevivem são monitorados por mais 70 minutos, antes de serem submetidos à eutanásia. Amostras de sangue (0,3 ml) são coletadas a cada 10 minutos para análise hematológica e gasometria.

Os grupos de tratamento incluem animais que recebem a
25 administração de uma ou mais proteínas H-NOX que haviam sido testadas previamente quanto às constantes de dissociação de NO ou O_2 , reatividade ao NO, estabilidade, compatibilidade fisiológica ou combinações of dois ou mais das citadas anteriormente. Os grupos com as células
30 sanguíneas vermelhas tratadas com H-NOX e *pentastarch*

fornecem controles positivos e negativos, respectivamente.

Os resultados finais objetivos incluem sobrevida e o surgimento de metabolismo anaeróbico, sinalizado por desarranjo ácido-básico e acúmulo de ácido lático. As proteínas H-NOX que aumentam a taxa de sobrevida (por exemplo, que produzem um aumento estatisticamente significativo da taxa de sobrevida) comparadas com a do grupo de controle são úteis para a oxigenação de tecidos em hemodiluição extrema. Espera-se que estas proteínas H-NOX também sejam úteis para o tratamento de outras indicações para as quais a liberação de O₂ é benéfica.

Exemplo 4: Modelo de trauma para mutantes de H-NOX transportadores de O₂: comparação dos efeitos de mutantes de H-NOX transportadores de O₂ e soluções de hemoglobina recombinante sobre a pressão sangüínea, o fluxo sangüíneo intestinal e a oxigenação do intestino em um modelo em rato de choque hemorrágico.

Par avaliar a habilidade das proteínas H-NOX para transportar O₂ em um modelo de trauma, pode ser realizada uma adaptação de um protocolo estabelecido (Raat, N.J. e cols. (janeiro de 2005), "Effects of Recombinant-Hemoglobin Solutions rHb2.0 and rHb1.1 on Blood Pressure, Intestinal Blood Flow, And Gut Oxygenation in a Rat Model of Hemorrhagic Shock", *Lab. Clin. Med.* 145(1): 21-32, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade, particularmente com relação aos modelos animais de trauma) em um modelo em rato de pressão fixa (5,33 kPa) de choque hemorrágico e ressuscitamento.

Ratos Wistar são anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de 90 mg/kg de quetamina,

0,5 mg/kg de medetomidina e 0,005 mg/kg de sulfato de atropina. A temperatura corporal de cada rato é mantida entre 36,5°C e 37,5°C com o uso de uma placa de aquecimento termocontrolada por uma sonda de temperatura colocada no
5 reto do rato. Além disso, a perda de calor é compensada com o uso de uma lâmpada de aquecimento de cerâmica posicionada 40 a 50 cm acima do rato. Para ventilação mecânica, é realizada uma traqueotomia, e um comprimento de 3,5 cm de um tubo de cloreto de polivinila 6F é colocado 0,5 cm na
10 traquéia do rato e fixado com uma sutura. Um ventilador infantil modificado é usado para ventilar o animal. Para minimizar a perda de líquido ventilatória, um filtro de umidade é colocado antes do tubo de ventilação. Uma saída lateral desse filtro é usada para monitorar o CO₂ do
15 período final com o uso de um capnógrafo. Os parâmetros de ventilação como, por exemplo, fase inspiratória (0,25–0,35) e frequência respiratória (50-75 respirações/min), são ajustados para manter os valores da PCO₂ arterial entre 35 e 45 mm Hg durante a cirurgia, verificados coletando-se
20 uma amostra de sangue de base. Não foi feito nenhum ajuste adicional até o final do experimento.

Os vasos são sondados com o uso de um cateter venoso de polietileno de 0,5 x 0,9 mm. Os cateteres são preenchidos com solução de NaCl 0,9% com 25 IU de heparina.
25 O cateter da artéria carótida direita é encurtado até 20 cm e ajustado a um transdutor de pressão para monitoramento contínuo da arterial pressão média (MAP) e da frequência cardíaca. A MAP é calculada com o uso dessa fórmula:
(pressão arterial sistólica - pressão arterial
30 diastólica)/3 + pressão arterial diastólica. Além disso, a

veia jugular é sondada para aporte de líquidos com 15 ml/kg/h de lactato de Ringer e 5 ml/kg/h de anestesia de manutenção (50 mg/kg/h de quetamina em lactato de Ringer). A artéria femoral é sondada para retirada de sangue e
5 coleta de amostra para gasometria arterial. A veia femoral é sondada para infusão dos líquidos de ressuscitamento e coleta de amostras para gasometria venosa.

É feita uma laparotomia na linha média em cada rato: o abdome é coberto com uma proteção de Saran para evitar a
10 evaporação de líquidos corpóreos. Um pequeno orifício é feito na proteção de Saran para permitir acesso da fibra óptica para medidas da PO_2 microcirculatória. Uma via ileocecal também é sondada com um cateter de polietileno de 0,8 mm para coleta de sangue venoso mesentérico.

15 A PO_2 microvascular intestinal é medida com o uso da técnica descrita previamente de extinção oxigênio-dependente da fosforescência de paládio-porfirina. Após 2,5 a 3 horas de cirurgia, paládio (II) meso-tetra(4-carbóxi-fenil) porfina acoplada à solução de HSA (50 mg em 10 ml de
20 solução de albumina 4%, 4 mmol/l de solução de paládio-porfirina, pH ajustado até 7,4 com HCl) é infundida em uma dose de 12 mg/kg de peso corporal em uma taxa de 9,6 ml/kg/h por 15 minutos.

A excitação de paládio-porfirina com um pulso de luz
25 causa a emissão de fosforescência que decai com o tempo, que está relacionada quantitativamente à concentração de oxigênio (Vanderkooi, J.M. e cols. (25 de abril de 1987), "An Optical Method for Measurement of Dioxygen Concentration Based Upon Quenching of Phosphorescence", *J.*
30 *Biol. Chem.* 262(12): 5.476-5.482). As medidas da PO_2

microvascular são feitas com uma fibra óptica posicionada acima da parte proximal do íleo. A lâmpada de flash é registrada antes da infusão da solução de paládio-porfirina e, um algoritmo de desconvolução é usado para calcular as concentrações de oxigênio. Após a infusão de solução de paládio-porfirina e de uma estabilização de 45 minutos, são coletadas amostras de sangue de base (0,2 ml/amostra) da artéria femoral, da veia femoral e da veia mesentérica para determinação da gasometria. As amostras de sangue são analisadas em um analisador de gasometria e em um hemoxímetro.

O choque hemorrágico é induzido por retirada de sangue da artéria femoral em seringas de 3 ml com heparina (25 IU/ml de sangue) em uma taxa de aproximadamente 1 ml/min por vários minutos, até que a MAP seja de aproximadamente 5,33 kPa. A MAP é mantida nesse nível com o uso de retiradas de sangue adicionais ou de infusões de sangue por 45 minutos. Imediatamente antes do ressuscitamento, são retiradas amostras de sangue (0,2 ml/amostra) da artéria femoral, da veia femoral e da via mesentérica para determinação da gasometria, e uma quantidade similar de sangue de rato (coletado durante choque hemorrágico) é re-infundida. Após esse período de choque, os animais são distribuídos aleatoriamente em 1 de 8 grupos de ressuscitamento diferentes. O ressuscitamento é efetuado com proteínas H-NOX do tipo selvagem ou mutantes ou com outro transportador de O₂, por exemplo, solução de hemoglobina recombinante rHb1.1 (Baxter), rHb2.0 (Baxter), hemoglobina sem soro (solução-padrão), MP4 (Sangart), hemopure (Biopure) ou poliheme (Northfield Labs) (Raat, N.

J. e cols. (janeiro de 2005), *Lab. Clin. Med.* 145(1): 21-32; concentração de estoque de 100 mg/ml), todos em uma dose de 20 ml/kg (2 g/kg) infundida em uma taxa de 60 ml/kg/h. HSA (solução de albumina 13,4%) infundida na mesma
5 dosagem (20 ml/kg) e taxa é usada como controle para o efeito de volume sobre a pressão e fluxo durante o ressuscitamento. Quando o ressuscitamento está completo, são retiradas amostras de sangue de 0,2 ml da artéria femoral, da veia femoral e da veia mesentérica após 30, 60,
10 90 e 120 minutos, e uma quantidade similar de sangue de rato é dada de volta a cada vez.

Proteínas H-NOX que causem a mesma ou menos vasoconstrição sistêmica (por exemplo, substancialmente ou significativamente menos), o mesmo ou menos aumento da MAP,
15 ou o mesmo ou menos aumento da resistência vascular mesentérica (MVR) após ressuscitamento, comparadas com as causadas por outro transportador de O₂ (por exemplo, rHb1.1, rHb2.0, hemoglobina sem soro, MP4, *hemospan* ou *poliheme*) ou por HAS pareada oncoticamente, são úteis para
20 o tratamento de choque hemorrágico. Espera-se que estas proteínas H-NOX também sejam úteis para o tratamento de outras indicações para as quais a liberação de O₂ é benéfica.

Os exemplos e a descrição detalhada apresentados
25 anteriormente são oferecidos apenas como forma de ilustração, e não como forma de limitação. Todas as publicações, pedidos de patente e patentes citados nessa especificação são aqui incorporados por referência como se cada publicação, pedido de patente ou patente individual
30 fosse específica e individualmente indicado para ser

incorporado por referência. Embora a invenção tenha sido descrita com algum detalhe como forma de ilustração e exemplo a fim de facilitar sua compreensão, ficará facilmente aparente por aqueles habilitados na técnica à luz dos ensinamentos dessa invenção que certas mudanças e modificações podem ser feitas a ela, sem se afastar do espírito ou do escopo das reivindicações em anexo.

A menos que definidos de forma diferente, os significados de todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados são aqueles comumente conhecidos por aqueles habilitados na técnica à qual essa invenção pertence. Aqueles habilitados na técnica também irão observar que quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos também podem ser usados para a prática ou teste da invenção.

Para uso nesse pedido, a menos que claramente indicado de forma diferente, o uso dos termos "um", "uma", e semelhantes refere-se a um ou mais.

Referências feitas nesse pedido a um valor de "cerca de" ou parâmetro incluem (e descrevem) modalidades que são dirigidas àquele valor ou parâmetro *per se*. Por exemplo, uma descrição que se refere a "cerca de X" inclui a descrição de "X".

Entende-se que aspectos e modalidades da invenção aqui descritas incluem "que compreende", "que consiste" e "que consiste basicamente em" aspectos e modalidades.



PI0711901-1

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender: (i) uma quantidade farmaceuticamente aceitável de uma proteína H-NOX, em que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX está dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina, e (ii) um veículo farmaceuticamente aceitável.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 100 nM e cerca de 255 nM a 20°C.

3. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 80 nM a 20°C.

4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e cerca de 75 nM a 20°C.

5. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

6. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

7. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizada pelo

fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é menor ou igual a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $0,21$ e cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

9. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,35 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $2,9 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

10. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é estável a 4°C no ar.

11. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína mutante.

12. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação da bolsa distal.

13. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que não está na bolsa distal.

14. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX

compreende pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O_2 , a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme e/ou a reatividade de NO comparadas com aquelas da proteína do tipo selvagem correspondente.

- 5 15. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma selecionada do grupo que consiste em H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, H-NOX I5A de *T.*
- 10 *tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-
- 15 NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX
- 20 R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 1 H-NOX do
- 25 tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX do tipo selvagem de *D. desulfuricans*, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-
- 30 385) de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-

385) I145H de *H. sapiens*, β 1(1-194) de *H. sapiens*, β 1(1-194) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-194) L9W-I145Y de *H. sapiens*, β 2(1-217) de *H. sapiens*, β 2(1-217) I142Y de *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105G de *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105F de *H. sapiens*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, β 1(1-385) de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145H de *R. norvegicus*, β 1(1-194) de *R. norvegicus*, β 1(1-194) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-194) L9W-I145Y de *R. norvegicus*, β 2(1-217) de *R. norvegicus*, β 2(1-217) I142Y de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, Cb H-NOX(1-175), Cb H-NOX(1-186), H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14886 do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG4154 do tipo selvagem de *D. melanogaster*; H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis*, H-NOX do tipo selvagem de *M. musculus*, H-NOX do tipo selvagem de *C. familiaris*, H-NOX do tipo selvagem de *B. taurus*, *R. norvegicus* do tipo selvagem; H-NOX do tipo selvagem de *X. laevis*, H-NOX do tipo selvagem de *O. latipes*, H-NOX do tipo selvagem de *O. curivatus*, H-NOX do tipo selvagem de *F. rubripes*, H-NOX do tipo selvagem de *A. gambiae*, H-NOX do tipo selvagem de *M. sexta*; gcy-31 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-34 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-35 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-36 do

tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-37 do tipo selvagem de *C. elegans*; H-NOX do tipo selvagem de *V. cholera*, H-NOX do tipo selvagem de *V. fischerii* e H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*.

5 16. 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, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de mamífero ou é derivada de uma proteína de mamífero.

10 17. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína humana ou é derivada de uma proteína humana.

15 18. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que a proteína humana é $\beta 1$ ou é derivada de $\beta 1$.

20 19. 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, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína bacteriana ou é derivada de uma proteína bacteriana.

25 20. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de *T. tengcongensis* ou é derivada de uma proteína de *T. tengcongensis*.

21. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20, caracterizada pelo fato de que o oxigênio está ligado à proteína H-NOX.

30 22. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21, caracterizada por compreender um ou mais lipossomos ou nanopartículas que compreendem a proteína H-NOX.

5 23. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína H-NOX mutante de qualquer uma das reivindicações 279-397.

10 24. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender: (i) uma quantidade farmacêuticamente aceitável de uma proteína H-NOX, em que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 1 nM e cerca de 1 mM a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de
15 menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C, e (ii) um veículo farmacêuticamente aceitável.

 25. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre
20 cerca de 2 nM e cerca de 50 µM a 20°C.

 26. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 50 nM e cerca de 10 µM a 20°C.

25 27. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 µM a 20°C.

 28. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer
30 uma das reivindicações 24, 25, 26 ou 27, caracterizada pelo

fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

29. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

30. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

31. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é menor do que cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$.

32. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 31, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

33. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ou 32, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína é menor ou igual a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

34. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $0,21 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

35. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34, caracterizada pelo fato de que a taxa de auto-

oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

36. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 5 33, 34 ou 35, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e $2 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

37. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer 10 uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e $2 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca 15 de 1 h^{-1} a 37°C .

38. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 ou 37, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre 20 cerca de 20 nM e $2 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

39. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 25 33, 34, 35, 36, 37 ou 38, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína X é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

30 40. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 ou 39, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

41. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40, caracterizada pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

42. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 ou 41, caracterizada pelo fato de que heme está ligada à proteína H-NOX.

43. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 ou 42, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína mutante.

44. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação da bolsa distal.

45. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 ou 44, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que não está na bolsa distal.

46. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32,

33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 ou 45, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O₂, a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme e/ou a estabilidade do NO, comparadas com
5 as de uma proteína do tipo selvagem correspondente.

47. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 ou 46, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a reatividade de NO, comparada com a de uma proteína do tipo selvagem correspondente.
10

48. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 ou 47, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma selecionada do grupo que consiste em H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*,
20
25
30

H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX
 5 F142Y de *L. pneumophila*, 1 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX do tipo selvagem de *D. desulfuricans*, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *H.*
 10 *sapiens*, β 1 I140Y de *H. sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-385) de *H. sapiens*, β 1(1-385)I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145H de *H. sapiens*, β 1(1-194) de *H. sapiens*, β 1(1-194) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-194) L9W-I145Y de *H. sapiens*, β 2(1-217) de *H. sapiens*, β 2(1-217) I142Y de *H.*
 15 *sapiens*, β 1 H-NOX H105G de *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105F de *H. sapiens*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, β 1(1-385) de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145H de *R. norvegicus*, β 1(1-194) de *R. norvegicus*, β 1(1-194) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-194)
 20 L9W-I145Y de *R. norvegicus*, β 2(1-217) de *R. norvegicus*, β 2(1-217) I142Y de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX H105G de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, Cb H-NOX(1-175), Cb H-NOX(1-186), H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-
 25 183) de *C. acetobutylicum*, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14886 do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG4154 do tipo selvagem de *D. melanogaster*;
 30 H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo

selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis*, H-NOX do tipo selvagem de *M. musculus*, H-NOX do tipo selvagem de *C. familiaris*, H-NOX do tipo selvagem de *B. taurus*, *R. norvegicus* do tipo selvagem; H-NOX do tipo
 5 selvagem de *X. laevis*, H-NOX do tipo selvagem de *O. latipes*, H-NOX do tipo selvagem de *O. curivatus*, H-NOX do tipo selvagem de *F. rubripes*, H-NOX do tipo selvagem de *A. gambiae*, H-NOX do tipo selvagem de *M. sexta*; gcy-31 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 do
 10 tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-34 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-35 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-36 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-37 do tipo selvagem de *C. elegans*; H-NOX do tipo selvagem de *V. cholera*, H-NOX do tipo selvagem de *V. fischerii* e H-NOX do tipo selvagem de
 15 *N. punctiforme*.

49. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 ou 48, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é
 20 uma proteína de mamífero ou é derivada de uma proteína de mamífero.

50. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 49, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína humana ou é derivada de uma proteína
 25 humana.

51. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de que a proteína humana é $\beta 1$ ou é derivada de $\beta 1$.

52. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer
 30 uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32,

33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 ou 48, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína bacteriana ou é derivada de uma proteína bacteriana.

5 53. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 52, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de *T. tengcongensis* ou é derivada de uma proteína de *T. tengcongensis*.

10 54. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 ou 53, caracterizada pelo fato de que o oxigênio está ligado à proteína H-NOX.

15 55. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 ou 54, caracterizada por compreender um ou mais lipossomos ou nanopartículas que compreendem a proteína H-NOX.

20 56. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 ou 55, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína H-NOX mutante de
25 qualquer uma das reivindicações 279-397.

57. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender: (i) uma quantidade farmacêuticamente aceitável de uma proteína H-NOX, em que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 1 nM e cerca de 1 mM
30 a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de

menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C , e em que a proteína H-NOX não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, e (ii) um veículo farmacêuticamente aceitável.

58. Composição farmacêutica, de acordo com a
5 reivindicação 57, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX não é $\beta 1$ I140Y de *H. sapiens*.

59. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57 ou 58, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é
10 entre cerca de 2 nM e cerca de 50 μM a 20°C .

60. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 50 nM e cerca de 10 μM a 20°C .

15 61. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 μM a 20°C .

62. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer
20 uma das reivindicações 57, 58, 59, 60 ou 61, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

63. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 62, caracterizada pelo fato de que a
25 reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

64. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 63, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 1.000
30 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

65. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 ou 64, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$.

5 66. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 ou 65, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

10 67. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 ou 66, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é menor ou igual a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

15 68. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 67, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $0,21 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

20 69. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 ou 68, caracterizada pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

25 70. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 ou 69, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e $2 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

30

71. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ou 70, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre
5 cerca de 20 nM e 2 µM a 20°C, e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h⁻¹ a 37°C.

72. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65,
10 66, 67, 68, 69, 70 ou 71, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 µM a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C.

15 73. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 ou 72, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,0 s⁻¹ e cerca de 16,0 s⁻¹ a 20°C, e em que a taxa de auto-
20 oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h⁻¹ a 37°C.

74. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 ou 73, caracterizada pelo fato
25 de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,0 s⁻¹ e cerca de 16,0 s⁻¹ a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C.

75. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer
30 uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65,

66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 ou 74, caracterizada pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca
5 de 700 s^{-1} a 20°C .

76. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 ou 75, caracterizada pelo fato de que heme está ligada à proteína H-NOX.

10 77. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 ou 76, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína mutante.

15 78. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 77, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação da bolsa distal.

79. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 ou 78, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que
20 não está na bolsa distal.

80. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78 ou 79, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX compreende
25 pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O_2 , a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme e/ou a estabilidade do NO, comparadas com as da proteína do tipo selvagem correspondente.

81. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer
30 uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65,

66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 ou
80, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX
compreende pelo menos uma mutação que altera a reatividade
de NO, comparada com aquela da proteína do tipo selvagem
5 correspondente.

82. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer
uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65,
66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80
ou 81, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é
10 uma selecionada do grupo que consiste em H-NOX do tipo
selvagem de *T. tengcongensis*, H-NOX I5A de *T.*
tengcongensis, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-
P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*,
H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T.*
15 *tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX
W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-
NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T.*
tengcongensis, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H
de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*,
20 H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de
T. tengcongensis, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX
R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*,
H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T.*
tengcongensis, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T.*
25 *tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T.*
tengcongensis, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 1 H-NOX do
tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem
de *L. pneumophila*, 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX
do tipo selvagem de *D. desulfuricans*, H-NOX(728-899) de *D.*
30 *desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1 H-NOX do

tipo selvagem de *H. sapiens*, $\beta 1$ I145Y de *H. sapiens*, $\beta 1$ (1-385) de *H. sapiens*, $\beta 1$ (1-385) I145Y de *H. sapiens*, $\beta 1$ (1-385) I145H de *H. sapiens*, $\beta 1$ (1-194) de *H. sapiens*, $\beta 1$ (1-194) I145Y de *H. sapiens*, $\beta 1$ (1-194) L9W-I145Y de *H.*
 5 *sapiens*, $\beta 2$ (1-217) de *H. sapiens*, $\beta 2$ (1-217) I142Y de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX H105G de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX H105F de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, $\beta 1$ (1-385) de *R. norvegicus*, $\beta 1$ (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, $\beta 1$ (1-385) I145H de *R. norvegicus*, $\beta 1$ (1-194) de *R.*
 10 *norvegicus*, $\beta 1$ (1-194) I145Y de *R. norvegicus*, $\beta 1$ (1-194) L9W-I145Y de *R. norvegicus*, $\beta 2$ (1-217) de *R. norvegicus*, $\beta 2$ (1-217) I142Y de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX H105G de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX H105F de *R. norvegicus*, Cb H-NOX(1-175), Cb H-NOX(1-186), H-NOX do tipo selvagem de *C.*
 15 *acetobutylicum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14886 do tipo selvagem de *D.*
 20 *melanogaster*, CG4154 do tipo selvagem de *D. melanogaster*; H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis*, H-NOX do tipo selvagem de *M. musculus*, H-NOX do tipo selvagem de *C. familiaris*, H-NOX do tipo selvagem de
 25 *B. taurus*, *R. norvegicus* do tipo selvagem; H-NOX do tipo selvagem de *X. laevis*, H-NOX do tipo selvagem de *O. latipes*, H-NOX do tipo selvagem de *O. curivatus*, H-NOX do tipo selvagem de *F. rubripes*, H-NOX do tipo selvagem de *A. gambiae*, H-NOX do tipo selvagem de *M. sexta*; gcy-31 do tipo
 30 selvagem de *C. elegans*, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 do

tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-34 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-35 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-36 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-37 do tipo selvagem de *C. elegans*; H-NOX do tipo selvagem de *V. cholera*, H-NOX do tipo selvagem de *V. fischerii* e H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*.

83. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81 ou 82, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de mamífero ou é derivada de uma proteína de mamífero.

84. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 83, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína humana ou é derivada de uma proteína humana.

85. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 84, caracterizada pelo fato de que a proteína humana é $\beta 1$ ou é derivada de $\beta 1$.

86. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81 ou 82, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína bacteriana ou é derivada de uma proteína bacteriana.

87. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 86, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de *T. tengcongensis* ou é derivada de uma proteína de *T. tengcongensis*.

88. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 ou 87, caracterizada pelo fato de que o oxigênio está ligado à proteína H-NOX.

5 89. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, caracterizada por compreender um ou mais lipossomos ou nanopartículas que
10 compreendem a proteína H-NOX.

 90. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 ou 89, caracterizada pelo
15 fato de que a proteína H-NOX é uma proteína H-NOX mutante de qualquer uma das reivindicações 279-397.

 91. Método de liberação de oxigênio a um indivíduo, caracterizado por compreender a administração a um indivíduo que dela necessita de uma proteína H-NOX em uma
20 quantidade suficiente para liberar uma quantidade eficaz de oxigênio ao indivíduo, em que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX está dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da
25 hemoglobina.

 92. Método, de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 100 nM e cerca de 255 nM a 20°C.

30 93. Método, de acordo com a reivindicação 91,

caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 80 nM a 20°C.

94. Método, de acordo com a reivindicação 93,
5 caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e cerca de 75 nM a 20°C.

95. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93 ou 94, caracterizado pelo fato de
10 que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

96. Método, de acordo com a reivindicação 95,
caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da
15 proteína H-NOX é pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

97. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95 ou 96, caracterizado pelo
fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é menor
ou igual a cerca de $0,65\text{ s}^{-1}$ a 20°C.

20 98. Método, de acordo com a reivindicação 97,
caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da
proteína H-NOX é entre cerca de $0,21\text{ s}^{-1}$ e cerca de $0,65\text{ s}^{-1}$
a 20°C.

99. Método, de acordo com qualquer uma das
25 reivindicações 91, 92, 93, 94, 95 ou 96, caracterizado pelo
fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre
cerca de $1,35\text{ s}^{-1}$ e cerca de $2,9\text{ s}^{-1}$ a 20°C.

100. Método, de acordo com qualquer uma das
reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99,
30 caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é estável a

4°C no ar.

101. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma
5 proteína H-NOX do tipo selvagem.

102. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína mutante.

103. Método, de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação da bolsa distal.

104. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 ou 103, caracterizado pelo fato de que a
15 proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que não está na bolsa distal.

105. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103 ou 104, caracterizado pelo fato de que a
20 proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O₂, a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme e/ou a reatividade de NO, comparadas com aquelas da proteína do tipo selvagem correspondente.

106. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104 ou 105, caracterizado pelo fato de que a
25 proteína H-NOX é uma selecionada do grupo que consiste em H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-
30

P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*,
 H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T.*
tengcongensis, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX
 W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-
 5 NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T.*
tengcongensis, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H
 de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*,
 H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de
T. tengcongensis, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX
 10 R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*,
 H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T.*
tengcongensis, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T.*
tengcongensis, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T.*
tengcongensis, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 1 H-NOX do
 15 tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem
 de *L. pneumophila*, 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX
 do tipo selvagem de *D. desulfuricans*, H-NOX(728-899) de *D.*
desulfuricans, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1 H-NOX do
 tipo selvagem de *H. sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-
 20 385) de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-
 385) I145H de *H. sapiens*, β 1(1-194) de *H. sapiens*, β 1(1-
 194) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-194) L9W-I145Y de *H.*
sapiens, β 2(1-217) de *H. sapiens*, β 2(1-217) I142Y de *H.*
sapiens, β 1 H-NOX I-1105G de *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105F de
 25 *H. sapiens*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*,
 β 1(1-385) de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145Y de *R.*
norvegicus, β 1(1-385) I145H de *R. norvegicus*, β 1(1-194) de
R. norvegicus, β 1(1-194) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-194)
 L9W-I145Y de *R. norvegicus*, β 2(1-217) de *R. norvegicus*,
 30 β 2(1-217) I142Y de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX H105G de *R.*

norvegicus, β 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, Cb H-NOX(1-175), Cb H-NOX(1-186), H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de
 5 *C. elegans*, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14886 do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG4154 do tipo selvagem de *D. melanogaster*; H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo
 10 selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis*, H-NOX do tipo selvagem de *M. musculus*, H-NOX do tipo selvagem de *C. familiaris*, H-NOX do tipo selvagem de *B. taurus*, *R. norvegicus* do tipo selvagem; H-NOX do tipo selvagem de *X. laevis*, H-NOX do tipo selvagem de *O.*
 15 *latipes*, H-NOX do tipo selvagem de *O. curivatus*, H-NOX do tipo selvagem de *F. rubripes*, H-NOX do tipo selvagem de *A. gambiae*, H-NOX do tipo selvagem de *M. sexta*; gcy-31 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-34 do tipo selvagem de *C.*
 20 *elegans*, gcy-35 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-36 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-37 do tipo selvagem de *C. elegans*; H-NOX do tipo selvagem de *V. cholera*, H-NOX do tipo selvagem de *V. fischerii* e H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*.

25 107. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105 ou 106, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de mamífero ou é derivada de uma proteína de mamífero.

30 108. Método, de acordo com a reivindicação 107,

caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína humana ou é derivada de uma proteína humana.

109. Método, de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que a proteína humana é $\beta 1$ ou é derivada de $\beta 1$.

110. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105 ou 106, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína bacteriana ou é derivada de uma proteína bacteriana.

111. Método, de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de *T. tengcongensis* ou é derivada de uma proteína de *T. tengcongensis*.

112. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110 ou 111, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é administrada no sangue do indivíduo.

113. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 ou 112, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

114. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 ou 113, caracterizado pelo fato de que o indivíduo sofre ou está em risco de apresentar uma perda sangüínea.

115. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113 ou 114, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é administrada ao indivíduo pelo menos duas vezes.

5 116. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 ou 115, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína H-NOX mutante de qualquer uma das
10 reivindicações 279-397.

117. Método de liberação de oxigênio a um indivíduo, caracterizado por compreender a administração a um indivíduo que dela necessita de uma proteína H-NOX em uma quantidade suficiente para liberar uma quantidade eficaz de
15 oxigênio ao indivíduo, em que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 1 nM e cerca de 1 mM a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C.

118. Método, de acordo com a reivindicação 117, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação
20 de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 2 nM e cerca de 50 µM a 20°C.

119. Método, de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação
25 de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 50 nM e cerca de 10 µM a 20°C.

120. Método, de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação
30 de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 µM a 20°C.

121. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119 ou 120, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

5 122. Método, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

10 123. Método, de acordo com a reivindicação 122, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

15 124. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122 ou 123, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$.

20 125. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122 ou 123, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

25 126. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 ou 125, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é menor ou igual a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

127. Método, de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $0,21 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

30 128. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 ou 127, caracterizado pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

5 129. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127 ou 128, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e $2 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a k_{off} para oxigênio da proteína
10 H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

 130. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128 ou 129, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre
15 cerca de 20 nM e $2 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

 131. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125,
20 126, 127, 128, 129 ou 130, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e $2 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

25 132. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130 ou 131, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C , e em que a taxa de auto-
30 oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca

de 1 h^{-1} a 37°C .

133. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131 ou 132, caracterizado pelo
5 fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

134. Método, de acordo com qualquer uma das
10 reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 ou 133, caracterizado pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do
15 que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

135. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 ou 134, caracterizado pelo fato de que heme está ligada à proteína
20 H-NOX.

136. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 ou 135, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma
25 proteína mutante.

137. Método, de acordo com a reivindicação 136, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação da bolsa distal.

138. Método, de acordo com qualquer uma das
30 reivindicações 135 ou 136, caracterizado pelo fato de que a

proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que não está na bolsa distal.

139. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137 ou 138, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O₂, a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme, reatividade de NO e/ou a estabilidade do NO, comparadas com as de uma proteína do tipo selvagem correspondente.

140. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 ou 139, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma selecionada do grupo que consiste em H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6

de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6
 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX
 F142Y de *L. pneumophila*, 1 H-NOX do tipo selvagem de *L.*
pneumophila, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*,
 5 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX do tipo selvagem de
D. desulfuricans, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX
 Y139L de *D. desulfuricans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *H.*
sapiens, β 1 I140Y de *H. sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*,
 β 1(1-385) de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145Y de *H. sapiens*,
 10 β 1(1-385) I145H de *H. sapiens*, β 1(1-194) de *H. sapiens*,
 β 1(1-194) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-194) L9W-I145Y de *H.*
sapiens, β 2(1-217) de *H. sapiens*, β 2(1-217) I142Y de *H.*
sapiens, β 1 H-NOX H105G de *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105F de *H.*
sapiens, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, β 1(1-
 15 385) de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*,
 β 1(1-385) I145H de *R. norvegicus*, β 1(1-194) de *R.*
norvegicus, β 1(1-194) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-194)
 L9W-I145Y de *R. norvegicus*, β 2(1-217) de *R. norvegicus*,
 β 2(1-217) I142Y de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX H105G de *R.*
 20 *norvegicus*, β 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, Cb H-NOX(1-
 175), Cb H-NOX(1-186), H-NOX do tipo selvagem de *C.*
acetobutylicum, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-
 183) de *C. acetobutylicum*, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de
C. elegans, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, β 1 H-NOX do
 25 tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo
 selvagem de *D. melanogaster*, CG14886 do tipo selvagem de *D.*
melanogaster, CG4154 do tipo selvagem de *D. melanogaster*;
 H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo
 selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S.*
 30 *oneidensis*, H-NOX do tipo selvagem de *M. musculus*, H-NOX do

tipo selvagem de *C. familiaris*, H-NOX do tipo selvagem de *B. taurus*, *R. norvegicus* do tipo selvagem; H-NOX do tipo selvagem de *X. laevis*, H-140X do tipo selvagem de *O. latipes*, H-NOX do tipo selvagem de *O. curivatus*, H-NOX do tipo selvagem de *F. rubripes*, H-NOX do tipo selvagem de *A. gambiae*, H-NOX do tipo selvagem de *M. sexta*; gcy-31 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-34 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-35 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-36 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-37 do tipo selvagem de *C. elegans*; H-NOX do tipo selvagem de *V. cholera*, H-NOX do tipo selvagem de *V. fischerii* e H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*.

141. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 ou 140, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de mamífero ou é derivada de uma proteína de mamífero.

142. Método, de acordo com a reivindicação 141, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína humana ou é derivada de uma proteína humana.

143. Método, de acordo com a reivindicação 142, caracterizado pelo fato de que a proteína humana é $\beta 1$ ou é derivada de $\beta 1$.

144. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142 ou 143, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína bacteriana ou é

derivada de uma proteína bacteriana.

145. Método, de acordo com a reivindicação 144, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de *T. tengcongensis* ou é derivada de uma proteína
5 de *T. tengcongensis*.

146. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144 ou 145, caracterizado
10 pelo fato de que o oxigênio está ligado à proteína H-NOX, antes da administração da proteína H-NOX ao indivíduo.

147. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137,
15 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144 ou 145, caracterizado pelo fato de que o oxigênio não está ligado à proteína H-NOX, antes da administração da proteína H-NOX ao indivíduo, e em que a proteína H-NOX transporta oxigênio de uma localização no indivíduo para outra localização no
20 indivíduo.

148. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146 ou 147,
25 caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é administrada no sangue, em um tecido hipóxico ou em um órgão hipóxico do indivíduo.

149. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125,
30 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137,

138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147 ou 148, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

150. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125,
5 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148 ou 149, caracterizado pelo fato de que o indivíduo sofre ou está em risco de apresentar uma doença cardiovascular, choque hemorrágico, hemodiluição ou uma perda sangüínea.

10 151. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 ou 150, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é
15 administrada ao indivíduo pelo menos duas vezes.

152. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149,
20 150 ou 151, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína H-NOX mutante de qualquer uma das reivindicações 279-397.

153. Método de liberação de oxigênio a um indivíduo, caracterizado por compreender a administração a um
25 indivíduo que dela necessita de uma proteína H-NOX em uma quantidade suficiente para liberar uma quantidade eficaz de oxigênio ao indivíduo, em que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 1 nM e cerca de 1 mM a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de
30 menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C, e em que a proteína

H-NOX não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*.

154. Método, de acordo com a reivindicação 153, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX não é $\beta 1$ I140Y de *H. sapiens*.

5 155. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153 ou 154, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 2 nM e cerca de 50 μ M a 20°C.

10 156. Método, de acordo com a reivindicação 155, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 50 nM e cerca de 10 μ M a 20°C.

15 157. Método, de acordo com a reivindicação 155, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 μ M a 20°C.

20 158. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156 ou 157, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

159. Método, de acordo com a reivindicação 158, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

25 160. Método, de acordo com a reivindicação 159, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

30 161. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 ou 160,

caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$.

162. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160 ou
5 161, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

163. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160 ou
10 161, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é menor ou igual a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

164. Método, de acordo com a reivindicação 163, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $0,21 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$
15 a 20°C .

165. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163 ou 164, caracterizado pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que
20 cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

166. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164 ou 165, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre
25 cerca de 20 nM e $2 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

167. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165 ou 166, caracterizado pelo fato de que a
30

constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 μ M a 20°C, e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C.

5 168. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166 ou 167, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 μ M a 20°C, e em que a reatividade
10 de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C.

 169. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167 ou 168, caracterizado pelo
15 fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,0 s^{-1} e cerca de 16,0 s^{-1} a 20°C, e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C.

 170. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 ou 169, caracterizado
20 pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,0 s^{-1} e cerca de 16,0 s^{-1} a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que
25 cerca de 700 s^{-1} a 20°C.

 171. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169 ou 170, caracterizado pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de
30 heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1}

37°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C.

172. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161,
5 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170 ou 171, caracterizado pelo fato de que heme está ligada à proteína H-NOX.

173. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161,
10 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171 ou 172, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína mutante.

174. Método, de acordo com a reivindicação 173, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende
15 pelo menos uma mutação da bolsa distal.

175. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 ou 174, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que não está na bolsa distal.

20 176. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174 ou 175, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a constante de
25 dissociação de O_2 , a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme e/ou a estabilidade do NO, comparadas com aquelas da proteína do tipo selvagem correspondente.

177. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161,
30 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173,

174, 175 ou 176, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a reatividade de NO, comparada com aquela da proteína do tipo selvagem correspondente.

5 178. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176 ou 177, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma selecionada do grupo que consiste em

10 H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-YI40H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX

15 W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de

20 *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 1 H-NOX do

25 tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX do tipo selvagem de *D. desulfuricans*, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1 H-NOX do

30 tipo selvagem de *H. sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-

385) de *H. sapiens*, $\beta 1(1-385)$ I145Y de *H. sapiens*, $\beta 1(1-385)$ I145H de *H. sapiens*, $\beta 1(1-194)$ de *H. sapiens*, $\beta 1(1-194)$ I145Y de *H. sapiens*, $\beta 1(1-194)$ L9W-I145Y de *H. sapiens*, $\beta 2(1-217)$ de *H. sapiens*, $\beta 2(1-217)$ I142Y de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX H105G de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX H105F de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-385)$ de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-385)$ I145Y de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-385)$ I145H de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-194)$ de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-194)$ I145Y de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-194)$ L9W-I145Y de *R. norvegicus*, $\beta 2(1-217)$ de *R. norvegicus*, $\beta 2(1-217)$ I142Y de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX H105G de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX H105F de *R. norvegicus*, Cb H-NOX(1-175), Cb H-NOX(1-186), H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14886 do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG4154 do tipo selvagem de *D. melanogaster*; H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis*, H-NOX do tipo selvagem de *M. musculus*, H-NOX do tipo selvagem de *C. familiaris*, H-NOX do tipo selvagem de *B. taurus*, *R. norvegicus* do tipo selvagem; H-NOX do tipo selvagem de *X. laevis*, H-NOX do tipo selvagem de *O. latipes*, H-NOX do tipo selvagem de *O. curivatus*, H-NOX do tipo selvagem de *F. rubripes*, H-NOX do tipo selvagem de *A. gambiae*, H-NOX do tipo selvagem de *M. sexta*; gcy-31 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-34 do tipo selvagem de *C. elegans*;

elegans, gcy-35 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-36 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-37 do tipo selvagem de *C. elegans*; H-NOX do tipo selvagem de *V. cholera*, H-NOX do tipo selvagem de *V. fischerii* e H-NOX do tipo selvagem de
5 *N. punctiforme*.

179. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177 ou 178, caracterizado pelo fato de que a
10 proteína H-NOX é uma proteína de mamífero ou é derivada de uma proteína de mamífero.

180. Método, de acordo com a reivindicação 179, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína humana ou é derivada de uma proteína humana.

15 181. Método, de acordo com a reivindicação 180, caracterizado pelo fato de que a proteína humana é $\beta 1$ ou é derivada de $\beta 1$.

182. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161,
20 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177 ou 178, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína bacteriana ou é derivada de uma proteína bacteriana.

183. Método, de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma
25 proteína de *T. tengcongensis* ou é derivada de uma proteína de *T. tengcongensis*.

184. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161,
30 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173,

174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 ou 183, caracterizado pelo fato de que o oxigênio está ligado à proteína H-NOX, antes da administração da proteína H-NOX ao indivíduo.

5 185. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 ou 183, caracterizado pelo fato de que o oxigênio não está ligado à
10 proteína H-NOX, antes da administração da proteína H-NOX ao indivíduo, em que a proteína H-NOX transporta oxigênio de uma localização no indivíduo para outra localização no indivíduo.

 186. Método, de acordo com qualquer uma das
15 reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184 ou 185, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é administrada no sangue, em um tecido hipóxico ou um órgão
20 hipóxico do indivíduo.

 187. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185
25 ou 186, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

 188. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173,
30 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185,

186 ou 187, caracterizado pelo fato de que o indivíduo sofre ou está em risco de apresentar uma doença cardiovascular, choque hemorrágico, hemodiluição ou uma perda sangüínea.

5 189. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187 ou 188, caracterizado pelo fato de que a proteína
10 H-NOX é administrada ao indivíduo pelo menos duas vezes.

 190. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185,
15 186, 187, 188 ou 189, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína H-NOX mutante de qualquer uma das reivindicações 279-397.

 191. Kit, caracterizado por compreender: (i) uma quantidade farmacêuticamente aceitável de uma proteína H-
20 NOX, em que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX está dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina, e (ii) um veículo farmacêuticamente aceitável.

25 192. Kit, de acordo com a reivindicação 191, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 100 nM e cerca de 255 nM a 20°C.

 193. Kit, de acordo com a reivindicação 191,
30 caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação

de O₂ da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 80 nM a 20°C.

194. Kit, de acordo com a reivindicação 193, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e cerca de 75 nM a 20°C.

195. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194 ou 195, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

196. Kit, de acordo com a reivindicação 195, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

197. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194, 195 ou 196, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é menor ou igual a cerca de 0,65 s⁻¹ a 20°C.

198. Kit, de acordo com a reivindicação 197, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 0,21 s⁻¹ e cerca de 0,65 s⁻¹ a 20°C.

199. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194, 195 ou 196, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,35 s⁻¹ e cerca de 2,9 s⁻¹ a 20°C.

200. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198 ou 199, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é

estável a 4°C no ar.

201. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 ou 200, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é
5 uma proteína H-NOX do tipo selvagem.

202. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 ou 200, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína mutante.

10 203. Kit, de acordo com a reivindicação 202, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação da bolsa distal.

204. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 202 ou 203, caracterizado pelo fato de que a
15 proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que não está na bolsa distal.

205. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203 ou 204, caracterizado pelo fato de que a
20 proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O₂, a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme e/ou a reatividade de NO, comparadas com aquelas da proteína do tipo selvagem correspondente.

25 206. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 ou 205, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma selecionada do grupo que consiste em H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, H-
30 NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*,

H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, *T. tengcongensis* FI-
 NOX W9F, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-
 Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T.*
tengcongensis, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de
 5 *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E
 de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX
 N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T.*
tengcongensis, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX
 F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T.*
 10 *tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F
 de *T. tengcongensis*, H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX
 Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*,
 I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*,
 L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L.*
 15 *pneumophilia*, 1 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophilia*,
 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophilia*, 2 F9W-F142Y de
L. pneumophilia, H-NOX do tipo selvagem de *D.*
desulfuricans, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX
 Y139L de *D. desulfuricans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *H.*
 20 *sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-385) de *H. sapiens*,
 β 1(1-385) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145H de *H.*
sapiens, β 1(1-194) de *H. sapiens*, β 1(1-194) I145Y de *H.*
sapiens, β 1(1-194) L9W-I145Y de *H. sapiens*, β 2(1-217) de *H.*
sapiens, β 2(1-217) I142Y de *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105G de
 25 *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105F de *H. sapiens*, β 1 H-NOX do tipo
 selvagem de *R. norvegicus*, β 1(1-385) de *R. norvegicus*,
 β 1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145H de *R.*
norvegicus, β 1(1-194) de *R. norvegicus*, β 1(1-194) I145Y de
R. norvegicus, β 1(1-194) L9W-I145Y de *R. norvegicus*, β 2(1-
 30 217) de *R. norvegicus*, β 2(1-217) I142Y de *R. norvegicus*, β 1

H-NOX H105G de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, Cb H-NOX(1-175), Cb H-NOX(1-186), H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, GCY-35
 5 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14886 do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG4154 do tipo selvagem de *D. melanogaster*; H-NOX do tipo
 10 selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis*, H-NOX do tipo selvagem de *M. musculus*, H-NOX do tipo selvagem de *C. familiaris*, H-NOX do tipo selvagem de *B. taurus*, *R. norvegicus* do tipo selvagem; H-NOX do tipo selvagem de *X.*
 15 *laevis*, H-NOX do tipo selvagem de *O. latipes*, H-NOX do tipo selvagem de *O. curivatus*, H-NOX do tipo selvagem de *F. rubripes*, H-NOX do tipo selvagem de *A. gambiae*, H-NOX do tipo selvagem de *M. sexta*; gcy-31 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 do tipo selvagem de
 20 *C. elegans*, gcy-34 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-35 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-36 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-37 do tipo selvagem de *C. elegans*; H-NOX do tipo selvagem de *V. cholera*, H-NOX do tipo selvagem de *V. fischerii* e H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*.

25 207. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205 ou 206, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de mamífero ou é derivada de uma proteína de mamífero.

30 208. Kit, de acordo com a reivindicação 207,

caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína humana ou é derivada de uma proteína humana.

209. Kit, de acordo com a reivindicação 208, caracterizado pelo fato de que a proteína humana é $\beta 1$ ou é derivada de $\beta 1$.

210. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205 ou 206, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína bacteriana ou é derivada de uma proteína bacteriana.

211. Kit, de acordo com a reivindicação 210, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de *T. tengcongensis* ou é derivada de uma proteína de *T. tengcongensis*.

212. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210 ou 211, caracterizado pelo fato de que o oxigênio está ligado à proteína H-NOX.

213. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 ou 212, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína H-NOX mutante de qualquer uma das reivindicações 279-397.

214. Kit, caracterizado por compreender (i) uma proteína H-NOX, em que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 1 nM e cerca de 1 mM a $20^\circ C$, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de $700\ s^{-1}$ a $20^\circ C$, e (ii) instruções

para utilização do kit para liberar oxigênio a um indivíduo.

215. Kit, de acordo com a reivindicação 214, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 2 nM e cerca de 50 μM a 20°C.

216. Kit, de acordo com a reivindicação 215, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 50 nM e cerca de 10 pM a 20°C.

217. Kit, de acordo com a reivindicação 214, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 μM a 20°C.

218. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216 ou 217, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

219. Kit, de acordo com a reivindicação 218, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

220. Kit, de acordo com a reivindicação 219, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

221. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219 ou 220, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1,0 s⁻¹.

222. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220 ou 221, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

223. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221 ou 222, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é menor ou igual a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

10 224. Kit, de acordo com a reivindicação 223, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $0,21 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

15 225. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223 ou 224, caracterizado pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

20 226. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224 ou 225, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e $2 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

25 227. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225 ou 226, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e $2 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca

30

de 1 h⁻¹ a 37°C.

228. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226 ou 227, caracterizado pelo fato de que a
5 constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 µM a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C.

229. Kit, de acordo com qualquer uma das
10 reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227 ou 228, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,0 s⁻¹ e cerca de 16,0 s⁻¹ a 20°C, e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca
15 de 1 h⁻¹ 37°C.

230. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 ou 229, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre
20 cerca de 1,0 s⁻¹ e cerca de 16,0 s⁻¹ a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C.

231. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222,
25 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229 ou 230, caracterizado pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h⁻¹ a 37°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C.

30 232. Kit, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230 ou 231, caracterizado pelo fato de que heme está ligada à proteína H-NOX.

5 233. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231 ou 232, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína mutante.

10 234. Kit, de acordo com a reivindicação 233, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação da bolsa distal.

15 235. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 233 ou 234, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que não está na bolsa distal.

20 236. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234 ou 235, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O₂, a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme e/ou a estabilidade do NO, comparadas com as de uma proteína do tipo selvagem correspondente.

25 237. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235 ou 236, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a reatividade
30 de NO, comparada com a de uma proteína do tipo selvagem

correspondente.

238. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 5 235, 236 ou 237, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma selecionada do grupo que consiste em H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, 10 H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H 15 de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. 20 tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 1 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, 25 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX do tipo selvagem de *D. desulfuricans*, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, β 1 I140Y de *H. sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-385) de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145Y de *H. sapiens*, 30 β 1(1-385) I145H de *H. sapiens*, β 1(1-194) de *H. sapiens*,

$\beta 1(1-194)$ I145Y de *H. sapiens*, $\beta 1(1-194)$ L9W-I145Y de *H. sapiens*, $\beta 2(1-217)$ de *H. sapiens*, $\beta 2(1-217)$ I142Y de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX H105G de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX H105F de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-385)$ de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-385)$ I145Y de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-385)$ I145H de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-194)$ de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-194)$ I145Y de *R. norvegicus*, $\beta 1(1-194)$ L9W-I145Y de *R. norvegicus*, $\beta 2(1-217)$ de *R. norvegicus*, $\beta 2(1-217)$ I142Y de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX H105G de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX H105F de *R. norvegicus*, Cb H-NOX(1-175), Cb H-NOX(1-186), H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14886 do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG4154 do tipo selvagem de *D. melanogaster*; H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis*, H-NOX do tipo selvagem de *M. musculus*, H-NOX do tipo selvagem de *C. familiaris*, H-NOX do tipo selvagem de *B. taurus*, *R. norvegicus* do tipo selvagem; H-NOX do tipo selvagem de *X. laevis*, H-NOX do tipo selvagem de *O. latipes*, H-NOX do tipo selvagem de *O. curivatus*, H-NOX do tipo selvagem de *F. rubripes*, H-NOX do tipo selvagem de *A. gambiae*, H-NOX do tipo selvagem de *M. sexta*; gcy-31 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-34 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-35 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-36 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-37 do tipo selvagem de *C. elegans*.

elegans; H-NOX do tipo selvagem de *V. cholera*, H-NOX do tipo selvagem de *V. fischerii* e H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*.

239. Kit, de acordo com qualquer uma das
5 reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237 ou 238, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de mamífero ou é derivada de uma proteína de mamífero.

10 240. Kit, de acordo com a reivindicação 239, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína humana ou é derivada de uma proteína humana.

241. Kit, de acordo com a reivindicação 240, caracterizado pelo fato de que a proteína humana é $\beta 1$ ou é
15 derivada de $\beta 1$.

242. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237 ou 238, caracterizado pelo fato de que a
20 proteína H-NOX é uma proteína bacteriana ou é derivada de uma proteína bacteriana.

243. Kit de qualquer uma das reivindicações 242, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de *T. tengcongensis* ou é derivada de uma proteína
25 de *T. tengcongensis*.

244. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242 ou 243, caracterizado pelo fato de que o oxigênio está ligado à
30

proteína H-NOX.

245. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 5 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243 ou 244, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína H-NOX mutante de qualquer uma das reivindicações 279-397.

246. Kit, caracterizado por compreender (i) uma 10 proteína H-NOX, em que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 1 nM e cerca de 1 mM a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C e em que a proteína H-NOX não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, e (ii) 15 instruções para utilização do kit para liberar oxigênio a um indivíduo.

247. Kit, de acordo com a reivindicação 246, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX não é β 1 I140Y de *H. sapiens*.

20 248. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246 ou 247, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 2 nM e cerca de 50 μ M a 20°C.

249. Kit, de acordo com a reivindicação 248, 25 caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 50 nM e cerca de 10 μ M a 20°C.

250. Kit, de acordo com a reivindicação 248, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação 30 de O₂ da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 μ M a

20°C.

251. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249 ou 250, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é
5 pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

252. Kit, de acordo com a reivindicação 251, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

10 253. Kit, de acordo com a reivindicação 252, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

15 254. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252 ou 253, caracterizado pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é menor do que $1,0 \text{ s}^{-1}$.

20 255. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253 ou 254, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C.

25 256. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253 ou 254, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é menor ou igual a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C.

30 257. Kit, de acordo com a reivindicação 256, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $0,21 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C.

258. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256 ou 257, caracterizado pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que
5 cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

259. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257 ou 258, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre
10 cerca de 20 nM e 2 μM a 20°C , e em que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

260. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254,
15 255, 256, 257, 258 ou 259, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 μM a 20°C , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

20 261. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259 ou 260, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 μM a 20°C e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s^{-1}
25 a 20°C .

262. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260 ou 261, caracterizado pelo
30 fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre

cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

263. Kit, de acordo com qualquer uma das
5 reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261 ou 262, caracterizado pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de $1,0 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $16,0 \text{ s}^{-1}$ a 20°C e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca
10 de 700 s^{-1} a 20°C .

264. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262 ou 263, caracterizado pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de
15 heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é menor do que $1,8 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

265. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254,
20 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263 ou 264, caracterizado pelo fato de que heme está ligada à proteína H-NOX.

266. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254,
25 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264 ou 265, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína mutante.

267. Kit, de acordo com a reivindicação 266, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende
30 pelo menos uma mutação da bolsa distal.

268. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 266 ou 267, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que não está na bolsa distal.

5 269. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 267 ou 268, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a constante de
10 dissociação de O₂, a k_{off} para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme e/ou a estabilidade do NO, comparadas com aquelas da proteína do tipo selvagem correspondente.

270. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254,
15 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 267, 268 ou 269, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a reatividade de NO, comparada com aquela da proteína do tipo selvagem correspondente.

20 271. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269 ou 270, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma selecionada do grupo que consiste em H-NOX do
25 tipo selvagem de *T. tengcongensis*, H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX
30 W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-

NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de
 5 *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*,
 10 *tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*, 1 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX do tipo selvagem de *D. desulfuricans*, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1 H-NOX do
 15 tipo selvagem de *H. sapiens*, β 1 I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-385) de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-385) I145H de *H. sapiens*, β 1(1-194) de *H. sapiens*, β 1(1-194) I145Y de *H. sapiens*, β 1(1-194) L9W-I145Y de *H. sapiens*, β 2(1-217) de *H. sapiens*, β 2(1-217) I142Y de *H. sapiens*,
 20 β 1 H-NOX H105G de *H. sapiens*, β 1 H-NOX H105F de *H. sapiens*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, β 1(1-385) de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-385) I145H de *R. norvegicus*, β 1(1-194) de *R. norvegicus*, β 1(1-194) I145Y de *R. norvegicus*, β 1(1-194)
 25 L9W-I145Y de *R. norvegicus*, β 2(1-217) de *R. norvegicus*, β 2(1-217) I142Y de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX H105O de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, Cb H-NOX(1-175), Cb H-NOX(1-186), H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de
 30

C. elegans, H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14886 do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG4154 do tipo selvagem de *D. melanogaster*;
 5 H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis*, H-NOX do tipo selvagem de *M. musculus*, H-NOX do tipo selvagem de *C. familiaris*, H-NOX do tipo selvagem de *B. taurus*, *R. norvegicus* do tipo selvagem; H-NOX do tipo
 10 selvagem de *X. laevis*, H-NOX do tipo selvagem de *O. latipes*, H-NOX do tipo selvagem de *O. curivatus*, H-NOX do tipo selvagem de *F. rubripes*, H-NOX do tipo selvagem de *A. gambiae*, H-NOX do tipo selvagem de *M. sexta*; gcy-31 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-32 de *C. elegans*, gcy-33 do
 15 tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-34 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-35 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-36 do tipo selvagem de *C. elegans*, gcy-37 do tipo selvagem de *C. elegans*; H-NOX do tipo selvagem de *V. cholera*, H-NOX do tipo selvagem de *V. fischerii* e H-NOX do tipo selvagem de
 20 *N. punctiforme*.

272. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270 ou 271, caracterizado pelo fato de que a
 25 proteína H-NOX é uma proteína de mamífero ou é derivada de uma proteína de mamífero.

273. Kit, de acordo com a reivindicação 272, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína humana ou é derivada de uma proteína humana.

30 274. Kit, de acordo com a reivindicação 273,

caracterizado pelo fato de que a proteína humana é $\beta 1$ ou é derivada de $\beta 1$.

275. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254,
5 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270 ou 271, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína bacteriana ou é derivada de uma proteína bacteriana.

276. Kit, de acordo com a reivindicação 275,
10 caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína de *T. tengcongensis* ou é derivada de uma proteína de *T. tengcongensis*.

277. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254,
15 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275 ou 276, caracterizado pelo fato de que o oxigênio está ligado à proteína H-NOX.

278. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254,
20 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276 ou 277, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma proteína H-NOX mutante de qualquer uma das reivindicações
25 279-397.

279. Proteína H-NOX isolada, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O_2 ou reatividade de NO, comparadas com a de uma proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente, em
30 que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX

mutante está dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina, em que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina, e em que a proteína H-NOX mutante não é H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis* ou 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*.

280. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 279, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante não é 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster* H-NOX, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis* ou H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*.

281. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279 ou 280, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 2 nM e cerca de 50 μ M a 20°C.

282. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 281, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 50 nM e cerca de 10 μ M a 20°C.

283. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 282, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM e cerca de 1,9 μ M a 20°C.

284. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 283, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 150 nM e cerca de 1 µM a 20°C.

5 285. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282 ou 283, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM e cerca de 255 nM a 20°C.

10 286. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282 ou 283, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 80 nM a 20°C.

15 287. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 286, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 20 nM e cerca de 75 nM a 20°C.

20 288. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286 ou 287, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

25 289. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 288, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

30 290. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288 ou 289, caracterizada pelo fato de que a

reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

291. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 5 286, 287, 288, 289 ou 290, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $0,01$ e cerca de 200 s^{-1} a 20°C .

292. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 10 286, 287, 288, 289, 290 ou 291, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM e cerca de $1,9 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $1,35 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $14,5 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

15 293. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291 ou 292, caracterizada pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

20 294. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292 ou 293, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $1,35 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $14,5 \text{ s}^{-1}$ a 25 20°C , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

295. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293 ou 294, 30 caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da

proteína H-NOX mutante é entre cerca de $1,35 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $14,5 \text{ s}^{-1}$ a 20°C , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

296. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
5 uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285,
286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294 ou 295,
caracterizada pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de
heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX
10 mutante é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

297. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285,
286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295 ou 296,
caracterizada por compreender pelo menos uma mutação da
15 bolsa distal.

298. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285,
286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296 ou
297, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação
20 que não está na bolsa distal.

299. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285,
286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297
ou 298, caracterizada por compreender pelo menos uma
25 mutação na qual um resíduo que corresponde a Ile5, Trp9,
Asn74, Pro115 ou Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* é
substituído por qualquer outro aminoácido.

300. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285,
30 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297,

298 ou 299, caracterizada por compreender pelo menos duas mutações, em que pelo menos uma mutação é a substituição de um resíduo que corresponde a Ile5, Trp9, Asn74, Pro115 ou Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* por qualquer outro aminoácido.

301. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299 ou 300, caracterizada pelo fato de que uma mutação corresponde a uma mutação de I5A, uma mutação de I5L, uma mutação de W9F, uma mutação de Y140H, ou uma mutação dupla de F78Y Y140F de *T. tengcongensis*.

302. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300 ou 301, caracterizada pelo fato de que a mutação corresponde a uma mutação de W9Y, uma mutação de W9H, uma mutação de W9N, uma mutação de N74H, uma mutação de N74A, uma mutação de P115A, uma mutação de R135Q, um mutante duplo de I5L P115A ou um mutante duplo de W9F N74A de *T. tengcongensis*.

303. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301 ou 302, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína de mamífero.

304. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 303, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma

proteína humana.

305. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 304, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é $\beta 1$.

5 306. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301 ou 302, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma
10 proteína bacteriana.

307. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 306, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína de *T. tengcongensis*.

15 308. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306 ou 307, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante não
20 é H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis* ou $\beta 1$ H-NOX (1-385) I145Y de *H. sapiens*.

309. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297,
25 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307 ou 308, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis* ou $\beta 1$ I140Y de *H. sapiens*.

310. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
30 uma das reivindicações 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285,

286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308 ou 309, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante está ligada covalentemente a outra molécula ou
 5 porção.

311. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 310, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante está ligada covalentemente a polietileno glicol.

10 312. Proteína H-NOX isolada, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O₂ ou reatividade de NO, comparada com aquela da proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente, em que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX
 15 mutante está dentro de 2 ordens de magnitude daquela da hemoglobina, em que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina, e em que a proteína H-NOX mutante não é H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T.*
 20 *tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis* ou 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*.

313. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 312, caracterizada pelo fato de que a
 25 proteína H-NOX mutante não é H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, β 1 H-NOX I140Y de *H. sapiens*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, sGC β 1 H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus* sGC, sGC β 1 H-NOX H105G de
 30 *R. norvegicus*, sGC β 1 H-NOX H105F de *R. norvegicus*, β 1 H-

NOX I145Y de *R. norvegicus* sGC, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, β 1 H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster* H-NOX, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis* ou H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*.

314. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312 ou 313, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM e cerca de 255 nM a 20°C.

315. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312 ou 313, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 80 nM a 20°C.

316. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 315, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 20 nM e cerca de 75 nM a 20°C.

317. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315 ou 316, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

318. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 317, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

319. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317 ou 318, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é menor ou igual a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

5 320. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 319, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $0,21 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

10 321. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317 ou 318, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $1,35 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $2,9 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

15 322. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317 ou 318, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $5,8 \text{ s}^{-1}$ e 19 s^{-1} a 20°C .

20 323. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321 ou 322, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante é estável a 4°C no ar.

25 324. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322 ou 323, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação da bolsa distal.

30 325. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323 ou 324, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação que não está na bolsa

distal.

326. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324 ou 325, caracterizada por
5 compreender pelo menos uma mutação na qual um resíduo que corresponde a Ile5, Asn74, Pro115 ou Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* é substituído por qualquer outro aminoácido.

327. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318,
10 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325 ou 326, caracterizada por compreender pelo menos duas mutações, em que pelo menos uma mutação é a substituição de um resíduo que corresponde a Ile5, Trp9, Asn74, Phe78, Pro115 ou Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* por qualquer outro aminoácido.

15 328. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326 ou 327, caracterizada pelo fato de que a mutação corresponde a uma mutação de I5A, uma mutação de I5L, uma mutação de Y140H ou
20 uma mutação dupla de F78Y Y140F de H-NOX de *T. tengcongensis*.

329. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327 ou 328,
25 caracterizada pelo fato de que a mutação corresponde a uma mutação de W9Y, uma mutação de W9H, uma mutação de W9N, a N7411 mutação, uma mutação de N74A, uma mutação de P115A, uma mutação de R135Q, um mutante duplo de I5L P115A ou um mutante duplo de W9F N74A de H-NOX de *T. tengcongensis*.

30 330. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328 ou 329, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína de mamífero.

5 331. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 330, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína humana.

10 332. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 331, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é β 1.

15 333. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 ou 332, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína bacteriana.

20 334. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 333, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína de *T. tengcongensis*.

25 335. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333 ou 334, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis* ou β 1 I140Y de *H. sapiens*.

30 336. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334 ou 335, caracterizada pelo fato de que a

proteína H-NOX mutante está ligada covalentemente a outra molécula ou porção.

337. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 336, caracterizada pelo fato de que a
5 proteína H-NOX mutante está ligada covalentemente a polietileno glicol.

338. Proteína H-NOX isolada, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação que altera a k_{off} para oxigênio ou a reatividade de NO, comparadas com as de uma
10 proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente, em que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 0,01 e cerca de 200 s^{-1} a 20°C, em que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina, e em que a proteína H-NOX
15 mutante não é H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, ou 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophila*.

339. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 338, caracterizada pelo fato de que a
20 proteína H-NOX mutante não é 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster* H-NOX, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do
25 tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis* ou H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*.

340. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
30 uma das reivindicações 338 ou 339, caracterizada pelo fato

de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é menor ou igual a cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

341. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 340, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $0,21 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

342. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340 ou 341, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 1 nM e cerca de 1 mM a 20°C .

343. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341 ou 342, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 2 nM e cerca de $50 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C .

344. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342 ou 343, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 50 nM e cerca de $10 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C .

345. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343 ou 344, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM e cerca de $1,9 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C .

346. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344 ou 345, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 100 vezes menor do que

aquela da hemoglobina.

347. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 346, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 5 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

348. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346 ou 347, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos do 10 que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

349. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347 ou 348, caracterizada pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de 15 menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

350. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348 ou 349, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é 20 entre cerca de 100 nM e cerca de $1,9\text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C .

351. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 25 345, 346, 347, 348, 349 ou 350, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM e cerca de $1,9\text{ }\mu\text{M}$ a 20°C , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

30 352. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350 ou 351, caracterizada pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h^{-1} a 37°C , e em
5 que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

353. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351 ou 352, caracterizada por
10 compreender pelo menos uma mutação da bolsa distal.

354. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352 ou 353, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação que
15 não está na bolsa distal.

355. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353 ou 354, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação na
20 qual um resíduo que corresponde a Ile5, Trp9, Asn74, Pro115 ou Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* ou I145 de $\beta 1(1-385)$ é substituído por qualquer outro aminoácido.

356. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354 ou 355, caracterizada por compreender pelo menos duas mutações, em
25 que pelo menos uma mutação é a substituição de um resíduo que corresponde a Ile5, Trp9, Asn74, Pro115 ou Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* ou I145 de $\beta 1(1-385)$ por qualquer
30 outro aminoácido.

357. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355 ou 356, caracterizada por compreender uma mutação que
5 corresponde a uma mutação de I5A, uma mutação de I5L, uma mutação de W9F, uma mutação de Y140F, uma mutação de Y140H, uma mutação dupla de W9F Y140H ou uma mutação dupla de F78Y Y140F de *T. tengcongensis* ou uma mutação de I145Y de β 1.

358. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
10 uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356 ou 357, caracterizada por compreender uma mutação que corresponde a uma mutação de W9Y, uma mutação de W9H, uma mutação de W9N, uma mutação de N74H, uma mutação de N74E,
15 uma mutação de N74A, uma mutação de P115A, uma mutação de R135Q, uma mutante duplo de I5L P115A, um mutante duplo de N74A Y140H, ou um mutante duplo de W9F N74A de *T. tengcongensis*.

359. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
20 uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357 ou 358, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína de mamífero.

360. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a
25 reivindicação 359, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína humana.

361. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 360, caracterizada pelo fato de que a
30 proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é β 1.

362. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360 ou 361, caracterizada pelo fato de que a
 5 proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína bacteriana.

363. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 362, caracterizada pelo fato de que a
 10 proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína de *T. tengcongensis*.

364. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362 ou 363, caracterizada pelo
 15 fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $1,35 \text{ s}^{-1}$ e 18 s^{-1} a 20°C .

365. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356,
 20 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363 ou 364, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante não é H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis* ou $\beta 1$ H-NOX (1-385) I145Y de *H. sapiens*.

366. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
 25 uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364 ou 365, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis* ou $\beta 1$ I140Y de *H.*
 30 *sapiens*.

367. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365 ou 366, 5 caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante está ligada covalentemente a outra molécula ou porção.

368. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 367, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante está ligada covalentemente a 10 polietileno glicol.

369. Proteína H-NOX isolada, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação que altera a k_{off} para oxigênio ou reatividade de NO comparadas com aquelas da proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente, em que a 15 k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é de menos de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 10 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

370. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a 20 reivindicação 369, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante não é H-NOX Y40L de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y/Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y 25 de *L. pneumophila*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophila*, $\beta 1$ H-NOX I140Y de *H. sapiens*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, *R. norvegicus* sGC $\beta 1$ H-NOX (1-385), sGC $\beta 1$ H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus*, sGC $\beta 1$ H-NOX H105G de *R. norvegicus*, sGC $\beta 1$ H-NOX H105F de *R.* 30 *norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX I145Y de *R. norvegicus* sGC, $\beta 1$ H-NOX

do tipo selvagem de *R. norvegicus*, $\beta 1$ H-NOX do tipo selvagem de *D. melanogaster*, CG14885-PA do tipo selvagem de *D. melanogaster* H-NOX, GCY-35 H-NOX do tipo selvagem de *C. elegans*, H-NOX do tipo selvagem de *N. punctiforme*, H-NOX do tipo selvagem de *C. crescentus*, H-NOX do tipo selvagem de *S. oneidensis* ou H-NOX do tipo selvagem de *C. acetobutylicum*.

371. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369 ou 370, caracterizada pelo fato de que a k_{off} para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de $0,21 \text{ s}^{-1}$ e cerca de $0,65 \text{ s}^{-1}$ a 20°C .

372. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370 ou 371, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O_2 da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM e cerca de $1,9 \text{ }\mu\text{M}$ a 20°C .

373. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371 ou 372, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 100 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

374. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 373, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é pelo menos 1.000 vezes menor do que aquela da hemoglobina.

375. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373 ou 374, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s^{-1} a 20°C .

376. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374 ou 375, caracterizada pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h⁻¹ a 37°C.

377. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375 ou 376, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM e cerca de 1,9 µM a 20°C, e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h⁻¹ 37°C.

378. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376 ou 377, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM e cerca de 1,9 µM a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos de 0,7 s⁻¹.

379. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377 ou 378, caracterizada pelo fato de que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 1 h⁻¹ a 37°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s⁻¹ a 20°C.

380. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378 ou 379, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação da bolsa distal.

381. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379 ou 380, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação que não está na bolsa distal.

382. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
5 uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380 ou 381, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação na qual um resíduo que corresponde a Ile5, Asn74, Pro115 ou Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* é substituído por qualquer outro aminoácido.

10 383. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381 ou 382, caracterizada por compreender pelo menos duas mutações, em que pelo menos uma mutação é a substituição de um resíduo que corresponde a
15 Ile5, Trp9, Asn74, Phe78, Pro115 ou Arg135 de H-NOX de *T. tengcongensis* por qualquer outro aminoácido.

384. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382 ou 383, caracterizada por
20 compreender uma mutação que corresponde a uma mutação de I5A de H-NOX de *T. tengcongensis*.

385. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383 ou 384,
25 caracterizada por compreender uma mutação que corresponde a uma mutação de N74H, uma mutação de N74E, uma mutação de N74A, uma mutação de P115A ou um mutante duplo de I5L P115A de H-NOX de *T. tengcongensis*.

386. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer
30 uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375,

376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384 ou 385, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína de mamífero.

387. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a
5 reivindicação 386, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína humana.

388. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a
10 reivindicação 387, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é β 1.

389. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387 ou 388, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do
15 tipo selvagem correspondente é uma proteína bacteriana.

390. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 389, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína de *T. tengcongensis*.

20 391. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389 ou 390, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante não é H-NOX Y140H de *T. tengcongensis* ou β 1
25 I140Y de *H. sapiens*.

392. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390 ou 391, caracterizada pelo fato de que a
30 proteína H-NOX mutante está ligada covalentemente a outra

molécula ou porção.

393. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 392, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante está ligada covalentemente a polietileno glicol.

394. Proteína H-NOX isolada caracterizada por ser selecionada do grupo que consiste em H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*; H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, L2 F9 W-F142Y, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1(1-385), β 1(1-385) I145Y, β 1(1-385) I145H, β 1(1-194), β 1(1-194) I145Y, β 1(1-194) L9WI145Y, β 2(1-217), β 2(1-217) I142Y, H-NOX(1-175) de *C. botulinum*, H-NOX(1-186) de *C. botulinum*, H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum* e H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*.

395. Proteína H-NOX isolada caracterizada pelo fato de ser selecionada do grupo que consiste em H-NOX I5A de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L de *T. tengcongensis*, H-NOX I5L-

P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140L de *T. tengcongensis*, H-NOX W9F-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX W9FN74A de *T. tengcongensis*, H-NOX W9Y de *T. tengcongensis*, H-NOX W9N de *T. tengcongensis*, H-NOX W9H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74E de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A de *T. tengcongensis*, H-NOX N74H de *T. tengcongensis*, H-NOX N74A-Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX F78Y-Y140F de *T. tengcongensis*, H-NOX P115A de *T. tengcongensis*, H-NOX R135Q de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140H de *T. tengcongensis*, H-NOX Y140A de *T. tengcongensis*, I75F-His6 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 F9W-F142Y de *L. pneumophila*, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*, β 1(1-385) I145H, β 1(1-194), β 1(1-194) I145Y, β 1(1-194) L9W-I145Y, β 2(1-217), β 2(1-217)I142Y, Cb H-NOX(1-175), Cb H-NOX(1-186), H-NOX(1-197) de *C. acetobutylicum*, H-NOX(1-183) de *C. acetobutylicum*, e H-NOX GCY-35(1-252) de *C. elegans*.

396. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394 ou 395, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O₂ da proteína H-NOX está dentro de 2 ordens de magnitude daquela de hemoglobina alfa de *Homo sapiens*.

397. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395 ou 396, caracterizada pelo fato de que a reatividade de NO da proteína H-NOX é pelo menos 10 vezes menor do que aquela de hemoglobina alfa de *Homo sapiens*.

398. Ácido nucléico recombinante caracterizado por codificar uma proteína H-NOX de qualquer uma das reivindicações 279-397.

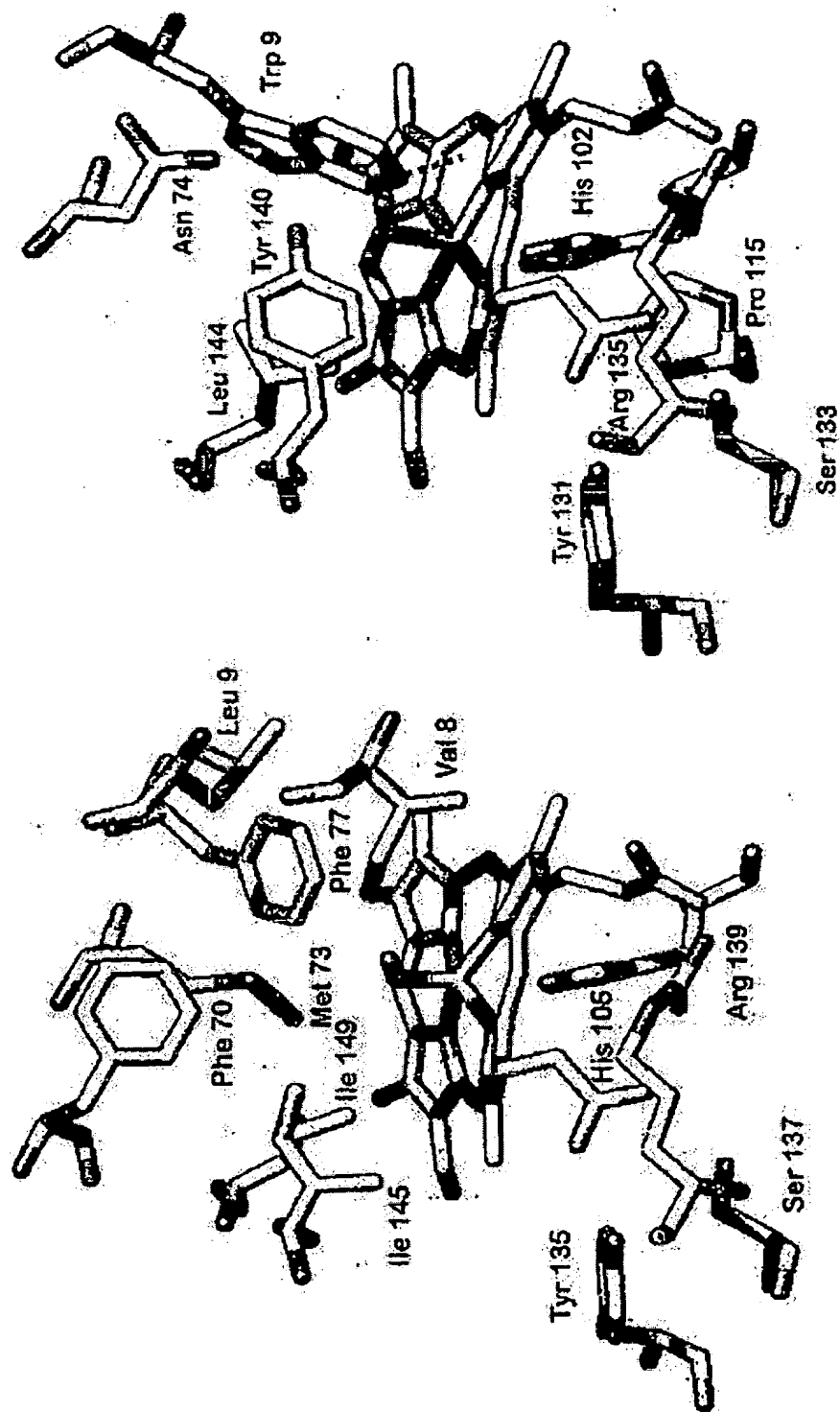
5 399. Vetor, caracterizado por compreender um ácido nucléico da reivindicação 398.

400. Célula, caracterizada por compreender um ácido nucléico da reivindicação 398.

401. Célula, caracterizada por compreender um vetor da reivindicação 399.

10 402. Método de produção de uma proteína H-NOX, caracterizado por compreender o cultivo de uma célula que compreende um ácido nucléico que codifica uma proteína H-NOX de qualquer uma das reivindicações 279-397 sob condições adequadas à produção da proteína.

15 403. Método, de acordo com a reivindicação 402, caracterizado ainda por compreender a etapa de purificação da proteína H-NOX.



modelo de homologia de $\beta 1$ de Homo sapiens H-NOX de *T. tengcongensis*

Figura 1A

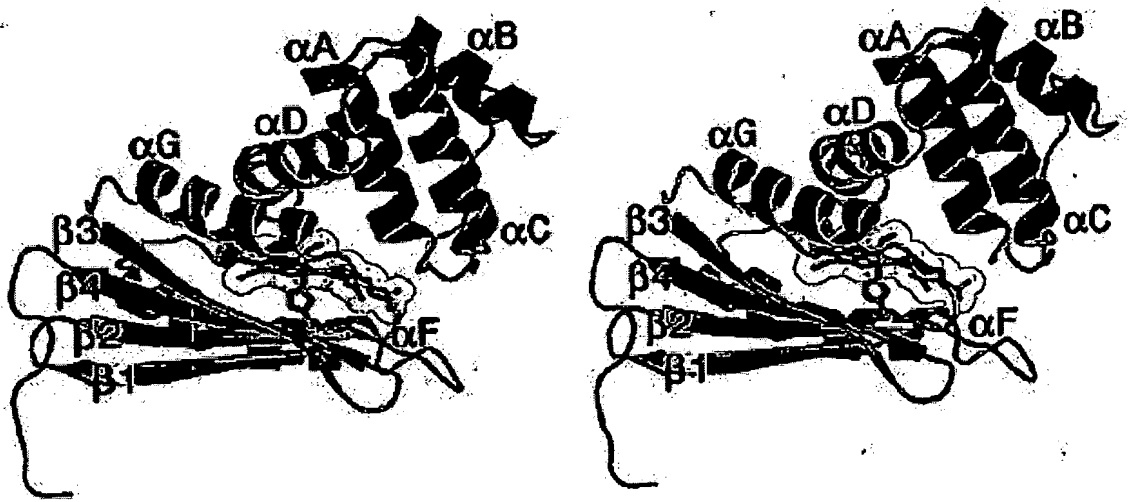
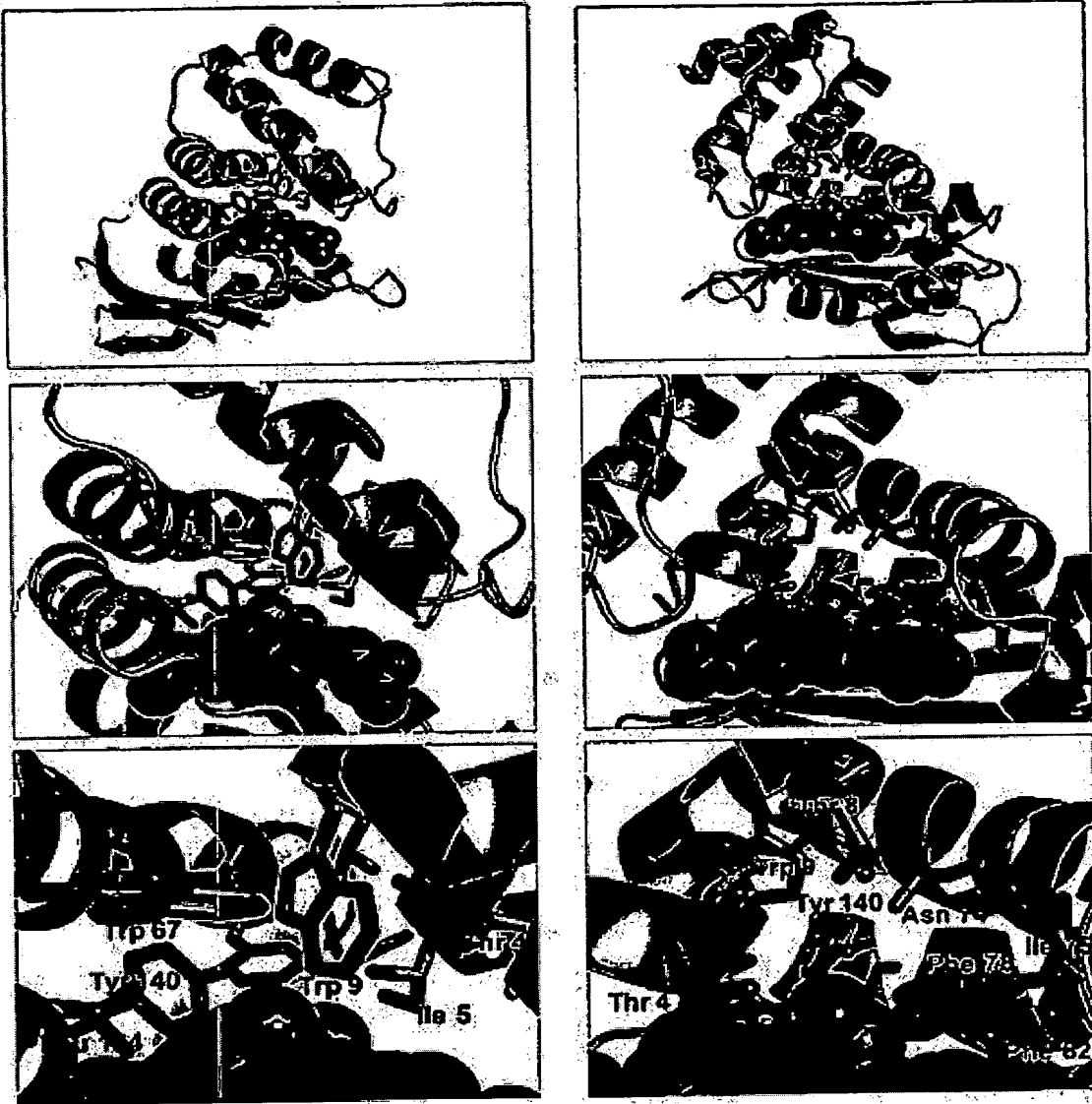


Figura 1B



Figuras 1C-1H

Exemplos de H-NOX de ligação de oxigênio

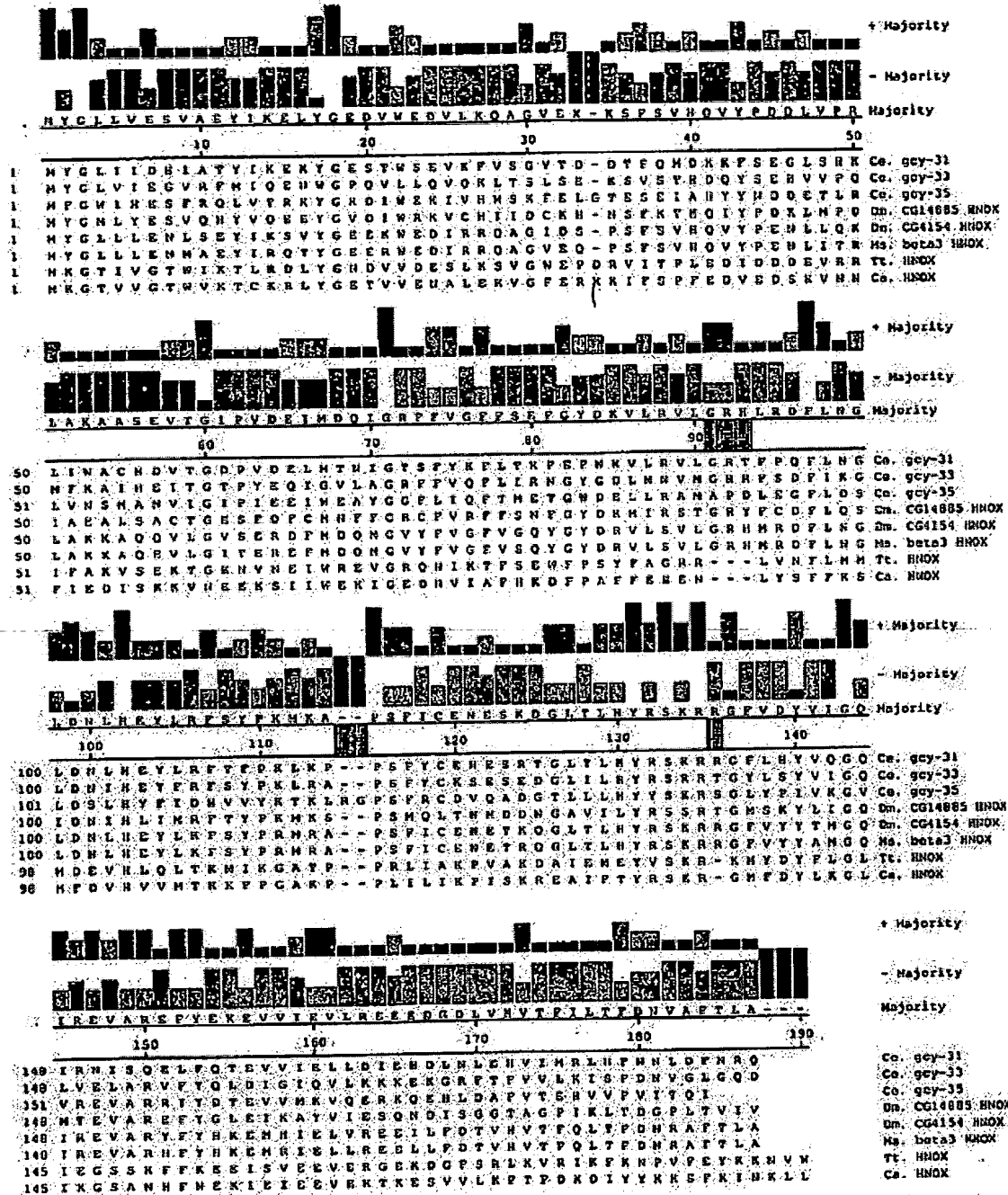


Fig. 2

Exemplos de H-NOX de ligação de NO

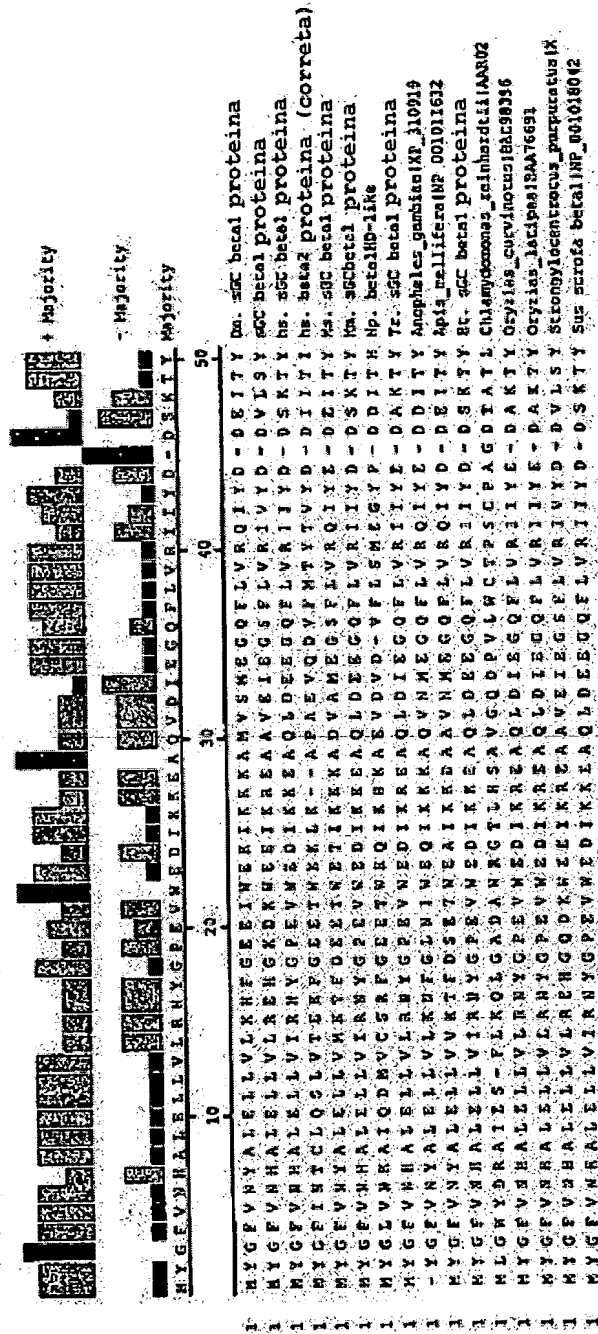


Figura 3A

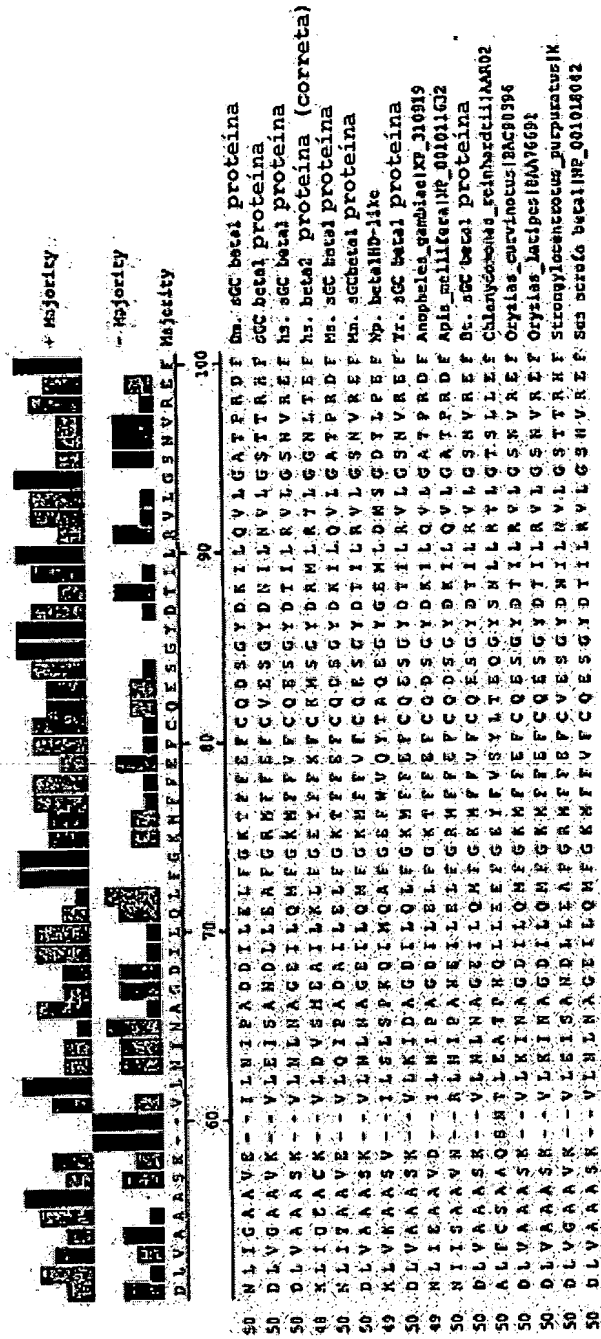


Figura 3B

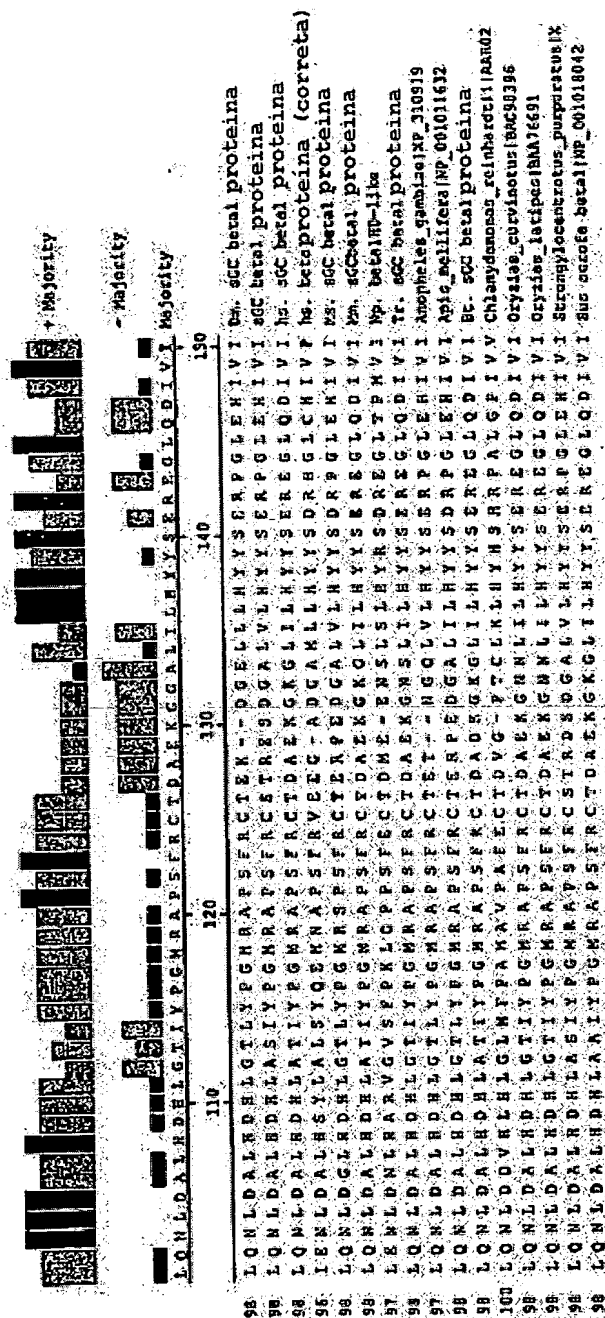


Figura 3C

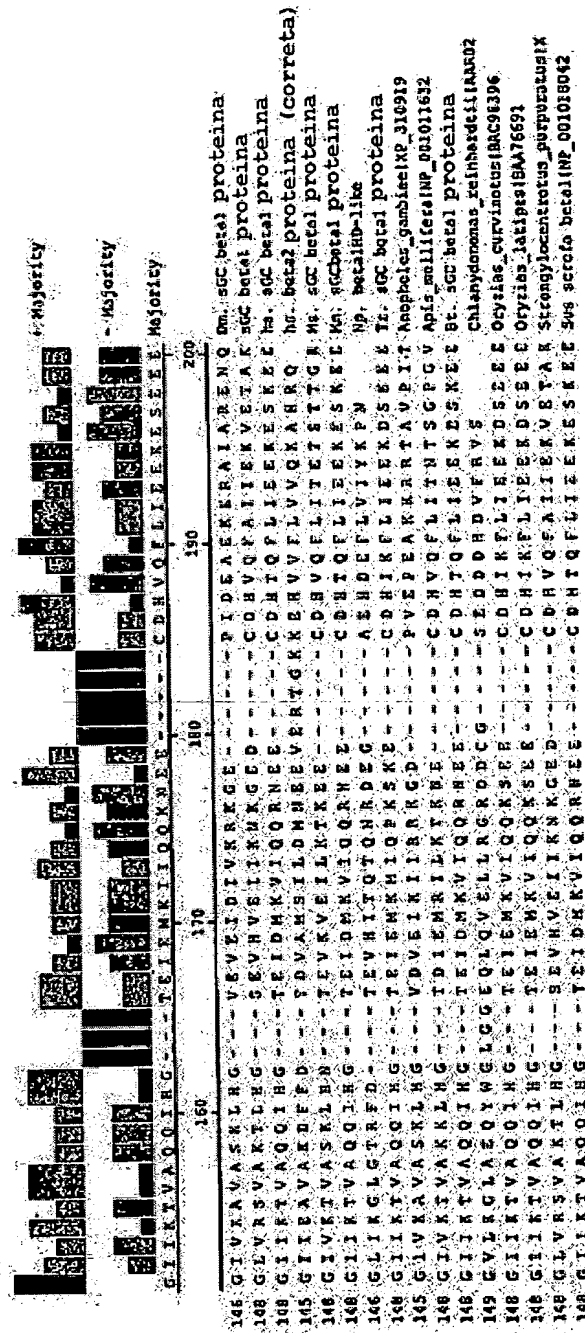


Figura 3D

Exemplos de H-NOX de ligação de oxigênio e NO

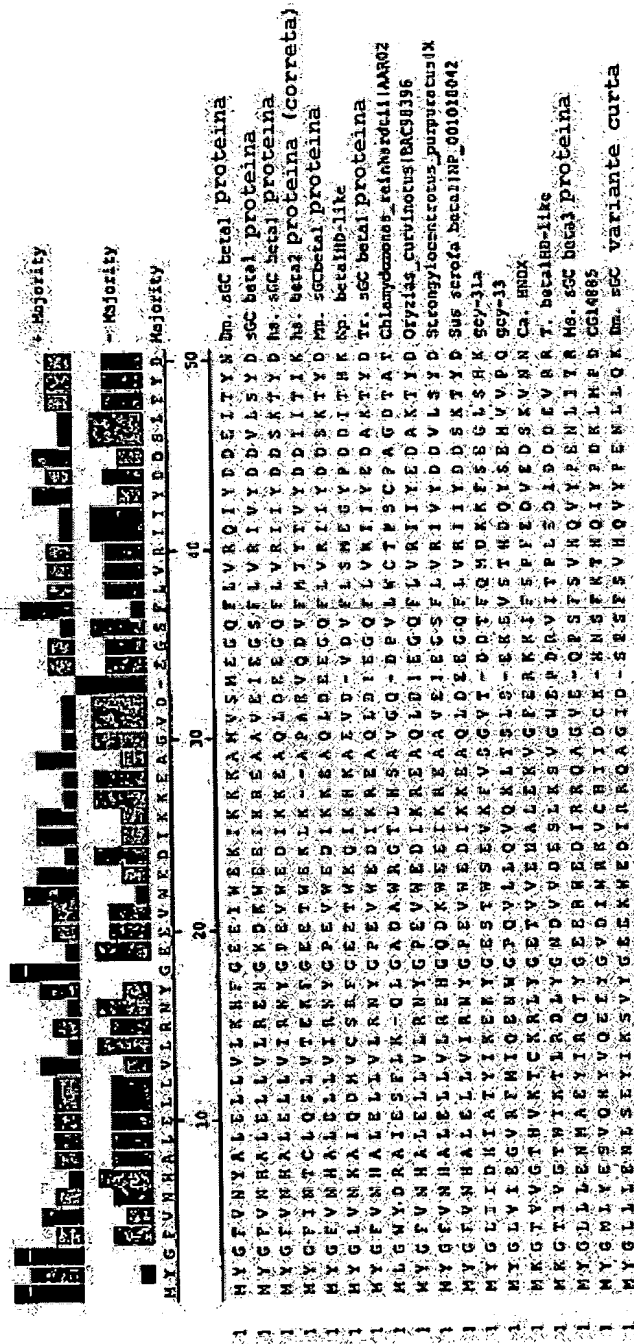


Figura 4A

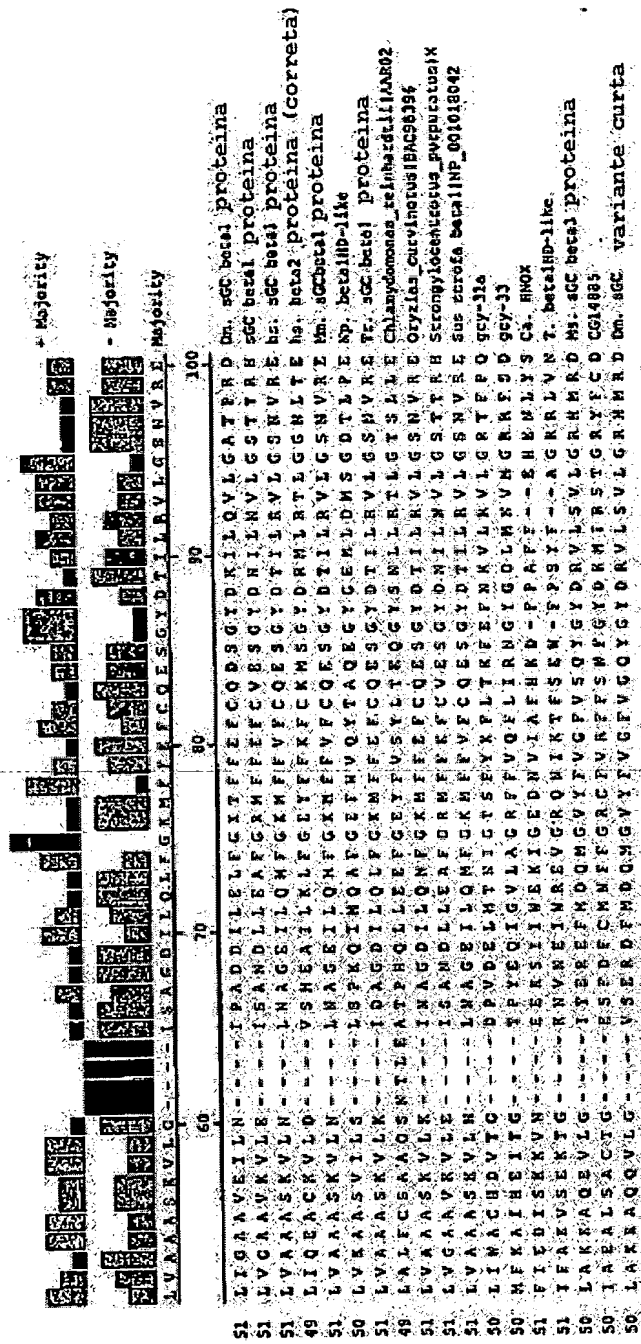


Figura 4B

variante curta

Figura 4D

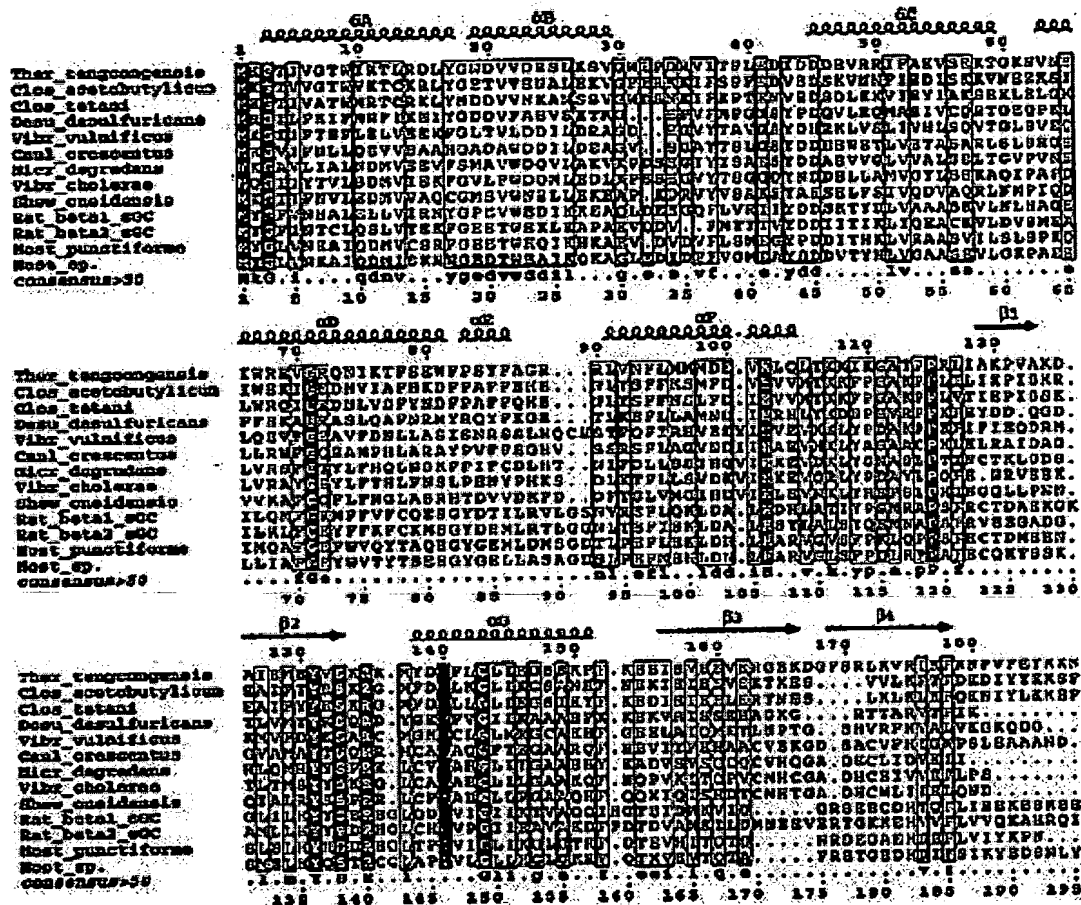
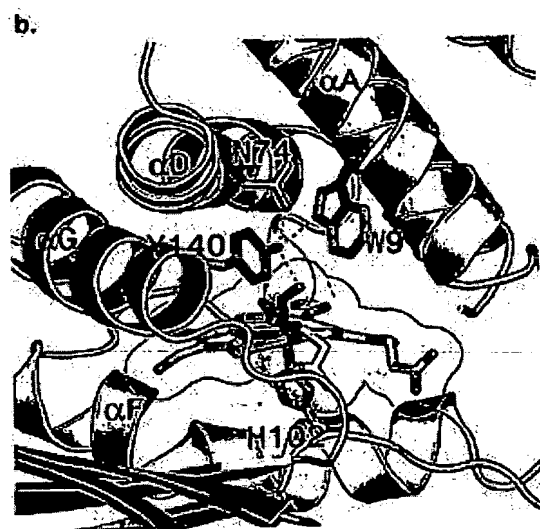
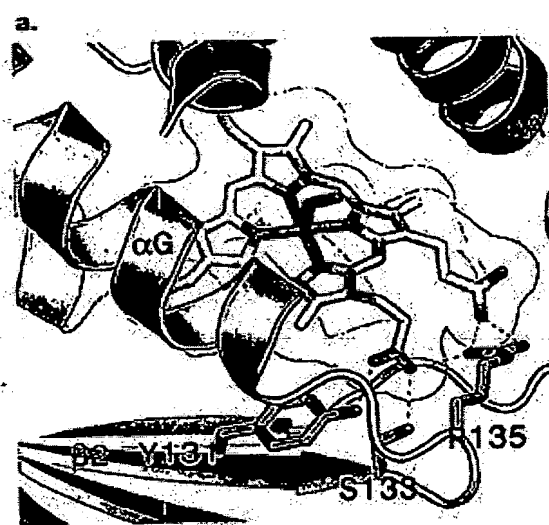
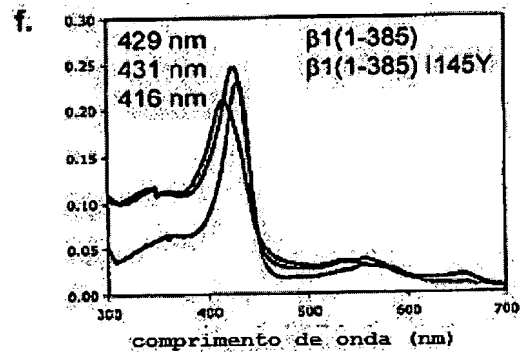
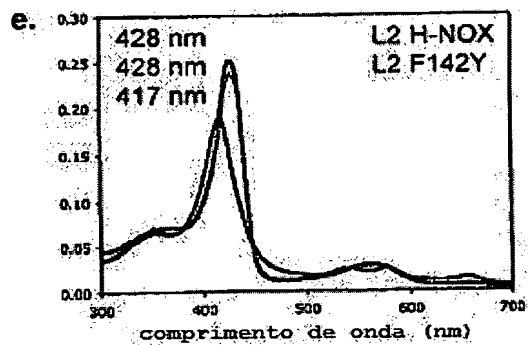
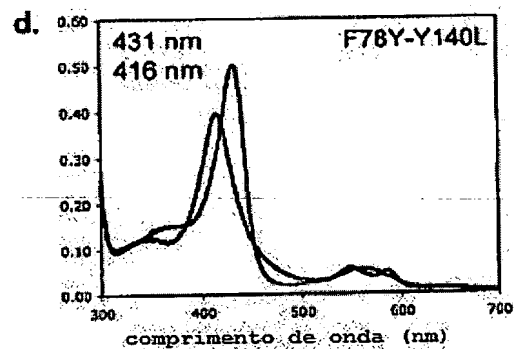
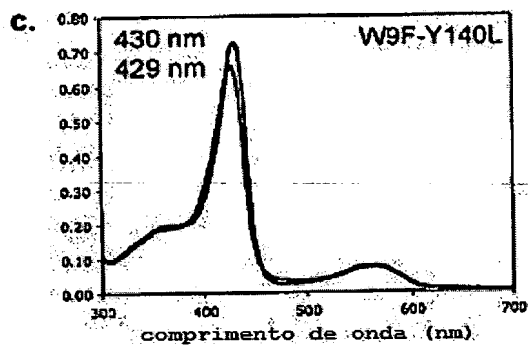
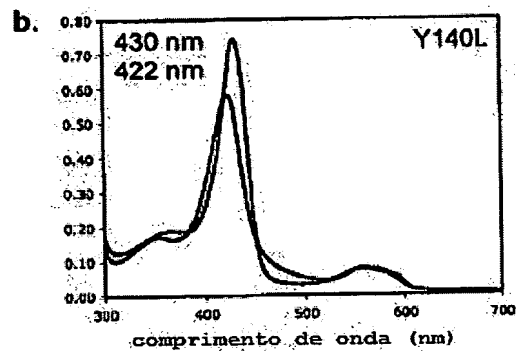
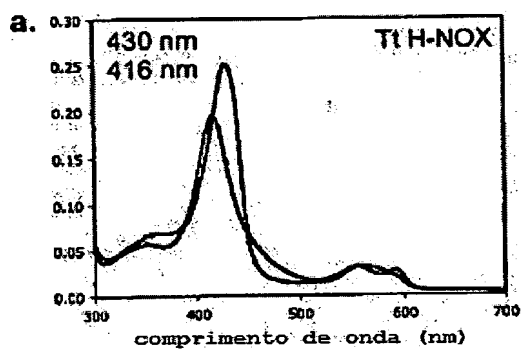


Figura 5B

Figuras 6A e 6B



Figuras 7A-7F



Sequências de H-NOX mutante e a WT H-NOX parente

NUCLEOTÍDOS seguidos por AMINOÁCIDOS

Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOX

Tl. WT

(ID. DE SEQ. n°: 53)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAATAAACTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTATAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGGAAGAGGTGCAAGAGGCCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:54)

MKGITIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVGVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
WREVGRQNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

Tl. Y140F

(ID. DE SEQ. n°: 55)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAATAAACTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTTCITTTTATAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGGAAGAGGTGCAAGAGGCCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:56)

MKGITIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVGVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
WREVGRQNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

Figura 8A

TL Y140L

(ID. DE SEQ. N°: 57)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATCTTTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGCGAAAGAGGCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:58)

MKGITVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDLFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL Y140H

(ID. DE SEQ. N°: 59)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATCACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGCGAAAGAGGCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 60)

MKGITVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDHLFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL Y140A

(ID. DE SEQ. N°: 61)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATGCCTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGCGAAAGAGGCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 62)

MKGITVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDAFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

Figura 8B

TL W9F

(ID. DE SEQ. N°: 63)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTTATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGGAAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:64)

MKGTIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL W9F/Y140L

(ID. DE SEQ. N°: 65)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTTATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTTTTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGGAAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:66)

MKGTIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDFFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL W9F/Y140H

(ID. DE SEQ. N°: 67)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTTATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATCACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGGAAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 68)

MKGTIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDHFGLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

Figura 8C

TL W9E-N74A

(ID. DE SEQ. N°: 69)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTTATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGAACCAAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGCAATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAGAGGTGCAAAAGAGCGCAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 70)

MKGTIVGTPIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEFDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKKNVNEI
 WREVGRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL W9Y

(ID. DE SEQ. N°: 71)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATACATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGAACCAAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAGAGGTGCAAAAGAGCGCAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:72)

MKGTIVGTPIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEFDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKKNVNEI
 WREVGRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL W9N

(ID. DE SEQ. N°: 73)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACAAATATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGAACCAAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAGAGGTGCAAAAGAGCGCAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 74)

MKGTIVGTPIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEFDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKKNVNEI
 WREVGRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

Figura 8D

TL W9H

(ID. DE SEQ. N° 75)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACACACATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N° 76)

MKGTIVGTHIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
WREVGRQNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDYFLGLIEGSSKFFKBEISVBEVERGEKDGFSRLKVRJKFKNPVFE

TL 15A

(ID. DE SEQ. N° 77)

ATGAAGGGGACAGCAGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N° 78)

MKGTAVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNE
IWREVGRQNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDYFLGLIEGSSKFFKBEISVBEVERGEKDGFSRLKVRJKFKNPVFE

TL 15L

(ID. DE SEQ. N° 79)

ATGAAGGGGACACTTGTCTGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N° 80)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNE
IWREVGRQNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDYFLGLIEGSSKFFKBEISVBEVERGEKDGFSRLKVRJKFKNPVFE

Figura 8E

TL ISL-P115A

(ID. DE SEQ. N°: 81)

ATGAAGGGGACACTTGTCTGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTGCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGCAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 82)

MKGTLVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNE
IWREVGQRNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQTKMIKGATPARLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL P115A

(ID. DE SEQ. N°: 83)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTGCCAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGCAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 84)

MKGTVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
WREVGQRNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQTKMIKGATPARLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL N74E

(ID. DE SEQ. N°: 85)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGAAATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGCAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTATAAGAAA
AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 86)

MKGTVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
WREVGQRNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEMEY
VSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFBYKKN

Figura 8F

7L N74A/Y140H

(ID. DE SEQ. N°: 87)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGCCATAAAAACTTTAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATCACTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTATAAGAAA
 AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 88)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNLFMMMDDEVHQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMVDHFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFYKKN

7L R135Q-His6

(ID. DE SEQ. N°: 89)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAACAGAAAGATGTACGATTACTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTATAAGAAA
 AATCTCGAGCACCACCAACCACCACTGA

(ID. DE SEQ. N°: 90)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNLFMMMDDEVHQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKQKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFYKKNLEHHHHHH

Figura 8G

TL N74A

(ID. DE SEQ. N°: 91)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGCCATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTCACTGGAAGAGGTGCAAAGAGGCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCGTTTTTGAAGTATAAGAAA
 AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 92)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNPVFEYKKN

TL N74A-His6

(ID. DE SEQ. N°: 93)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGCCATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTCACTGGAAGAGGTGCAAAGAGGCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCGTTTTTGAAGTATAAGAAA
 AATCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

(ID. DE SEQ. N°: 94)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNPVFEYKKNLEHHHHHH

Figura 8H

Tz. W9N

(ID. DE SEQ. N°: 95)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACAAATATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCOTTTTTGA GTATAAGAAA
 AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 96)

MKGTIVGTNIKTLRDLYGNDVVDESLSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGQRNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFYKKN

Tz. W9H

(ID. DE SEQ. N°: 97)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACACATATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGA GTATAAGAAA
 AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 98)

MKGTIVGTHIKTLRDLYGNDVVDESLSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGQRNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFYKKN

Figura 8I

7L N74H

(ID. DE SEQ. N°: 99)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGCATATAAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGAAAAGAGGCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAAGTATAAGAAA
 AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 100)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKKNVNEI
 WREVGRQHIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFEYKKN

7L I75F

(ID. DE SEQ. N°: 101)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACTTCAAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGAAAAGAGGCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGCACCACCAC
 CACCACCACTGA

(ID. DE SEQ. N°: 102)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKKNVNEI
 WREVGRQNFKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFEHHHHHH

Figura 8J

7. L144E

(ID. DE SEQ. N°: 103)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAGGGTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGCACCACCAC
 CACCACCACTGA

(ID. DE SEQ. N°: 104)

MKGTIVGTWIKLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNPVFEHHHHHHH

7. WT-His6

(ID. DE SEQ. N°: 105)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAG
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAGGGCTTATAG
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTATAAGAAA
 AATCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

(ID. DE SEQ. N°: 106)

MKGTIVGTWIKLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNPVFEYKKNLEHHHHHHH

Figura 8K

Legionella pneumophila ORF2L2 WT

(ID. DE SEQ. N: 107)

ATGATGTCTATGAAAGGAATCATATTCAACGAATTTCTCAATTTTGTAGAAAAAAGTGAATCC
TACACCCTGGTAGATCAAATTATTATGGATAGTCATTTGAAGTCCCATGGTGCCTACACGTCT
ATCGGTACATACTCTCCCAAAGAATTATTTCAATTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGC
AAACCAACATCAGTGATTTTACAAGAATATGGTGAGTATTTGTTTGAGGTTTTGCAAAAAAA
TATCCTCAATTTTTCAGGGAAAAAAAGTCGGTGTTTCAATTTTGGGAAGCGCTTGAAACACAT
ATTCAATTTTGAAGTGAAAAAATTGTATGACTATACTGAACTACCCCATTTTGAATGCCAATAT
CACAGTCAAAATCAAATGGAATGATTTACACTTCTTCGCGTCCTTTGGCCGATTTTGCGGAA
GGTTTAATAAAAGGTTGTATTAATATCATAAAGAAAAACATGACTATTGTTCTGTGAAAATCTG
CCTGCAAAAACAGGCTTTAAGGTAAGATTTGTATTAACAAAAGGCGATCCTGATGAGTGA

(ID. DE SEQ. N: 108)

MMSMKGIHNEFLNFVEKSESYTLVDQIIMDSHLKSHGAYTSIGTYSKELFQLVKALAMKNGKPT
SVILQEYGEYLFVFAKKYPQFFREKKSVFQFLEALETHIHFEVKKLYDYTELPHFECQYHSQNQM
EMIYTSSRPLADFAEGLIKGCIKYHKENMTIVRENLPAGTKGKVRVLTGDPDE

L2 F142Y

(ID. DE SEQ. N: 109)

ATGATGTCTATGAAAGGAATCATATTCAACGAATTTCTCAATTTTGTAGAAAAAAGTGAATCC
TACACCCTGGTAGATCAAATTATTATGGATAGTCATTTGAAGTCCCATGGTGCCTACACGTCT
ATCGGTACATACTCTCCCAAAGAATTATTTCAATTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGC
AAACCAACATCAGTGATTTTACAAGAATATGGTGAGTATTTGTTTGAGGTTTTGCAAAAAAA
TATCCTCAATTTTTCAGGGAAAAAAAGTCGGTGTTTCAATTTTGGGAAGCGCTTGAAACACAT
ATTCAATTTTGAAGTGAAAAAATTGTATGACTATACTGAACTACCCCATTTTGAATGCCAATAT
CACAGTCAAAATCAAATGGAATGATTTACACTTCTTCGCGTCCTTTGGCCGATTTATGCGGAA
GGTTTAATAAAAGGTTGTATTAATATCATAAAGAAAAACATGACTATTGTTCTGTGAAAATCTG
CCTGCAAAAACAGGCTTTAAGGTAAGATTTGTATTAACAAAAGGCGATCCTGATGAGTGA

(ID. DE SEQ. N: 110)

MMSMKGIHNEFLNFVEKSESYTLVDQIIMDSHLKSHGAYTSIGTYSKELFQLVKALAMKNGKPT
SVILQEYGEYLFVFAKKYPQFFREKKSVFQFLEALETHIHFEVKKLYDYTELPHFECQYHSQNQM
EMIYTSSRPLADYAEGLIKGCIKYHKENMTIVRENLPAGTKGKVRVLTGDPDE

Figura 8L

L2 F9W-F142Y

(ID. DE SEQ. N°: 111)

ATGATGTCTATGAAAGGAATCATATGGAACGAATTTCTCAATTTTGTAGAAAAAAGTGAATCC
TACACCCTGGTAGATCAAATTATTATGGATAGTCATTTGAAGTCCCATGGTGCCTACACGCT
ATCGGTACATACTCTCCCAAAGAATTATTCAATTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGC
AAACCAACATCAGTGATTTTACAAGAATATGGTGAGTATTTGTTTGAGGTTTTTGCAAAAAA
TATCCTCAATTTTTCAGGGAAAAAAGTCGGTGTTCATTTTGGGAAGCGCTTGAAACACAT
ATTCAATTTTGAAGTGAAAAAATTGTATGACTATACTGAACCTACCCCATTTTGAATGCCAATAT
CACAGTCAAAATCAAATGGAAATGATTTACACTTCTTCGCGTCCTTTGGCCGATTATGCGGAA
GGTTTAATAAAAGGTTGTATTAAATATCATAAAGAAAAACATGACTATTGTTTCGTGAAAAATCTG
CCTGCAAAAACAGGCTTTAAGGTAAGATTTGTATTAAACAAAAGGCGATCCTOATGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 112)

MMSMKGHIWNEFLNFVEKSESYTLVDQIIMDSHLKSHGAYTSIGTYSPELQFQVKALAMKNGKP
TSVILQBYGEYLFVFAKKYPQFFREKKSVMQFLEALETHIHFEVKKLYDYTELPHFECQYHSQNG
MEMIYTSSRPLADYAEGLIKGCIKYHKNMTIVRENLPKATGFKVRFLTKGDPDE

Legionella pneumophila ORF1LI WT

(ID. DE SEQ. N°: 113)

ATGAAAGGTATCGTTTTTACCTCCTTAAATGACATGATTATAGAACAATTTGGCATAGAAACC
TGGGACCAACTCGTATCCTCACTAGACCTTCCAAGTGGTGGAAGTTATACAGCAGGCGGCACT
TACTCGGATACAGAATTTACGAATTGATTAAGGCCATTGCGAAGAGGACCAATCAGCAGGCT
TCTGTTTTTTTAGAGGCCTTTGGTGAATACATGTTTCTATCTTATCGAGTAAGTGCGCAATTTT
TTAAAAAAGGACATGACATTAAGAATTTTAAAAAGCATTGATGGAACAATTCATGTGG
AAGTAGAAAAGTTATACCCAGATGAAACATTACCTACCATTAGCTATGAAGAGCCTGCTGCA
AACCAATTGTTATGGTGTATCGATCGCATAGAAGACTCTGTCAATTTTGAATGGGGCTCATC
CAGGGAGCAGCGCAACATTTTAAAAAGAAAATTACCATTAAGCAGACTCACTGCATGTTAAA
AAAAGATGATCATTGTCGTTTGGAGATTACCTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 114)

MKGIVFTSLNDMHEQFGIETWDQLVSSLDLPSSGGSYTAGGTYSDFEQQLIKALAKRTNQHASVFL
EAFGEYMFILSSKCAIFLKKDMLKEFLKSIDGTHVEVEKLYPDETLPITISYEPAANQLVMVYR
SHRRLCHFAMGLIQGAAQHFKKITIKQTHCMLKKDDHCRLEITFE

Figura 8M

LI F142Y

(ID. DE SEQ. N°: 115)

ATGAAAGGTATCGTTTTTACCTCCTTAAATGACATGATTATAGAACAAATTTGGCATAGAAACC
 TGGGACCAACTCGTATCCTCACTAGACCTTCCAAGTGGTGGAAAGTTATACAGCAGCGGCACT
 TACTCGGATACAGAATTTTCAGCAATTGATTAAGGCCATTGCGAAGAGGACCAATCAGCACGCT
 TCTGTTTTTTTAGAGGCCTTTGGTGAATACATGTTTCCTATCTTATCGAGTAAGTGCGCAATTTT
 TTTAAAAAAGGACATGACATTAAGAAATTTTAAAAAAGCATTGATGGAACAATTCATGTGG
 AAGTAGAAAAGTTATACCCAGATGAAACATTACCTACCATTAGCTATGAAGAGCCTGCTGCA
 AACCAATTGGTTATGGTGTATCGATCGCATAGAAGACTCTGTCATTACGCAATGGGGCTCATC
 CAGGGAGCAGCGCAACATTTTAAAAAGAAAATTACCATTAAAGCAGACTCACTGCATGTTAAA
 AAAAGATGATCATTGTCGTTTGGAGATTACCTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 116)

MKGIVFTSLNDMIEQFGIETWDQLVSSLDLPSSGGSYTAGGTYSDETFQQLIKAIKRTNQHASVFL
 EAFGEYMPFILSSKCAJFLKKDMLKEFLKSIDGTHIVEVEKLYPDETLPTISYEPAANQLVMVYR
 SHRRLCHYAMGLIQGAAQHFKKKITKQTHCMLKKDDHCRLEITFE

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

(ID. DE SEQ. N°: 117)

ATGAAGATGCGCGGTATTTTGCCGAAAATATTTATGAATTTTATAAAAGAGATCTATGGGGAT
 GACGTGTTTGCTCATGTTTCTAAAACCATGGGCGAGCCTGTCTTCATGCCGGGAAATTCCTACC
 CTGATCAGGTGTTGCGCCAGATGGCTGAAATAGTATGCCAGCGCACGGGCGAACAGCCCAAG
 TTGTTTTTTGAAAAAGCAGGGCGTGCAAGCCTGCAGGCTTTTAAACAGAATGTACAGGCAGTAC
 TTTAAAGGGGAAACCCTTAAAGAGTTTCTGCTGGCCATGAATGATATCCACAGGCACCTGACA
 AAGGACAATCCCGGCGTAACGCCCCCTTAAATTTGAGTATGACGATCAGGGCGATACGCTTGT
 ATGACATATAAGTCCGAGAGGGATTACGGAGAATACITTTGTGGGCATCATCAAGGCAGCTGC
 GGAGTTTTAAAAAGGAAAAAGTGCATATCAGCTCGGAGCATGCCGGTAAGGGGCGAACAAACG
 GCAAGGGTTACATTTATTAATGA

(ID. DE SEQ. N°: 118)

MKMRGILPKIFMNFKEIYGDDVFAHVSKTMGEPVFMPGNSYPDQVLRQMAEIVCQRTGEQPKLF
 FEKAGRASLQAFNRMVYQYFKGETLKEFLAMNDIHRHLTKDNPGVRPPKFEYDDQGDTLVMTY
 KSQRDYGEYFVGIIKAAAEFKKEKVRJSSEHAGKGRRTARVTFIK

Figura 8N

Dd. Y139L (728-899)

(ID. DE SEQ. N°: 119)

ATGAAGATGCGCGGTATTTTGGCGAAAATATTTATGAATTTTATAAAAAGAGATCTATGGGGAT
 GACGTGTTTGCTCATGTTTCTAAAACCATGGGCGAGCCTGTCTTCATGCCGGGAAATTCCTACC
 CTGATCAGGTGTTGCGCCAGATGGCTGAAATAGTATGCCAGCGCACGGGCGAACAGCCCAAG
 TTGTTTTTTGAAAAAGCAGGGCGTGCAAGCCTGCAGGCTTTTAACAGAATGTACAGGCAGTAC
 TTTAAAGGGGAAACCCTTAAAGAGTTTCTGCTGGCCATGAATGATATCCACAGGCACCTGACA
 AAGGACAATCCCGGCGTACGCCCGCCTAAATTTGAGTATGACGATCAGGGCGOATACGCTTGTT
 ATGACATATAAGTCGCAGAGGGATTACGGAGAACTTTTGTGGGCATCATCAAGGCAGCTGC
 GGAGTTTTAAAAAAGGAAAAAOTGCGTATCAGCTCGGAGCATGCCCGTAAGGGGCGAACAACG
 GCAAGGGTTACATTTATTAATGA

(ID. DE SEQ. N°: 120)

MKMRGILPKIFMFIKEIYGDDVFAHVSKTMGEPVFMPSNSYPDQVLRMAEIVCQRTGEQPKLF
 FEKAGRASLQAFNRMRYQYFKGETLKEFLAMNDIHRHLTKDNPGVRPPKFEYDDQGDTLVMTY
 KSQRDYGELEFVGIIKAAAEFKKEKVRISSEHAGKGRRTARVTFIK

Homo sapiens B1(1-385)**Hs. WT (1-385)**

(ID. DE SEQ. N°: 121)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
 TGGAAGACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT
 ACAATCTTGCGTGTCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGGGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA
 AAGGGCAAAGGACTCATTTTGCCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCAAT
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTGAAGAAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC
 CATATACATTCTGCAAAGCTTTTCTTTTATATAATATTTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCT
 GTCTTCTCGCTGGTTCGTCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTTCTCATCAATAC
 TGTTTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG
 AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG
 CAGATAGCATACTTTTTCTATGTTACCAAGTGTCATGAACCTGGACGATTGACAAGGAGAG
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGCGATCTTGTCTTTTGGGAGAAC
 AATTTAGAGAGGAATACAAACTCACCCAAGAACTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 122)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAHDLATIYPGMRAPSFRCDAEKGKG
 LILHYYSEREGLQDIVIGIKTVAQQIHGTIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF
 EENGTOESRISPYTFCKAFPFHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDISFHG
 ILSHINTVFVLRSEGLLDVEKLECEDELTGTBISCLRLKGQMIYLPADSILFLCSPSVMLNDDLTR
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREYKLTQELBILTDRQLTLRALED

Figura 80

Hs. BM(1-385) H45Y

(ID. DE SEQ. N°: 123)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTCAGAATAAT
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC
 TGGAGAAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT
 ACAATCTTGCGTGTCTGCGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC
 GACCACCTTGCTACCATCTAACCAGGAATGCGTGCACCTTCCCTTAGGTGCACTGATGCAGAA
 AAGGGCAAAGGACTCATTTTGCCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATTATGTCATT
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTAATTGAAGAAAAGAGTCAAAAGAAAG
 AGGATTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC
 CATATACATTCTGCAAAGCTTTTCTTTTTCATATAATATTTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCT
 GTCTTCTCGCTGGTTCGTCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTTCTCACATCAATAC
 TGTTTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG
 AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG
 CAGATAGCATACTTTTCTATGTTTACCAAGTGTGATGAACCTGGACGATTTGACAAGGAGAG
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGCGATCTTGTTCTTTGGGAGAAC
 AATTTAGAGAGGAATACAAACTCACCCAAGAACTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 124)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFGKMFFVFCQESGYDTLRLVLSNVREFLQNLDAHDHLATYFGMRAPSFRCCTDAEKKGK
 LILHYYSEREGLDYVIGIHKTV AQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIBEKESKEEDFYEDLDRF
 EENGTOESRISPYTFCKAFPFIIFDRDLVVTQCGNATYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDISFHG
 ILSHINTVFVLRKEGLLDVEKLECEDELGTETISCLRLKGQMIYLPEADSLFLCSPSVMNLDDLTR
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

Figura 8P

Hs. B1(1-385) J145H

(ID. DE SEQ. N°: 125)

ATGTACGGATTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT
 ACAATCTTGCCTGTCCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA
 AAGGGCAAAGGACTCATTTTGCCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATCATGTCATT
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC
 CATATACATTCTGCAAAGCTTTTCCTTTTCATATAATATTTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCT
 GTCTTCTCGCTGGTTCTCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTTCTCACATCAATAC
 TGTTTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG
 AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG
 CAGATAGCATACTTTTCTATGTTTACCAAGTGTCATGAACCTGGACGATTTGACAAGGAGAG
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGCGATCTTGTTCCTTTGGGAGAAC
 AATTTAGAGAGGAATACAACTCACCCAAGAACTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 126)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATTYPGMRAPSFRCCTDAEKGKG
 LILHYYSEREGLDHVIGIITVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEBKESKEEDFYEDLDRF
 EENGTOESRISPYTFCKAFPFHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVVRPHIDISFHG
 ILSHINTVFVLRKSKEGLLDVEKLECEDELGTBISCLRLKGQMIYLPEADSILFLCSPSVMNLDLDR
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRQLTLRALED

Figura 8Q

Hs. B1(1-385) C78Y

(ID. DE SEQ. N°: 127)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAOTTTCTTGTGAGAATAAT
 ATATGATGACTCCAAAACCTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTTTACCAAGAATCTGGTTATGAT
 ACAATCTTGCGTGTCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA
 AAGGGCAAAGGACTCATTTTGCACTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATT
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC
 CATATACATTCTGCAAAGCTTTTCCTTTTCATATAATATTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCT
 GTCTTCTCGCTGGTTCTGCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTCTCACATCAATAC
 TGTTTTTGATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG
 AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG
 CAGATAGCATACTTTTTCTATGTTACCAAGTGTGATGAACCTGGACGATTTGACAAGGAGAG
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGCGATCTTGTCTTTGGGAGAAC
 AATTTAGAGAGGAATACAAACTCACCCAAGAACTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 128)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFGKMPFFVFYQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATTYPOMRAPSFRCDAEKGKG
 LILHYYSEREGLQDIVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIBEKESKEEDFYBDLDRF
 BENGTOESRISPYTFCKAFPHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDISFHG
 ILSHINTVPVLRSEGLLDVEKLECEDELGTETISCLRLKGQMIYLPEDSILFLCSPSVMNLDLDR
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREEYKLTQELEILIDRLQTLRALED

Figura 8R

Hs. 81 (1-385) H105F

(ID. DE SEQ. N°: 129)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTCAGAATAAT
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT
 ACAATCTTGCGTGTCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGTTCC
 ACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAAA
 AGGGCAAAGGACTCATTITGCACTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATTG
 GAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTGAG
 CAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTTAATTGAAGAAAAGAGTCAAAAGAAGA
 GGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCCC
 ATATACATTCTGCAAAGCTTTTCCTTTTCATATAATTTGACCGGGACCTAGTGCTCACTCAG
 TGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCTG
 TCTTCTCGCTGGTTTCGTCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTTCTCACATCAATACT
 GTTTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATGA
 ACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAGC
 AGATAGCATACTTTTTCTATGTTTACCAAAGTGTGATGAACCTGGACGATTTGACAAGGAGAGG
 GCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCCGATCTTGTTCTTTTGGGAGAACAA
 ATTTAGAGAGGAATACAACTCACCAAGAACTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTCA
 CGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 130)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAFLDHLATTYPGMRAPSFRCTDAEKGKGL
 ILHYYSEREGLQDIVIGIKTV AQQHGTEDMKVIOQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFE
 ENGTQESRISPYTFCKAFPFHIIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDISFHGI
 LSHINTVPVLRSEGLLDVEKLECEDELGTBEISCLRLKGQMIYLP EADSILFLCSPSVMNLLDDLRR
 GLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRQLTLRALED

Figura 8S

Hs. B1 (1-385) H105G

(ID. DE SEQ. N°: 131)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT
 ACAATCTTGGGTGCTCCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGGGT
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA
 AAGGGCAAAGGACTCATTTTGCCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATT
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC
 CATATACATTCTGCAAAGCTTTTCCTTTTCATATAATTTTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCT
 GTCTTCTCGTGGTTTCGTCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTTCTCACATCAATAC
 TGTTTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG
 AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG
 CAGATAGCATACTTTTTCTATGTTCCACCAAGTGTATGAACCTGGACGATTTGACAAGGAGAG
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGGATCTTGTCTTTTGGGAGAAC
 AATTTAGAGAGGAATACAACTCACCCAAGAACTGGAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 132)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDA LGDHLATTYPGMRAPSFRCDAEKGKG
 LILHYYSEREBGLQDIVIGNKTVAQQIHGTEIDMKVIOQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF
 EENGTOESRISPYTFCKAFPHIFDRDLVVTQCONAIYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDISFHG
 ILSHINTVFVLRSEGLLDVEKLECEDELGTBEISCLRLKGQMIYLPADSLFLCSPSVMNLDLDR
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLGEQFREBYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

Hs. B1(1-194)

(ID. DE SEQ. N°: 133)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT
 ACAATCTTGGGTGCTCCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA
 AAGGGCAAAGGACTCATTTTGCCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATT
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 134)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDA LGDHLATTYPGMRAPSFRCDAEKGKG
 LILHYYSEREBGLQDIVIGNKTVAQQIHGTEIDMKVIOQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

Figura 8T

Hs. B1(1-194) II45Y

(ID. DE SEQ. N°: 135)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT
 ACAATCTTGCCTGTCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA
 AAGGGCAAAGGACTCATTITGCACTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATTATGTCATT
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTAATTGAAGAAAAGAGTCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 136)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAHDHLATITPOMRAPSFRCCTDAEKKGK
 LILHYYSEREGLDYVIGIHKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

Hs. B1(1-194) L9W-II45Y

(ID. DE SEQ. N°: 137)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT
 ACAATCTTGCCTGTCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA
 AAGGGCAAAGGACTCATTITGCACTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATTATGTCATT
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTAATTGAAGAAAAGAGTCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 138)

MYGFVNHA WELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAG
 EILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAHDHLATITPOMRAPSFRCCTDAEKKGK
 GLILHYYSEREGLDYVIGIHKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

Figura 8U

Rattus norvegicus B1(1-385)

Rn. WT (1-385)

(ID. DE SEQ. N°: 139)

ATGTACGGTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAAGAGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT
CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC
TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
ACCATCTTGGCTGTCTTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC
GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAA
AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACATTGTGAT
CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAAGAAG
AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC
CGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCTTTTTCACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA
GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC
TGTCTTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTCACACATCAAT
ACCGTCTTTGTAAGTGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAACTTGAATGTGAGGA
TGAAGTACTGGGGCAGAGATTAGCTGCTCCGTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA
AGCAGATAGCATCCTCTTCTCTGTTACCAAGTGTGATGAACTTGGATGACCTAACAAGAAG
AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCTTTTGGGAGA
ACAGTTCCGGGAGGAGTACAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC
TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 140)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRITYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
ILQMFVKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAHDHLATTPGMRAPSFRCCTDAEKKG
LILHYYSERELQDIVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQORSEECDHQFLIEEKESKBEDFYEDLDRFE
ENGTQDSRISPYTFCKAPFHHFDRDLVVTQCGNATYRVLPQLQPOKCSLLSVFSLVRPHIDISPHGI
LSHINTVFVLRKEGLLDVEKLECEDELTAIEISCLRLKGQMTYLPEADSHFLCSPSVMNLDDLTR
RGLYLSDIPLHDATRDVLGLGEQFREEYKLTQELEILTDRLOLTLRALED

Figura 8v

Rn. BI(1-385) I145Y

(ID. DE SEQ. N°: 141)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCGCAOCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCTCAACCTCAATGC
 TGGTGAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCTCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
 ACCATCTTGGCTGTCCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTTTGCAGAACCTGACGCCCTGCAC
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAA
 AAAGGCAAAGGGGCTCATCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACTACGTGAT
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTAAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAG
 AGGATTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC
 CGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCTTTTACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC
 TGTCTTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTACACATCAAT
 ACCGTCTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAACTTGAATGTGAGGA
 TGAAGTACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCGTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA
 AGCAGATAGCATCCTCTTCTCTGTTACCAAGTGTGATGAACTTGGATGACCTACAAGAAG
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCTTTTGGGAGA
 ACAGTTCCGGGAGGAGTACAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC
 TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 142)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRITYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAHDLATTPGMRAPSFRCTDAEKGKG
 LILHYYSEREGLDYVIGIKTYAQIHGTEIDMKVIQRSEECDHQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF
 EENGTDQSRISPYTFCKAFPFHIFDRDLVVTQCGNATYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHG
 ILSHINTVFVLRKEGLLDVEKLECEDELTGAEISCLRLKGQMYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTR
 RGLYLSDIPLHDATRDVLLGEQFREYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

Figura 8W

Rz B1(1-385) I145H

(ID. DE SEQ. N°: 143)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
 ACCATCTTGGCTGTCCTGGGATCTAATGTCAAGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAA
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACCATGTGAT
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATAACCAATTTTAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC
 CGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCCTTTTACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC
 TGTCTTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTCACACATCAAT
 ACCGTCTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAAACTTGAATGTGAGGA
 TGAAGTACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCCGTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA
 AGCAGATAGCATCCTCTTCTCTGTTTACCAAGTGTGATGAAGTGGATGACCTAACAAAGAAG
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCTTTTGGGAGA
 ACAGTTCCGGGAGGAGTACAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC
 TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 144)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAHDHLATITPGMRAPSFRCCTDAEKGKG
 LILHYYSEREGLQDHVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIOQRSECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF
 EENGITQDSRISPYTFCKAFFPHHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHG
 ILSHINTVFVLRSEGLLDVEKLECEDELTGAEISCLRILKGQMTYLPEADSILFLCSPVMNLDLDR
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREEYKLTQBLEILTDRLQLTLRALED

Figura 8X

Rn. B1(1-385) C78Y

(ID. DE SEQ. N°: 145)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC
 TGGTGAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTCTATCAAGAGTCTGGCTATGAT
 ACCATCTTGGGTGCTGCTGGGATCTAATGTCAGGGAATTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCGAGAA
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACATTGTGAT
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC
 CGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCCTTTTCACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC
 TGTCTTCTCTGCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTACACATCAAT
 ACCCTCTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAACTTGAATGTGAGGA
 TGAAGTGAAGTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCCGTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA
 AGCAGATAGCATCCTCTTCCTCTGTTACCAAGTGTGATGAAGTGGATGACCTAACAAGAAG
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCCTTTTGGGAGA
 ACAGTTCCGGGAGGAGTACAAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC
 TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 146)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFQKMFVVFYQESGYDTLRVLGSNVREFLQNLDAHDHLATTYPGMRAPSFRCIDAEKKGK
 LILHYYSEREGLDIVIGIKTVAAQIHGTEIDMKVIQORSEECDHQFLIEKESKEEDFYEDLDRFE
 ENGTQDSRISPYTFCKAFPFHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHGI
 LSHINTVFVLRSEGLLDVEKLECEDELTGABISCLRLKGQMTYLPBADSILFLCSPSVMNLDLRL
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLGEOFREYKLTQELILTDRQLTLRALED

Figura 8Y

Rn. B1 (1-385) H105E

(ID. DE SEQ. N°: 147)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
 ACCATCTTGGGTGTCCTGGGATCTAATGTTCAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGTTGG
 ACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCGGGTGCACCGATGCAGAAA
 AAGGCAAAGGGCTCATTTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACATTGTGATC
 GGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTAAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC
 CGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCCTTTTCACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC
 TGTCTTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTCACACATCAAT
 ACCOTCTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAAACTTGAATGTGAGGA
 TGAAGTACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCCGTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA
 AGCAGATAGCATCCTCTTCTCTGTTTACCAAGTGTGATGAACTTGGATGACCTAACAAAGAAG
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCCTTTTGGGAGA
 ACAGTTCGGGAGGAGTACAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC
 TCACACTGAGGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 148)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAFDHLATTYPOMRAPSFRCCTDAEKQKGL
 ILHYYSERBGLQDIVIGIKTVAAQIHGTBDMKVIQQRSECDHTQPLIEEKESKEEDFYEDLDRFEE
 NGTQDSRISPYTFCKAFFPHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHGIL
 SHINTVFVLRKEGLLDVEKLECEDELTAIEISCLRLKGQMYLPEADSILFLCSPSVMNLDLTRLR
 GLYLSDIPLHDAITRDLVLLGEQFREYKLTQELEILTDRQLTLRALED

Figura 8Z

Rn. B1 (1-385) H105G

(ID. DE SEQ. N°: 149)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGOCAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTCTGCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
 ACCATCTTGGCTGTCCTGGGATCTAATGTGAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGGGG
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGACCGATGCAGAA
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACATTGTGAT
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC
 CGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCTTTTCACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCC
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC
 TGTCTTCTCTGCTCGGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTACACATCAAT
 ACCGTCTTTGTAAGCAAGGAAGGGTGTCTGGATGTTGAGAACTTGAATGTGAGGA
 TGAAGTGAAGGGGAGAGATTAGCTGCTCCGCTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA
 AGCAGATAGCATCCTCTTCTCTGTTACCAAGTGTGATGAAGTGGATGACCTAACAAGAAG
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGOTCCTTTTGGGAGA
 ACAGTTCCGGGAGGAGTACAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC
 TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 150)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFVKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDA L GDHLATTPGMRAPSFRCCTDAEKKG
 LILHYYSEREGLDIVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRSEEC DHTQFLIEKESKEEDFYEDLDRFE
 ENGTQDSRISPYTFCKAFPHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHDISFHGI
 LSHINTVFVLRSEGLLDVEKLECEDEL TGAEISCLRLKGQMYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTR
 RGLYLSDIPLHDATRD LVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

Rn. B1(1-194)

(ID. DE SEQ. N°: 151)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTCTGCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
 ACCATCTTGGCTGTCCTGGGATCTAATGTGAGGGAGTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGACCGATGCAGAA
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACATTGTGAT
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAG
 AGGATTTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 152)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEBQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFVKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDA L HDHLATTPGMRAPSFRCCTDAEKKG
 LILHYYSEREGLDIVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRSEEC DHTQFLIEKESKEEDFYED

Figura 8AA

Rn. B1(1-194) I145Y

(ID. DE SEQ. N°: 153)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
 ACCATCTTGCCTGTCCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAA
 AAAGGCAAAGGGCTCATTTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACTACGTGAT
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTAAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAG
 AGGATTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 154)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWBDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAHDLATTYPGMRAPSFRCITDAEKGK
 LILHYYSEREGLDYVIGIHKTVAAQIHGTEIDMKVIOQRSECDHTQFLIEKESKEEDFYED

Rn. B1(1-194) L9W-I145Y

(ID. DE SEQ. N°: 155)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
 ACCATCTTGCCTGTCCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAA
 AAAGGCAAAGGGCTCATTTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACTACGTGAT
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTAAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAG
 AGGATTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 156)

MYGFVNHAWEELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAG
 EILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAHDLATTYPGMRAPSFRCITDAEKGK
 GLILHYYSEREGLDYVIGIHKTVAAQIHGTEIDMKVIOQRSECDHTQFLIEKESKEEDFYED

Figura 8BB

Rattus norvegicus 82

(ID. DE SEQ. N°: 157)

ATGTATGGATTTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACA
 TGGGAGAAAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAAGTGCAAGATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGAT
 GACATCATCACCATTAAAGCTCATCCAAGAAGCCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGCC
 ATTCTGAAGCTCTTTGGCGAATACTTCTTTAAGTTCTGTAAGATGTCTGGCTATGACAGGATGC
 TGCGGACACTTTGGAGGAAATCTCACCAGGTTTATTGAAAACTAGATGCACTGCCACAGTTACC
 TGGCACTGTCTATCAGGAAATGAACGCACCATCCTTTTCGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGGG
 GCOATGCTTCTCCACTACTACTCAGACAGACATGGTCTGTGTACATTGTACCAGGTATCATTO
 AAGCTGTGGCCAAGGACTTCTTTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCCTGGATATGAACGAAG
 AGGTGGAAAGGACAGGGAAGAAAGAACATGTTGTGTTTCTGGTCTGTCAGAAAGGCTCACAGA
 CAGATAAGAGGAGCAAAGGCAAGCCGGCCACAAGGCACTGAGGACAGCCAGGCAGACCAGG
 AGGCTCTCCAGGGAACACTCCTTCGGATGAAGGAGAGATATTTAAACATCCCTGTTTGGCCTG
 GGGAGAAATCTCACTCAACTGCTGTGAGGGCATCGGTCTTTTGGAAAGGGCCCCCTCAGGG
 ACACCTTCAGCCCGTCTATCCTGAGAGATGAGTCTGAAGAGGAGGAGTCTGTGCTGCTT
 TTCCTTTCCACATTGTCTTTGATGAAGCACTAAGGGTCAAGCAAGCTGGAGTGAATATTCAGA
 AGTATGTCCCTGGAATCTTAACCCAGAAGTTTGCCTAGATGAGTATTTTCCATCATCCACCC
 TCAAGTTACTTTCAACATCTCCAGCATCTGCAAGTTTCAATTAACAGTCAAGTTTGTCTTGAAGACA
 AGAAAAGAAATGATGCCCAAAGCAAGGAAGAGCCAGCCGATGCTCAAACCTCCGGGGTTCAGA
 TGATCTGGATGGAGTCTCTGAGGTGCATGATCTTCATGTGTTCCCAAACGTCGCCAGCCTGC
 AAGAGCTGGAAGAGAGCAAGATGCATCTTTCTGATATCGCTCCGACGACACGACCAGGGAT
 CTCATCCTCCTCAACCAAGCAGAGGCTGGCAGAGATGAGCTGTCTGCCAACTGGAAAAGAA
 GAAGGAGGAGTTGCGTGTCTTTCCAATCACCTGGCCATCGAGAAGAAGAAACAGAGACCT
 TGCTGTATGCCATGCTGCCTGAACATGTGGCCAACCAACTCAAGGAGGGCAGAAAGGTGCT
 GCAGGAGAATTTGAAACATGTACAATCCTTTTCAGCGATGTTGTGACATTTACCAACATCTGT
 GCAGCCTGTGAACCTATCCAAATCGTGAACATGCTGAATTCATGTACTCCAAGTTTGACAGG
 TTAACCAAGTGTCCATGATGTCTACAAAGTAGAAACAATAGGGGATGCTTACATGGTGGTGGOT
 GGAGTACCAGTACCCGTTGAAAGCCATGCTCAAAGAGTCGCCAATTTTGCTCTGGGGATGAGA
 ATTTCTGCAAAAAGAGTGATGAATCCTGTCACTGGGGAACCTATCCAGATCAGAGTGGGAATC
 CACACTGGACCAGTCTTAGCAGGTGTTGTGGGAGACAAGATGCCTCGGTACTGCTTGTGTTGGT
 GACACTGTAAACACAGCCTCTAGGATGGAAAGTCACGGGCTTCCAGCAAAGTGCATCTGAG
 CCCCACAGCCACAGAGCCCTGAAAAACAAAGGOTTGAAATTGTCAGGAGAGGGGAGATCG
 AAGTGAAGGGGAAAGGAAAGATGACCACATACTTTCTGATCCAGAACCTGAATGCCACCGAG
 GATGAGATAATGGGGCGACCTTCAGCCCCCGCTGATGGGAAGGAAGTATGTACTCCCGGAAA
 CCAAGTCAGGAAGTCCCTGCTGTCCCGAGGAACACAGACCATCAGCAACAAGTCTACAAAG
 GAGACCCAGCAGACGCTTCTAATGAAGTCACACTTGCTGGGAGCCAGTGGCAGGGCGAAAC
 TCCACAGATGCAGTCAATAACCAGCCATCACCAGATGAGACCAAGACAAGTGTGCTGTAG
 TGGCCCTGTGCTGTCTGCTTTCTGTGTTGTGCTGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 158)

MYGFINTCLQSLVTEKFGEETWEKLKAPAEVQDVFMITYTVYDDIITIKLIEACKVLDVSMAILK
 LFGEYFFKFKMSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSYLALSYQEMNAPSFRVEEGADGAMLLH
 YYSDRHGLCHIVPGHIEAVAKDFDITDVAMSILDMNEEVERTGKKEHVVFLLVQKAHRQIRGAKA
 SRPQGSSEDSQADQEALQGTLLRMKERYLNIPVCPGEKSHSTAVRASVLFKGPLRDTFQPVYPERL
 WVEEEVFCDAFPFHIVFDEALRVKQAGVNIQKYVPILITQKFALDEYFSIHPQVTFNISSICKFINSQ
 FVLKTRKEMMPKARKSQPMLKLRGQMIWMESLRMIFMCSPNVRSLOELEESKMHLSDIAPHDT
 TRDLILLNQRLAEMELSCQLEKKKEBLRVLSNHLAIEKKKTETLLYAMLPEHVANQLKEGRKVA
 AGEFETCTILFSDVVTFTNICAACEPIQIVNMLNSMYSKFDRLTSVHDVYKVETIGDAYMVVGGVP
 VPVESHQQRVANFALGMRISAKEVMNPVTGEPIQIRVGIHTGPVLGAGVVGDKMPRYCLFODTVNT
 ASRMPESHGLPSKVHLSPTAHRALKNKGFIVRRGEIEVKGKGKMTTYFLIQNLNATEDEIMGRPSA
 PADGKEVCTPGNQVRKSPAVPRNTDHQQQVYKGPADASNEVTLAGSPVAGRNSTDAVNNQPS
 DETKTSVVASGPVLSAFCVVL

Figura 8CC

Homo sapiens 82 (1-217)

(ID. DE SEQ. N°: 159)

ATGTATGGATTTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACA
 TGGGAGAAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAGTGCAAGATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGAT
 GACATCATCACCATTAAAGCTCATCCAAGAAGCCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGCC
 ATTCTGAAGCTCTTTGGCGAATACTTCTTTAAGTTCTGTAAGATGTCTGGCTATGACAGGATGC
 TGGGACACTTGGAGGAAATCTCACCGAGTTTATTGAAAACCTAGATGCACTCCACAGTTACC
 TGGCACTGTCTATCAGGAAATGAACGCACCATCCTTTTCGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGGG
 GCGATGCTTCTCCACTACTACTCAGACAGACATGGTCTGTGTACATTGTACCAGGTATCATTG
 AAGCTGTGGCCAAGGACTTCTTTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCCTGGATATGAACGAAG
 AGGTGGAAGGACAGGGAAGAAAGAACATGTTGTGTTTCTGGTCGTGCAGAAGGCTCACAGA
 CAGATAAGAGGAGCAAAGGCCGCGCCACAAGGCAGTGAGGACAGCCAGGCAGACCAAG
 AGGCTCTCCAGGGAACACTCCTT

(ID. DE SEQ. N°: 160)

MYGFINTCLQSLVTEKFGEBETWEKLKAPAEVQDVFMITYTVYDDIITIKLIQEACKVLDVSMEAILK
 LFGEYFFKFKMSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSYLALSYQBMNAPSFRVEEGADGAMLLH
 YYSDRHGLCHIVPGIIEAVAKDFFDITDVAMSILDMNEEVERTGKKEHVFLVVQKAHRQIRGAKA
 SRPQGSSEDSQADQEALQGTL

Homo sapiens 82 (1-217) 1142Y

(ID. DE SEQ. N°: 161)

ATGTATGGATTTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACA
 TGGGAGAAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAGTGCAAGATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGAT
 GACATCATCACCATTAAAGCTCATCCAAGAAGCCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGCC
 ATTCTGAAGCTCTTTGGCGAATACTTCTTTAAGTTCTGTAAGATGTCTGGCTATGACAGGATGC
 TGGGACACTTGGAGGAAATCTCACCGAGTTTATTGAAAACCTAGATGCACTCCACAGTTACC
 TGGCACTGTCTATCAGGAAATGAACGCACCATCCTTTTCGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGGG
 GCGATGCTTCTCCACTACTACTCAGACAGACATGGTCTGTGTCACTATGTACCAGGTATCATTG
 AAGCTGTGGCCAAGGACTTCTTTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCCTGGATATGAACGAAG
 AGGTGGAAGGACAGGGAAGAAAGAACATGTTGTGTTTCTGGTCGTGCAGAAGGCTCACAGA
 CAGATAAGAGGAGCAAAGGCCGCGCCACAAGGCAGTGAGGACAGCCAGGCAGACCAAG
 AGGCTCTCCAGGGAACACTCCTT

(ID. DE SEQ. N°: 162)

MYGFINTCLQSLVTEKFGEBETWEKLKAPAEVQDVFMITYTVYDDIITIKLIQEACKVLDVSMEAILK
 LFGEYFFKFKMSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSYLALSYQBMNAPSFRVEEGADGAMLLH
 YYSDRHGLCHIVPGIIEAVAKDFFDITDVAMSILDMNEEVERTGKKEHVFLVVQKAHRQIRGAK
 ASRPQGSSEDSQADQEALQGTL

Figura 8DD

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA A LIBERAÇÃO DE OXIGÊNIO

Proteínas H-NOX são mutadas para exibir propriedades cinéticas e termodinâmicas aumentadas ou ideais para liberação sanguínea de gás O_2 . As proteínas H-NOX

5 projetadas compreendem mutações que transmitem ligação de ligante de O_2 ou NO alterada em relação ao domínio de H-NOX do tipo selvagem correspondente, e são operacionais como transportadores sanguíneos de gás O_2 em mamíferos fisiologicamente compatíveis. A invenção também fornece

10 composições farmacêuticas, kits e métodos que utilizam proteínas H-NOX do tipo selvagem ou mutantes para o tratamento de qualquer condição para a qual a liberação de O_2 seja benéfica.