

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 O<sub>2</sub>. As proteínas H-NOX projetadas compreendem mutações que transmitem ligação de ligante de O<sub>2</sub> ou NO alterada em relação ao domínio de H-NOX do tipo selvagem correspondente, e são operacionais como transportadores sangüíneos de gás O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 sanguínea, 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 5 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<sub>2</sub>) aos 10 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 15 potenciais incluem diversos transportadores artificiais de O<sub>2</sub> (revisados por Spahn, D.R. e cols. (2005), "Artificial O<sub>2</sub> 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, 20 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*, 25 incluindo neurotransmissão, inflamação, agregação plaquetária e regulação do tônus dos músculos lisos gastrintestinais e vasculares. O NO reage diretamente com o O<sub>2</sub> que está ligado à hemoglobina para formar metemoglobina e nitrato. Tanto o ferro de heme quanto o NO ficam oxidados 30 pelos átomos ligados de oxigênio, e a reação ocorre tão

rapidamente que não se observa nenhuma substituição de O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> ligado à hemoglobina é irreversível, causando a destruição de NO, O<sub>2</sub> e hemoglobina. A ligação de NO à hemoglobina sem O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> ligado), a agregação plaquetária pode aumentar. À medida que as plaquetas se agregam, elas liberam compostos vasoconstritores potentes como, por exemplo, tromboxano A<sub>2</sub> 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 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<sub>2</sub>. Essa alta afinidade limita a habilidade da hemoglobina para liberar oxigênio em uma taxa clinicamente útil em localizações desejadas (por exemplo, tecidos periféricos). Alternativamente, a liberação de O<sub>2</sub> por substitutos do sangue baseados em hemoglobina de menor afinidade nas artérias antes de alcançar os leitos microvasculares pode 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 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.

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 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<sub>2</sub> que sejam adequadas para aplicações clínicas ou industriais específicas. Uma aplicação industrial exemplar para a qual transportadores de O<sub>2</sub> são desejáveis inclui o crescimento de células em cultura, que é freqüentemente limitado pela quantidade de O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> desejáveis. Se desejadas, podem ser introduzidas mutações nas proteínas H-NOX para alterar sua ligação de O<sub>2</sub> e ligantes de NO para otimizar ainda mais o uso de proteínas H-NOX como transportadores de O<sub>2</sub>.

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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 2 nM a cerca de 50 µM a 20°C, cerca de 50 nM a cerca de

10  $\mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , cerca de 20 nM a cerca de  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , cerca de 100 nM a cerca de  $1,9 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , cerca de 150 nM a cerca de  $\mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$  ou cerca de 100 nM a cerca de 255 nM a  $20^\circ\text{C}$ . Em algumas modalidades, a constante de dissociação de  $\text{O}_2$  da

5 proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 80 nM a  $20^\circ\text{C}$  como, por exemplo, entre cerca de 20 nM a cerca de 75 nM a  $20^\circ\text{C}$ . 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  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$  como, por exemplo, menos do que cerca de  $600 \text{ s}^{-1}$ ,  $500 \text{ s}^{-1}$ ,  $400 \text{ s}^{-1}$ ,  $300 \text{ s}^{-1}$ ,  $200 \text{ s}^{-1}$ ,  $100 \text{ s}^{-1}$ ,  $75 \text{ s}^{-1}$ ,  $50 \text{ s}^{-1}$ ,  $25 \text{ s}^{-1}$ ,  $20 \text{ s}^{-1}$ ,  $10 \text{ s}^{-1}$ ,

15  $50 \text{ s}^{-1}$ ,  $3 \text{ s}^{-1}$ ,  $2 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,8 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,5 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,2 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ s}^{-1}$ ,  $0,8 \text{ s}^{-1}$ ,  $0,7 \text{ s}^{-1}$  ou  $0,6 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ . Em algumas modalidades, a  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 0,01 a cerca de  $200 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$  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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM a cerca de  $1,9 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e a  $k_{\text{off}}$  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  $20^\circ\text{C}$ . Em algumas modalidades, a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é

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

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

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

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

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

5 modalidades, a constante de dissociação de O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> a 37°C. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> a 37°C. Em algumas modalidades, a constante de dissociação de O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> a 20°C (por exemplo, menos do que

20 cerca de 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> ou 1,8 s<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> a 37°C, e a reatividade ao NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s<sup>-1</sup> a 20°C (por exemplo, menos do

25 que cerca de 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> ou 1,8 s<sup>-1</sup> 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 O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> a 20°C (por exemplo, entre cerca de 0,21 s<sup>-1</sup> a cerca de 0,65 s<sup>-1</sup> a 20°C). Em algumas modalidades, a  $k_{off}$  para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 1,35 s<sup>-1</sup> a cerca de 2,9 s<sup>-1</sup> a 20°C. Em algumas modalidades, a  $k_{off}$  para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 5,8 s<sup>-1</sup> a cerca de 19 s<sup>-1</sup> 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  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$  (por exemplo, menos do que cerca de  $600 \text{ s}^{-1}$ ,  $500 \text{ s}^{-1}$ ,  $100 \text{ s}^{-1}$ ,  $20 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,8 \text{ s}^{-1}$  ou  $0,7 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ ).

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*, 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-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*.

30 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*,  $\beta$ 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-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  $\beta$ 1 ou  $\beta$ 2 é derivada de uma proteína  $\beta$ 1 ou  $\beta$ 2 de *R.*  
*norvegicus* ou *H. sapiens*.

Em algumas modalidades das proteínas H-NOX isoladas, a  
 25 constante de dissociação de O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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, 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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).

30 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. pneumophilia*. 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. pneumophilia*,  
 $\beta$ 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*,  $\beta$ 1 H-NOX I140Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I145Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, sGC  $\beta$ 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 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, 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:

86564713), gcy-35\_Ce-17507861 (gi: 71990146),  
gcy-37\_Ce\_17540904 (gi: 71985505), GCY1 $\alpha$ 3\_Hs\_20535603,  
GCY1 $\alpha$ 2-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* Q2WVNO\_CLOSE. Em algumas modalidades das  
 proteínas H-NOX isoladas, a proteína H-NOX não é sGC  $\beta$ 1 H-  
 NOX C78S de *R. norvegicus* ou sGC  $\beta$ 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  
 seqüência 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  $20^\circ C$ , 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  $20^\circ C$ ).  
5 Em algumas modalidades, a constante de dissociação de  $O_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM a cerca de  $2\ \mu M$  a  $20^\circ C$ , 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  $20^\circ C$ . Em algumas  
10 modalidades, a constante de dissociação de  $O_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM a cerca de  $2\ \mu M$  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 constante de dissociação de  $O_2$  da proteína H-NOX é entre  
15 cerca de 20 nM a cerca de  $2\ \mu M$  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  $k_{off}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0\ s^{-1}$  a cerca de  $16,0\ s^{-1}$  a  $20^\circ C$ , e a taxa de auto-oxidação de  
20 heme da proteína X 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  $1,0\ s^{-1}$  a cerca de  $16,0\ s^{-1}$  a  $20^\circ C$ , e a reatividade ao NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca  
25 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 invenção fornece uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade farmacêuticamente aceitável de uma proteína H-NOX e um  
30 veículo farmacêuticamente 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  $200\text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ , 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 de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophilia*, 1 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophilia*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophilia*,  
 20 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*,  $\beta$ 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. 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*,  
 30  $\beta$ 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*, 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 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 das composições farmacêuticas, a composição farmacêutica inclui um ou mais 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. pneumophilia*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophilia*,  $\beta$ 1 H-NOX I140Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I145Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, sGC  $\beta$ 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 H 105F 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*, 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 $\alpha$ 3\_Hs\_20535603,  
 GCY1 $\alpha$ 2-Hs\_899477 ou GYC $\alpha$ -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  $\beta$ 1 H-  
 NOX C78S de *R. norvegicus* ou sGC  $\beta$ 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*  
*troglodytes* 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 Q1YJP5\_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* Q5WXPO\_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, 5 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 10 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 15 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, 20 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). Aa 25 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 30 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>, 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 *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*, 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*,  $\beta$ 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I145Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1(1-3 85) 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)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*, 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*,  $\beta$ 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*, 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. pneumophilia*. Em algumas modalidades dos métodos, a  
proteína H-NOX não é  $\beta 2(1-217)$  de *R. norvegicus*,  $\beta 1(1-194)$   
5 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-  
10 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. pneumophilia*,  $\beta 1$  H-NOX I140Y de  
*H. sapiens*,  $\beta 1$  H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, *R.*  
15 *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  
20 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  
25 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.*  
*pneumophilia*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophilia*,  
30  $\beta 1$  H-NOX I140Y de *H. sapiens*,  $\beta 1$  I145Y de *H. sapiens*,  $\beta 1$  H-

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

5 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

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 $\alpha$ 3\_Hs\_20535603, GCY1 $\alpha$ 2-Hs  
 30 899477 ou GYC $\alpha$ -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):

20 *Caenorhabditis briggsae* Q622M5\_CAEBR, *Caenorhabditis 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\_CAEL,

25 *Caenorhabditis elegans* GCY31\_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY36\_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY32\_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY35\_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY34\_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY33\_CAEL, *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*  
*troglodytes* 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, *Flavobacteria 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 Q1N035\_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  $\beta$ 1 H-NOX C78S de *R.*  
 10 *norvegicus* ou sGC  $\beta$ 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 O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> a 20°C (por exemplo, menos do que cerca de 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> ou 1,8 s<sup>-1</sup> a 20°C). Em algumas modalidades, a constante de  
5 dissociação de O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> a 20°C (por exemplo, menos do que cerca de 600 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup>, 100 s<sup>-1</sup>, 20 s<sup>-1</sup> ou 1,8 s<sup>-1</sup> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> (acima de heme). Resíduos de coordenação de heme de proteínas H-NOX de ligação de NO e ligação de O<sub>2</sub> 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  $\alpha$ -hélices são rotuladas A-G de acordo com a nomenclatura mostrada na FIG. 5B. As fitas  $\beta$  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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>, 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 FIG. 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 O<sub>2</sub>: 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  
 5 (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  
 10 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  
 15 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  
 20 *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"  
 25 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"  
 30 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. beta1 HD-like" representa H-NOX de  
 5 *Thermoanaerobacter tengcongensis*; "Ms. sGc beta 3 proteína"  
 representa  $\beta$ 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-O<sub>2</sub>  
 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*  $\beta$ 1 [gi: 2746083]  
 (ID. DE SEQ. N°: 28), *Rattus norvegicus*  $\beta$ 1 [gi: 27127318]  
 25 (ID. DE SEQ. N°: 29), *Drosophila melanogaster*  $\beta$ 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  $\alpha$ -hélices são representadas por espirais, e fitas  $\beta$  por setas. A bolsa

15 distal é definida por  $\alpha$ -hélices  $\alpha A$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha E$  e  $\alpha G$ . os números de acesso de Pubmed/NCBI são os seguintes:

20 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),  
 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<sup>II</sup>; linha de cima em cada gráfico), antes e depois de serem expostas ao ar (complexos de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>; 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 β1(1- 20 385) e β1(1-385) I145Y (FIG. 7F). Além dos complexos de Fe<sup>II</sup> e Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> de *L2* F142Y e β1(1-385) I145Y, o espectro de *L2* H-NOX e β1-(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<sub>2</sub> 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  $\text{Fe}^{\text{II}}$  não ligado), e o valor de 416 nm na FIG. 7A representa o pico do comprimento de onda para a linha de 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  $\text{O}_2$ . A formação de um pico duplo entre 500 e 600 nm na presença de ar também é indicativa de ligação de  $\text{O}_2$ . As FIGS. 7A-7F são de Boon, E.M. e cols. (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 correspondentes (IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 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 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 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* 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 O<sub>2</sub>, podem ser convertidas em proteínas H-NOX que se ligam tanto ao NO quanto ao O<sub>2</sub> pela introdução de uma única mutação de aminoácido. Dessa forma, a afinidade de proteínas H-NOX por O<sub>2</sub> e NO e a habilidade de proteínas H-NOX para discriminar entre ligantes de O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> ou ao NO com afinidades desejadas. Podem ser introduzidas mutações adicionais para alterar ainda mais a afinidade por O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub>. Por exemplo, podem ser geradas proteínas H-NOX mutantes com constantes de dissociação alteradas e/ou

taxas inferiores para ligação de O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> é uma avenida terapêutica que aborda e supera as desvantagens centrais dos transportadores de O<sub>2</sub> 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 para a liberação de O<sub>2</sub>. O papel principal da transfusão sangüínea após trauma e cirurgia é a liberação de O<sub>2</sub>. Um substituto do sangue ideal evita os desafios do sangue convencional: contaminação viral, exigência de tipagem, validade limitada e disponibilidade limitada. As principais limitações dos substitutos do sangue baseados em hemoglobina são sua afinidade elevada por O<sub>2</sub> 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 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<sub>2</sub> em um intervalo de tempo clinicamente relevante. Foram feitas várias tentativas para minimizar a toxicidade dos 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 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 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. (2003), "Targeted O<sub>2</sub> Delivery by low-P50 hemoglobin: A New Basis for O<sub>2</sub> Therapeutics", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285: H1411-H1419; Winslow (2007), "Red Cell Substitutes", "Seminars in Hematology" 44: 51-59). Se a reatividade ao NO de um HBOC desse tipo se tornará um problema em experimentos clínicos ainda é uma questão a ser investigada. O planejamento de proteínas H-NOX para que se liguem e liberem O<sub>2</sub> com reatividade ao NO mínima fornece um novo transportador de O<sub>2</sub> gasoso sanguíneo para uso em substitutos do sangue, em que as proteínas H-NOX liberam O<sub>2</sub>, sem remover NO ou serem inativadas como transportadores de O<sub>2</sub> pelo NO. Essas proteínas H-NOX, composições, kits e métodos serão descritos com mais detalhe nessa especificação.

### **Proteínas H-NOX**

#### **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 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 O<sub>2</sub>, e outras se ligam tanto ao NO quanto ao O<sub>2</sub>. Os domínios de H-NOX de aeróbios facultativos que foram isolados se ligam ao NO, mas não ao O<sub>2</sub>. As proteínas H-NOX de procariotas aeróbicos obrigatórios, *C. elegans* e *D. melanogaster*, se ligam ao NO e ao O<sub>2</sub>. 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 O<sub>2</sub> 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<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>. Essa rede de ligação de hidrogênio da bolsa distal, que envolve principalmente Y140, estabiliza um complexo de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> (FIG. 6B). Essa tirosina não está presente em proteínas H-NOX que discriminam contra O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub>, pode permitir que a proteína H-NOX mutante se ligue ao O<sub>2</sub>. 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 O<sub>2</sub>.

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 chipanzé, 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 O<sub>2</sub> 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*  $\beta$ 1 [gi: 2746083], *Rattus norvegicus*  $\beta$ 1 [gi: 27127318], *Drosophila melanogaster*  $\beta$ 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*  
5 *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,  
10 *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* Q29CE  
1\_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C7\_DROPS, *Drosophila*  
20 *pseudoobscura* Q296C8\_DROPS, *Drosophila pseudoobscura*  
Q29BU7\_DROPS, *Aplysia californica* Q7YWK7\_APLCA,  
*Hemicentrotus pulcherrimus* Q95NK5\_HEMPU, *Chlamydomonas*  
*reinhardtii*, Q5YLC2\_CHLRE, *Anabaena* sp Q8YUQ7\_ANASP,  
*Flavobacteria bacterium* BBFL7 Q26GR8\_9BACT, *Psychroflexus*  
25 *torquis* ATCC 700755 Q1VQE5\_9FLAO, 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 Q2WVNO\_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.

Proteínas H-NOX e ácidos nucleicos adicionais que  
 30 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*  $\beta$ 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 O<sub>2</sub> pode ser testada determinando-se se a proteína H-NOX se liga ao O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub>. Por exemplo, podem ser introduzidas uma ou mais mutações para alterar sua constante de dissociação de O<sub>2</sub>, 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 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, 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 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 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 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 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 nucléicos 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 nucléico não é uma versão degenerada de um ácido nucléico 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/O<sub>2</sub>, 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 seqüência 25 de H-NOX  $\beta$ 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 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 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 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 conhecidas como sendo uma seqüência de ácidos nucléicos 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 as seqüências previstas conhecidas ou conhecidas como sendo uma seqüência de ácidos nucléicos ou de aminoácidos de H-NOX).

Para reduzir a imunogenicidade de proteínas H-NOX derivadas de outras fontes que não seres humanos, 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. 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<sub>2</sub> ou NO em relação ao domínio de H-NOX do tipo selvagem correspondente, e são operacionais como um transportador de O<sub>2</sub> gasoso sanguíneo 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 <i>Cb</i> H- NOX(1- 175)	$\beta 1(1-385)$ I145Y	$\beta 1(1-385)$ I145Y	
	<i>Tt</i> I5A	<i>L2</i> F9W- F142Y		<i>Cb</i> H- NOX(1- 186)	$\beta 1(1-385)$ I145H	$\beta 1(1-385)$ I145H	
25	<i>Tt</i> I5L	<i>L1</i> H-NOX			$\beta 1(1-385)$ C78Y	$\beta 1(1-385)$ C78Y	

	Tt I5L- P115A Tt W9F	L1 F142Y	Ca H- NOX(1- 197) Ca H- NOX(1- 183)	$\beta$ 1(1-194) $\beta$ 1 H105F	$\beta$ 1(1-194) $\beta$ 1 H105F
5	Tt W9F- Y140L Tt W9F- Y140H			$\beta$ 1 H105G $\beta$ 1(1-194) I145Y	$\beta$ 1 H105G $\beta$ 1(1-194) I145Y
	Tt W9F- N74A			$\beta$ 1(1-194) L9W-I145Y	$\beta$ 1(1-194) L9W- I145Y
10	Tt W9Y Tt W9N Tt W9H Tt N74E Tt N74A			$\beta$ 2(1-217) $\beta$ 2(1-217) I142Y	$\beta$ 2(1-217) $\beta$ 2(1-217) I142Y
15	Tt N74H Tt N74A- Y140H Tt I75F His6 Tt F78Y- Y140L Tt F78Y- Y140F				
20	Tt P115A Tt R135Q His6 Tt Y140F Tt Y140L Tt Y140H Tt Y140A Tt 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 particularmente aplicados às proteínas H-NOX heterólogas

30

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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub>, de  $k_{off}$  de O<sub>2</sub>, 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 O<sub>2</sub> como, por exemplo, hemoglobina. Conseqüentemente, em algumas modalidades, uma proteína H-NOX possui uma taxa de associação de O<sub>2</sub>, uma taxa de dissociação de O<sub>2</sub>, uma constante de dissociação para ligação de O<sub>2</sub>, 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> que contêm ferro, em células sangüíneas vermelhas. A hemoglobina humana purificada, sem estroma, possui uma K<sub>D</sub> cinética para o O<sub>2</sub> de cerca de 200-500 nM. Esse valor depende da subunidade.

Como aqui usado, o termo "k<sub>off</sub>" significa uma taxa de dissociação, por exemplo, a taxa de liberação de O<sub>2</sub> ou de NO por uma proteína. Um valor numérico de k<sub>off</sub> menor indica uma taxa de dissociação mais lenta. Em várias modalidades, a k<sub>off</sub> para O<sub>2</sub> para uma proteína H-NOX é entre cerca de 0,01 a cerca de 200 s<sup>-1</sup> a 20°C como, por exemplo, cerca de 0,1 a cerca de 200 s<sup>-1</sup>, cerca de 0,1 a 100 s<sup>-1</sup>, cerca de 1,0 a cerca de 16,0 s<sup>-1</sup>, cerca de 1,35 a cerca de 23,4 s<sup>-1</sup>, cerca de 1,34 a cerca de 18 s<sup>-1</sup>, cerca de 1,35 a cerca de 14,5 s<sup>-1</sup>, cerca de 0,21 a cerca de 23,4 s<sup>-1</sup>, cerca de 1,35 a cerca

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

O termo " $k_{\text{on}}$ " significa uma taxa de associação, por exemplo, a taxa de ligação de  $\text{O}_2$  ou  $\text{NO}$  a uma proteína. Um valor numérico menor da  $k_{\text{on}}$  indica uma taxa de associação mais lenta. Em várias modalidades, a  $k_{\text{off}}$  para  $\text{O}_2$  para uma proteína H-NOX é entre cerca de 0,14 a cerca de  $60 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$  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 " $K_{\text{D}}$ " significa uma proporção de taxa cinética *off* ( $k_{\text{off}}$ ) para a taxa cinética *on* ( $k_{\text{on}}$ ), por exemplo, um valor de  $K_{\text{D}}$  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 " $K_{\text{D}}$  calculada" refere-se a uma aproximação da constante de dissociação cinética com base em uma  $k_{\text{off}}$  medida. Um valor para a  $k_{\text{on}}$  é derivado por meio da correlação entre a  $K_{\text{D}}$  cinética e a  $k_{\text{off}}$ , 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  $\mu$ M, cerca de 2  $\mu$ M a cerca de 1 mM, cerca de 100 nM a cerca de 1  $\mu$ M, cerca de 9  $\mu$ M a cerca de 50  $\mu$ M, cerca de 100  $\mu$ M a cerca de 1 mM, cerca de 50 nM a cerca de 10  $\mu$ M, cerca de 2 nM a cerca de 50  $\mu$ M, cerca de 100 nM a cerca de 1,9  $\mu$ M, cerca de 150 nM a cerca de 1  $\mu$ M ou cerca de 100 nM a cerca de 255 nM, cerca de 20 nM a cerca de 2  $\mu$ M, 20 nM a cerca de 75 nM, cerca de 1  $\mu$ M a cerca de 2  $\mu$ M, cerca de 2  $\mu$ M a cerca de 10  $\mu$ M, cerca de 2  $\mu$ M a cerca de 9  $\mu$ 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  $k_{\text{off}}$  quanto pela  $k_{\text{on}}$  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  $k_{\text{off}}$  quanto pela  $k_{\text{on}}$  por NO. Um valor de  $K_D$  por NO numericamente inferior significa uma afinidade maior.

10 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.

20 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  $\mu\text{M}$  de proteína. Um menor valor numérico para a reatividade ao NO em unidades de  $\text{s}^{-1}$  indica uma reatividade ao NO menor. Em várias modalidades, a reatividade ao NO de uma proteína H-NOX é de menos do que 25 cerca de 700  $\text{s}^{-1}$  a 20°C como, por exemplo, menos do que cerca de 600  $\text{s}^{-1}$ , 500  $\text{s}^{-1}$ , 400  $\text{s}^{-1}$ , 300  $\text{s}^{-1}$ , 200  $\text{s}^{-1}$ , 100  $\text{s}^{-1}$ , 75  $\text{s}^{-1}$ , 50  $\text{s}^{-1}$ , 25  $\text{s}^{-1}$ , 20  $\text{s}^{-1}$ , 10  $\text{s}^{-1}$ , 5  $\text{s}^{-1}$ , 3  $\text{s}^{-1}$ , 2  $\text{s}^{-1}$ , 1,8  $\text{s}^{-1}$ , 1,5  $\text{s}^{-1}$ , 1,2  $\text{s}^{-1}$ , 1,0  $\text{s}^{-1}$ , 0,8  $\text{s}^{-1}$ , 0,7  $\text{s}^{-1}$  ou 0,6  $\text{s}^{-1}$  a 30 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<sup>-1</sup> a 20°C como, por exemplo, entre cerca de 0,5 a cerca de 400 s<sup>-1</sup>, cerca de 0,5 a cerca de 100 s<sup>-1</sup>, cerca de 0,5 a cerca de 50 s<sup>-1</sup>, cerca de 0,5 a cerca de 10 s<sup>-1</sup>, cerca de 1 a cerca de 5 s<sup>-1</sup> ou cerca de 0,5 a cerca de 2,1 s<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> a 37°C como, por exemplo, menos do que cerca de 0,9 h<sup>-1</sup>, 0,8 h<sup>-1</sup>, 0,7 h<sup>-1</sup>, 0,6 h<sup>-1</sup>, 0,5 h<sup>-1</sup>, 0,4 h<sup>-1</sup>, 0,3 h<sup>-1</sup>, 0,2 h<sup>-1</sup>, 0,1 h<sup>-1</sup> ou 0,05 h<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> a 37°C como, por exemplo, cerca de 0,006 a cerca de 1,0 h<sup>-1</sup>, 0,006 a cerca de 0,9 h<sup>-1</sup> ou cerca de 0,06 a cerca de 0,5 h<sup>-1</sup> a 37°C.

Em várias modalidades, uma proteína H-NOX mutante 25        possui: (a) uma constante de dissociação de O<sub>2</sub> ou NO, uma taxa de associação (k<sub>on</sub> para O<sub>2</sub> ou NO) ou uma taxa de dissociação (k<sub>off</sub> para O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 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 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<sub>2</sub> 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 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 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 O<sub>2</sub> adequados fornecem estabilidade elevada ou maximizada, particularmente 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 O<sub>2</sub> 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  $s^{-1}$  a 20°C). Em algumas modalidades, a

20 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  $s^{-1}$  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  $\mu M$ , cerca de 50 nM a cerca de 10  $\mu M$ , cerca de 100 nM a cerca de 1,9  $\mu M$ , cerca de 150 nM a cerca de 1  $\mu M$  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  $\mu M$  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  $0,9 h^{-1}$ ,  $0,8 h^{-1}$ ,  $0,7 h^{-1}$ ,  $0,6 h^{-1}$ ,  $0,5 h^{-1}$ ,  $0,4$   
5  $h^{-1}$ ,  $0,3 h^{-1}$ ,  $0,2 h^{-1}$  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  
10 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  
15 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  
20 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  
25 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 $\mu$ M	12 h a 48 h	1 a 10	Encapsulação
0,01 kD a 0,1 kD	1 $\mu$ M a 10 $\mu$ 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 <sub>2</sub>	Resíduos da bolsa distal
Tt H-NOX, uma H-NOX procariótica e um forte ligante de O <sub>2</sub>			
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 <sup>a</sup>	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 <sub>2</sub>			
L2 H-NOX	Estável <sup>a</sup>	Sem complexo formado	Phe9, Phe78, Phe142
L2 F142Y	Estável <sup>f</sup>	$k_{off} = 3,68$	Phe9, Phe78,

			Tyr142
L2 F9W-F142Y	Estável <sup>f</sup>	Se liga ao O <sub>2</sub> <sup>e</sup>	Trp9, Phe78, Tyr142
L1 H-NOX	$k_{ox} = 0,31$	Sem complexo formado	Leu9, Leu78, Phe142
L1 F142Y	$k_{ox} = 1,8$	$k_{off} = 1,73$ <sup>d</sup>	Leu9, Leu78, Tyr142
H-NOX eucariótica para a qual a proteína do tipo selvagem não se liga ao O <sub>2</sub>			
β2 (1-217)	$k_{ox} = 0,18$	Sem complexo formado	Leu9, Cys76, Ile142
β2 (1-217) I142Y		g	Leu9, Cys76, Tyr142
β1 (1-194)	$k_{ox} = 4,3$	Sem complexo formado	Leu9, Cys78, Ile145
β1 (1-194) I145Y	$k_{ox} = 2,8$	g	Leu9, Cys78, Tyr145
β1 (1-194) L9W-I145Y	$k_{ox} \sim 10$	g	Trp9, Cys78, Tyr145
β1 (1-385)	Estável <sup>e</sup>	Sem complexo formado	Leu9, Cys78, Ile145
β1 (1-385) I145Y	$k_{ox} = 0,72$	$k_{off} = 2.69$	Leu9, Cys78, Tyr145
β1 (1-385) I145H			Leu9, Cys78, His145
β1 (1-385) C78Y			Leu9, Tyr78, Ile145
Outra H-NOX prevista para se ligar ao O <sub>2</sub> 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 <sup>h</sup>	g	Trp9, Phe78, Tyr140
Cb H-NOX(1- 186)	Ligeiramente mais estável <sup>i</sup>	g	Trp9, Phe78, Tyr140
Ca H-NOX(1- 197)	Construção não estável <sup>h</sup>	g	Trp9, Phe78, Tyr140
Ca H-NOX(1- 183)	Ligeiramente mais estável <sup>i</sup>	g	Trp9, Phe78, Tyr140
Ce GCY-35(1- 252)	Estável	Se liga ao O <sub>2</sub> <sup>e</sup>	Phe9, Thr78, Tyr144

<sup>a</sup> A construção é estável à oxidação (avaliada pela taxa de auto-oxidação,  $k_{ox}$  [h<sup>-1</sup>] a 37°C) e/ou perda de heme. <sup>b</sup> A atividade de ligação de O<sub>2</sub> foi avaliada pela taxa de dissociação de O<sub>2</sub> do heme a 20°C (s<sup>-1</sup>). <sup>c</sup> Após 24 horas a 37°C, ainda não há indicação de auto-oxidação. <sup>d</sup> Apenas uma pequena porção da proteína forma um complexo com O<sub>2</sub>; a taxa relatada representa a cinética para essa população. <sup>e</sup> A proteína se liga ao O<sub>2</sub>, mas a  $k_{off}$  não foi determinada. <sup>f</sup> Embora relativamente estável, essa proteína se precipitava à medida que era oxidada, tornando difícil medir a  $k_{ox}$ . <sup>g</sup> Não aplicável em função da instabilidade ou da oxidação rápida. <sup>h</sup> "Construção não estável" significa que a proteína se oxida imediatamente sob as condições testadas. <sup>i</sup> "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<sub>2</sub> ( $k_{on}$ ), a taxa de dissociação de O<sub>2</sub> ( $k_{off}$ ), a constante de dissociação de O<sub>2</sub> ( $K_D$ ) 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<sub>2</sub>, a taxa de dissociação de O<sub>2</sub>, a constante de dissociação de O<sub>2</sub>, a taxa de auto-oxidação ou combinações de dois ou mais dos citados anteriormente.

**Tabela 5. Constantes de cinética de ligação de O<sub>2</sub> para proteínas heme Fe<sup>II</sup> ligadas por histidil**

Proteína	$K_D$ <sup>a</sup>	$k_{on}$ <sup>b</sup>	$k_{off}$	$k_{ox}$ <sup>d</sup>	Ref,
Tt H-NOX	89,7 ± 6,2	13,61 ± 1,0	1,22 ± 0,09	e	i
Tt P115A	21,2 ± 2,1	10,4 ± 1,1	0,22 ± 0,01	e	j
Tt I5A	~80		0,82 ± 0,03	0,7	j
Tt I5L	~1.000		9,50 ± 0,64	0,6	j
Tt 15L-P115A	~30		0,28 ± 0,01	0,6	j
Tt W9F	305 ± 31	6,02 ± 0,62	1,84 ± 0,17	e	i
Tt Y140F	f	15,7 ± 1,4	15,7 ± 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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
<sup>a</sup> Constante de dissociação a 20°C (nM); <sup>b</sup> Taxa de associação de O <sub>2</sub> ao heme a 20°C (μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ); <sup>c</sup> Taxa de dissociação de O <sub>2</sub> do heme a 20°C (s <sup>-1</sup> ); <sup>d</sup> Taxa de auto-oxidação de heme (h <sup>-1</sup> ) a 37°C; <sup>e</sup> Após 24 horas a 37°C,					

ainda não havia indicação de auto-oxidação; <sup>f</sup> Apenas uma pequena porção da proteína forma um complexo com O<sub>2</sub>, embora a cinética para essa população pudesse ser medida; <sup>i</sup> Boon, E.M. e cols. (junho de 2005), "Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase", *Nature Chemical Biology* 1(1): 53-59, <sup>j</sup> Dados não publicados; <sup>k</sup> Springer, B.A. e cols. (1994) "Family Physicians Key Partners in Preventing Suicide Among Youth", *Chem. Rev.* 94: 699-714; <sup>l</sup> 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. <sup>m</sup> 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 O<sub>2</sub>, a taxa de dissociação de O<sub>2</sub>, o O<sub>2</sub>, a taxa de auto-oxidação, a reatividade ao NO e a estabilidade de complexos de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub>, a taxa de  
10 dissociação de O<sub>2</sub>, o O<sub>2</sub>, a taxa de auto-oxidação, a reatividade ao NO ou a estabilidade dos complexos de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> 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	$k_{on}$ <sup>a</sup>	$k_{of}$ <sup>b</sup>	$k_{ox}$ <sup>c</sup>	Reatividade ao NO <sup>d</sup>	Estabilidade do complexo de $Fe^{II}-O_2$
Hs Hb	23	11	0,006	$<0,001$ s ( $\sim 7.000$ s <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	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 <sup>-1</sup>	Sempre estável
Tt Y140H	$\sim 10$	5,03	0,87	$1,7 : 0,4$ s <sup>-1</sup>	Oxida-se o/n no ar em temperatura ambiente, estável a 4°C no ar, anaeróbica estável
$\beta 1(1-385)$ I145Y	$\sim 105$	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

<sup>a</sup> Taxa de  $O_2$  associação ao heme a 20°C ( $\mu M^{-1} s^{-1}$ ); <sup>b</sup> Taxa de dissociação de  $O_2$  do heme a 20°C ( $s^{-1}$ ); <sup>c</sup> Taxa de auto-oxidação de heme ( $h^{-1}$ ) a 37°C; <sup>d</sup> 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  $\mu\text{M}$  em Tampão A, e óxido nítrico (NO) foi preparado a 200  $\mu\text{M}$  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. <sup>e</sup> 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  $7.000 \text{ s}^{-1}$  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  $\text{O}_2$  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 5 exemplares variam de 21,20 nM a 1.000.000,00 nM a 20°C. Se desejado, a constante de dissociação para ligação de  $\text{O}_2$  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 10 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  $\text{O}_2$**

Proteína	$K_D$ cinética (nM)	$\pm$	$K_D$ 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
$\beta$ 1(1-385) I145Y			1.000.000

A Tabela 8 demonstra que as taxas de dissociação para a ligação de O<sub>2</sub> 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 variam de 0,21 s<sup>-1</sup> a 23,4 s<sup>-1</sup> a 20°C. Se desejado, a taxa de dissociação para a ligação de O<sub>2</sub> 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 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 O<sub>2</sub>**

Proteína	$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> )	±
<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
$\beta$ 1(1-385) I145Y	2,69	0,61

<i>Tt</i> W9Y	3,07	0,1
<i>Tt</i> R135Q His6	3,56	0,08
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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub>

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 <sup>a</sup>	
Dd H-NOX	muito lenta <sup>a</sup>	
$\beta$ 1(1-385) I145Y	muito lenta <sup>a</sup>	

<sup>a</sup> "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 O<sub>2</sub> 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  $\beta$  e  $\alpha$ ). Quando o O<sub>2</sub> ou o NO se liga, esse pico único se divide em dois picos,  $\beta$  e  $\alpha$  (que estão listados abaixo das colunas  $\beta$  e  $\alpha$ , respectivamente). Se desejado, a ligação de O<sub>2</sub> 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 <sup>a</sup> do UV visível para alguns complexos de proteína heme FeII ligados por histidil

Proteína	Soret	$\beta$	$\alpha$
<b>Complexo de Fe<sup>II</sup> não ligado</b>			
sGC	431		555
$\beta$ 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
<b>Complexo de Fe<sup>II</sup>-NO</b>			
sGC	398	537	572
$\beta$ 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
<b>Complexo de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub></b>			
SGC	Nenhum complexo observado		
$\beta$ 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

<sup>a</sup> nm (a 20°C)

A Tabela 11 contém posições de pico UV visível para alguns complexos de Fe (II), Fe (III), Fe (II)NO e Fe(II)-O<sub>2</sub>. 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 O<sub>2</sub>, então o pico de Soret não será alterado quando o O<sub>2</sub> for adicionado. Caso a proteína H-NOX não se ligue ao O<sub>2</sub>, então seu pico de Soret irá mudar entre 414 nm e 418 nm quando o O<sub>2</sub> for adicionado, que é a mesma mudança que ocorre na hemoglobina, indicativa de O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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

5 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)-O<sub>2</sub>.

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

<sup>a</sup> "N.A." representa bandas  $\alpha$  e  $\beta$  não atribuíveis em consequência de sinal baixo em comprimentos de onda mais longos.

Complexo	Proteína	Soret	$\beta$	$\alpha$
Fe(II)-NO	<i>Tt wt</i>	420	550	578
	<i>Tt W9Y</i>	420	552	576
	<i>Tt N74A</i>	421	572	
	<i>Tt N74H</i>	424	562	
	<i>Tt N74A-Y140H</i>	421	549	576
	<i>Tt W9H</i>	420	548	575
	<i>Tt N74E</i>	422	544	571
	<i>Tt W9N</i>	421	541	576
	<i>Tt wt His6</i>	420	547	576
Complexo	Proteína	Soret	$\beta$	$\alpha$
Fe(II)-O <sub>2</sub>	<i>Tt wt</i>	416	556	591
	<i>Tt W9Y</i>	416	555	590
	<i>Tt N7 4A</i>	418	553	589
	<i>Tt N74H</i>	418	553	589
	<i>Tt N74A-Y140H</i>	414	555	584
	<i>Tt W9H</i>	418	556	589
	<i>Tt N74E</i>	417	555	587
	<i>Tt W9N</i>	416	588	553
	<i>Tt wt His6</i>	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 <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
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

<sup>a</sup> "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 procaríota 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 seqüência de controle de expressão. Uma "seqüência de controle de expressão" significa uma seqüência de ácidos nucleicos que dirige a transcrição de um ácido nucleico de interesse. Uma 10 seqüência de controle de expressão pode ser um promotor, por exemplo, um promotor constitutivo ou um promotor indutível, ou um intensificador. A seqüência 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 seqüência 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, glutationa 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 O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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, O<sub>2</sub> é ligado à proteína H-NOX, antes de ser liberada ao indivíduo. Em outras modalidades, O<sub>2</sub> não está ligado à proteína H-NOX antes da administração da proteína ao indivíduo, e a  
10 proteína H-NOX transporta O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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.

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  $p_{50}$  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  $p_{50}$  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  $p_{50}$  de aproximadamente 666,6 Pa, ( $K_D$  de talvez 100 a 200 nm), e a  $p_{50}$  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 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, 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 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 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, 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 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-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 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 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 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 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 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 O<sub>2</sub> 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. N<sup>os</sup> 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 O<sub>2</sub>.

### 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° 5 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 O<sub>2</sub>, na taxa de dissociação de O<sub>2</sub>, na 10 constante de dissociação para ligação de O<sub>2</sub>, 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 15 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 O<sub>2</sub> 20 pelas proteínas H-NOX pode ser usada para aumento do crescimento celular em culturas de células por manutenção ou aumento dos níveis de O<sub>2</sub> *in vitro*. Para essas aplicações, as proteínas H-NOX podem ser adicionadas a um meio de cultura de células para liberar O<sub>2</sub> ao meio (e às 25 células no meio). Em algumas modalidades, o O<sub>2</sub> é ligado à proteína H-NOX, antes dela ser adicionada ao meio de cultura de células. Em outras modalidades, o O<sub>2</sub> não é ligado à proteína H-NOX antes de sua adição ao meio de cultura de células, e a proteína H-NOX transporta O<sub>2</sub> de uma 30 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 O<sub>2</sub> obtida pelas células. Por exemplo, células que expressam um composto de interesse 5 (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 O<sub>2</sub> reduzido (Sullivan e cols. (2006), 10 "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 15 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 O<sub>2</sub> de soluções que necessitem da remoção de O<sub>2</sub>.

#### 20 **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 25 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 O<sub>2</sub> a um indivíduo. Em várias modalidades, a invenção apresenta um kit com: (i) uma proteína H-NOX (por exemplo, uma 30 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<sub>2</sub> *in vitro*, adição de O<sub>2</sub> a uma solução ou remoção de O<sub>2</sub> 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 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 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 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**

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 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 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 seqüência 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 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 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 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 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, 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 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 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 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 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 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  $O_2$ )**

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 laser a 560 nm (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), produzindo

o intermediário de Fe<sup>II</sup> de 5 coordenadas, do qual a ligação de O<sub>2</sub> 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<sup>II</sup>-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<sub>2</sub>. A associação de O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>. 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<sup>-1</sup>.

#### **$k_{off}$ (taxa de dissociação de O<sub>2</sub>)**

Para medir a  $k_{off}$ , complexos de Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>-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 O<sub>2</sub> do heme foi monitorada como um aumento na absorvência a 437 nm, um máximo no espectro de diferença de Fe<sup>II</sup>-Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>, ou 425 nm, um máximo no espectro de diferença de Fe<sup>II</sup>-Fe<sup>II</sup>-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 ditionita foram testadas) e independentes do CO saturante  
25 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  $\mu\text{M}$  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  $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{Fe}^{\text{II}}$  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  $\mu\text{M}$  em tampão A, e o NO foi preparado a 200  $\mu\text{M}$  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

O<sub>2</sub>, 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 <sub>D</sub> (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. N<sup>os</sup> 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/fl2\\_4.php](http://anaesthesiamcq.com/FluidBook/fl2_4.php)"; Patentes U.S. N<sup>os</sup> 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 O<sub>2</sub>: comparação de um painel de mutantes H-NOX transportadores de O<sub>2</sub> e H-NOX em hemodiluição extrema no rato.**

Para avaliar a habilidade de mutantes de H-NOX para transportar O<sub>2</sub> 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 PCO<sub>2</sub> e a PO<sub>2</sub> 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  $\text{CO}_2$  total, o bicarbonato padronizado ( $\text{HCO}$ ) e o excesso de base (BE) são calculados a partir da  $\text{PCO}_2$ , 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  $\mu\text{l}$ , 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  $37^\circ\text{C}$  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  $\text{O}_2$ , 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 O<sub>2</sub> é benéfica.

**Exemplo 4: Modelo de trauma para mutantes de H-NOX transportadores de O<sub>2</sub>: comparação dos efeitos de mutantes de H-NOX transportadores de O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> em um modelo de trauma, pode ser realizada uma adaptação de um protocolo estabelecido (Raaf, 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 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 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 CO<sub>2</sub> do 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 PCO<sub>2</sub> arterial entre 35 e 45 mm Hg durante a cirurgia, verificados coletando-se 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. 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 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. Biol. Chem.* 262(12): 5.476-5.482). As medidas da  $PO_2$   
30

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 O<sub>2</sub>, 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) (Raaf, 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 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, 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, ou o mesmo ou menos aumento da resistência vascular mesentérica (MVR) após ressuscitamento, comparadas com as causadas por outro transportador de O<sub>2</sub> (por exemplo, rHb1.1, rHb2.0, hemoglobina sem soro, MP4, *hemospan* ou *poliheme*) ou por HAS pareada oncoticamente, são úteis para 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 O<sub>2</sub> é benéfica.

Os exemplos e a descrição detalhada apresentados 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 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 farmacêuticamente aceitável de uma proteína H-NOX, em que a constante de dissociação de O<sub>2</sub> 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.
2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é menor ou igual a cerca de  $0,65 \text{ s}^{-1}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ .

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

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

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  $4^{\circ}\text{C}$  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. pneumophilia*, 1 H-NOX do
- 25 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*,  $\beta$ 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I145Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1(1-
- 30 385) 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*, 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 O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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

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

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  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca 15 de  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre 20 cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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

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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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

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 O<sub>2</sub>, a k<sub>off</sub> 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.

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.

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*,

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*,  $\beta$ 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I140Y 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. 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)  
 15 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*;  
 20  
 25  
 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 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*.

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 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 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 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 O<sub>2</sub> 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  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ , 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 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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 2 nM e cerca de  $50 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

60. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 50 nM e cerca de  $10 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

61. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que a constante de dissociação de  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

62. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer 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 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 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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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

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

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  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de  $20 \text{ nM}$  e  $2 \text{ }\mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0$   
30  $\text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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 O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> 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 O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> 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<sub>off</sub> para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,0 s<sup>-1</sup> e cerca de 16,0 s<sup>-1</sup> a 20°C, e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca  
20 de 1 h<sup>-1</sup> 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<sub>off</sub> para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,0 s<sup>-1</sup> e cerca de 16,0 s<sup>-1</sup> a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s<sup>-1</sup> 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  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca  
5 de  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$ , a  $k_{\text{off}}$  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 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 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 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*, 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*,  $\beta$ 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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  $20^\circ C$ .

94. Método, de acordo com a reivindicação 93, 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  $20^\circ C$ .

95. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93 ou 94, caracterizado pelo fato de 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 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  $0,65 s^{-1}$  a  $20^\circ C$ .

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  $0,21 s^{-1}$  e cerca de  $0,65 s^{-1}$  a  $20^\circ C$ .

99. 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 entre cerca de  $1,35 s^{-1}$  e cerca de  $2,9 s^{-1}$  a  $20^\circ C$ .

100. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99, 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 O<sub>2</sub>, a k<sub>off</sub> 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. pneumophilia*, 1 H-NOX do  
 15 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*,  $\beta$ 1 H-NOX do  
 tipo selvagem de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I145Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1(1-  
 20 385) 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 I-1105G de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 H-NOX H105F de  
 25 *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*,  
 30  $\beta$ 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  
5 *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  
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 O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> a 20°C.

          118. Método, de acordo com a reivindicação 117,  
20 caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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

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

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  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a  $k_{\text{off}}$  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  $20^\circ\text{C}$ .

          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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre  
15 cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

          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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a taxa de auto-  
30 oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca

de  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do  
15 que cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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 hémé 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, 5 126, 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 O<sub>2</sub>, a k<sub>off</sub> para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme, reatividade de NO e/ou a estabilidade do 10 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, 15 138 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*, 20 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 25 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 30

de *T. tengcongensis*, I75F de *T. tengcongensis*, L144F-His6  
 de *T. tengcongensis*, L144F de *T. tengcongensis*, 2 H-NOX  
 F142Y de *L. pneumophilia*, 1 H-NOX do tipo selvagem de *L.*  
*pneumophilia*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophilia*,  
 5 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*,  $\beta$ 1 H-NOX do tipo selvagem de *H.*  
*sapiens*,  $\beta$ 1 I140Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I145Y de *H. sapiens*,  
 $\beta$ 1(1-385) de *H. sapiens*,  $\beta$ 1(1-385) I145Y de *H. sapiens*,  
 10  $\beta$ 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-  
 15 385) 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.*  
 20 *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  
 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.

5 150. 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 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  $700 \text{ s}^{-1}$  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<sub>2</sub> da proteína H-NOX é entre cerca de 2 nM e cerca de 50  $\mu$ M a 20°C.

10 156. Método, de acordo com a reivindicação 155, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O<sub>2</sub> da proteína H-NOX é entre cerca de 50 nM e cerca de 10  $\mu$ M a 20°C.

15 157. Método, de acordo com a reivindicação 155, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O<sub>2</sub> da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2  $\mu$ 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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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

164. Método, de acordo com a reivindicação 163, caracterizado pelo fato de que a  $k_{\text{off}}$  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  $20^\circ\text{C}$ .

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  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre 25 cerca de  $20 \text{ nM}$  e  $2 \text{ }\mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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

constante de dissociação de  $O_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $700 \text{ s}^{-1}$  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  $\text{O}_2$ , a  $k_{\text{off}}$  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*,

25 *tengcongensis*, 2 H-NOX F142Y de *L. 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*,  $\beta$ 1 H-NOX do

30 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. 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*;

20 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*;

30 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  
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,  
25 caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX é uma 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.

15           186. 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 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 farmacologicamente aceitável de uma proteína H-  
20 NOX, em que a constante de dissociação de O<sub>2</sub> 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 farmacologicamente aceitável.

25           192. Kit, de acordo com a reivindicação 191, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> e cerca de 0,65 s<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> e cerca de 2,9 s<sup>-1</sup> 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 O<sub>2</sub>, 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-NOX I5A de *T. tengcongensis*,  
30 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*,  $\beta$ 1 H-NOX do tipo selvagem de *H.*  
 20 *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. sapiens*,  $\beta$ 2(1-217) de *H.*  
*sapiens*,  $\beta$ 2(1-217) I142Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 H-NOX H105G de  
 25 *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-  
 30 217) 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  
5 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  
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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup>.

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  $20^\circ\text{C}$ .

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  $20^\circ\text{C}$ .

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  $20^\circ\text{C}$ .

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  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , 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  $20^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca

de 1 h<sup>-1</sup> 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 constante de dissociação de O<sub>2</sub> da proteína H-NOX é entre  
5 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<sup>-1</sup> 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<sub>off</sub> para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de 1,0 s<sup>-1</sup> e cerca de 16,0 s<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sub>off</sub> para oxigênio da proteína H-NOX é entre  
20 cerca de 1,0 s<sup>-1</sup> e cerca de 16,0 s<sup>-1</sup> a 20°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> a 37°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de 700 s<sup>-1</sup> 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.

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

            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  
20 ou 235, caracterizado pelo fato de que a proteína H-NOX compreende pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O<sub>2</sub>, 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. pneumophilia*, 1 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophilia*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophilia*, 25 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*,  $\beta$ 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I140Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1 I145Y de *H. sapiens*,  $\beta$ 1(1-385) de *H. sapiens*,  $\beta$ 1(1-385) I145Y de *H. sapiens*, 30  $\beta$ 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*, 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 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.

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 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 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 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

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 O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> 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 β1 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 O<sub>2</sub> da proteína H-NOX é entre cerca de 2 nM e cerca de 50 μM a 20°C.

249. Kit, de acordo com a reivindicação 248, 25 caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação de O<sub>2</sub> da proteína H-NOX é entre cerca de 50 nM e cerca de 10 μM a 20°C.

250. Kit, de acordo com a reivindicação 248, caracterizado pelo fato de que a constante de dissociação 30 de O<sub>2</sub> da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e 2 μM 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 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.

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.

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  $1,0 \text{ s}^{-1}$ .

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  $k_{\text{off}}$  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.

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

257. Kit, de acordo com a reivindicação 256, caracterizado pelo fato de que a  $k_{\text{off}}$  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  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre  
10 cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX é entre cerca de 20 nM e  $2 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$  e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$   
25 a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre

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

263. Kit, de acordo com qualquer uma das 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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX é entre cerca de  $1,0 \text{ s}^{-1}$  e cerca de  $16,0 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$  e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é de menos do que cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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 heme da proteína H-NOX é de menos do que cerca de  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$  e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX é menor do que  $1,8 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

265. 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 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, 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 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 O<sub>2</sub>, a k<sub>off</sub> para oxigênio, a taxa de auto-oxidação de heme e/ou a estabilidade do NO, comparadas com aquelas da proteína do tipo selvagem correspondente.

15 270. 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 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 *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 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*,  $\beta$ 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. 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 H1050 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*;  
 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*,  $\beta$ 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 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 O<sub>2</sub> da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 2 nM e cerca de 50  $\mu$ 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 O<sub>2</sub> da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 50 nM e cerca de 10  $\mu$ 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 O<sub>2</sub> da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM e cerca de 1,9  $\mu$ 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 0,01 e cerca de  $200 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX mutante é entre cerca de  $100 \text{ nM}$  e cerca de  $1,9 \text{ }\mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a  $k_{\text{off}}$  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  $20^\circ\text{C}$ .

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  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $k_{\text{off}}$  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  $20^\circ\text{C}$ , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $k_{\text{off}}$  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  $20^\circ\text{C}$ , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $1$   
 $\text{h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX  
10 mutante é de menos do que cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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 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.

312. Proteína H-NOX isolada, caracterizada por compreender pelo menos uma mutação que altera a constante de dissociação de O<sub>2</sub> ou reatividade de NO, comparada com aquela da proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente, em que a constante de dissociação de O<sub>2</sub> 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 W9F de *T. tengcongensis*, H-NOX do tipo selvagem de *T. tengcongensis* ou 2 H-NOX F142Y de *L. pneumophilia*.

313. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 312, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX mutante 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*,  $\beta$ 1 H-NOX do tipo selvagem de *H. sapiens*, sGC  $\beta$ 1 H-NOX (1-385) de *R. norvegicus*,  $\beta$ 1 H-NOX (1-385) I145Y de *R. norvegicus* sGC, 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*.

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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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  $20^\circ\text{C}$ .

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  $20^\circ\text{C}$ .

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  $20^\circ\text{C}$ .

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  $19 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $4^\circ\text{C}$  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  $\beta$ 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  $\beta$ 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. pneumophilia*.

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. pneumophilia*,  $\beta 1$  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 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  $k_{\text{off}}$  para oxigênio da proteína H-NOX mutante é menor ou igual a cerca de  $0,65 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

341. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 340, caracterizada pelo fato de que a  $k_{\text{off}}$  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  $20^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX mutante é entre cerca de  $1 \text{ nM}$  e cerca de  $1 \text{ mM}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX mutante é entre cerca de  $2 \text{ nM}$  e cerca de  $50 \text{ }\mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX mutante é entre cerca de  $50 \text{ nM}$  e cerca de  $10 \text{ }\mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX mutante é entre cerca de  $100 \text{ nM}$  e cerca de  $1,9 \text{ }\mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX mutante é 20 entre cerca de 100 nM e cerca de  $1,9 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a taxa de auto-oxidação de heme da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX mutante é entre cerca de 100 nM e cerca de  $1,9 \mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ , e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $1 \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ , e em  
5 que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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,  
25 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354 ou 355, 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* 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $18 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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, 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 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  $k_{off}$  para oxigênio da proteína H-NOX mutante é de menos de  $0,65 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ , 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 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 de *L. pneumophilia*, 2 H-NOX do tipo selvagem de *L. pneumophilia*,  $\beta 1$  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*.

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  $20^\circ\text{C}$ .

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  $\text{O}_2$  da proteína H-NOX mutante é entre cerca de  $100 \text{ nM}$  e cerca de  $1,9 \text{ }\mu\text{M}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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  $700 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

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<sup>-1</sup> 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 O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> a 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 O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup>.

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<sup>-1</sup> a 37°C, e em que a reatividade de NO da proteína H-NOX mutante é de menos do que cerca de 700 s<sup>-1</sup> 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.

5 382. Proteína H-NOX isolada, de acordo com qualquer 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.

5 387. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 386, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é uma proteína humana.

10 388. Proteína H-NOX isolada, de acordo com a reivindicação 387, caracterizada pelo fato de que a proteína H-NOX do tipo selvagem correspondente é  $\beta 1$ .

15 389. 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 tipo selvagem correspondente é uma proteína bacteriana.

20 390. 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*.

25 391. 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  $\beta 1$  I140Y de *H. sapiens*.

30 392. 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 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*,  $\beta$ 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) L9WI145Y,  $\beta$ 2(1-217),  $\beta$ 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. pneumophilia*, H-NOX(728-899) de *D. desulfuricans*, H-NOX Y139L de *D. desulfuricans*,  $\beta$ 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)1142Y, 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 O<sub>2</sub> 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.

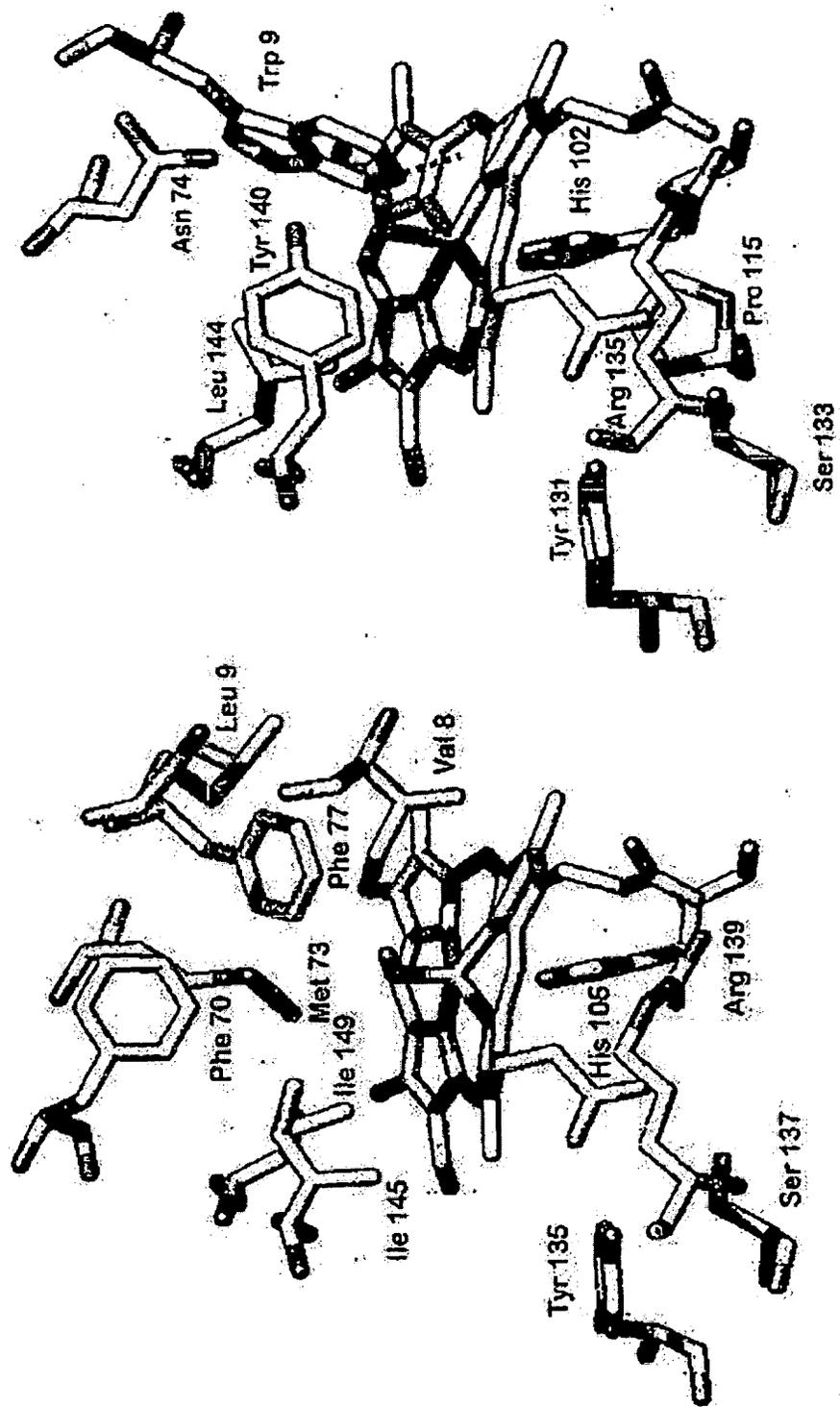
5 399. Vetor, caracterizado por compreender um ácido nucléico da reivindicação 398.

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. tengocognensis*

Figura 1A

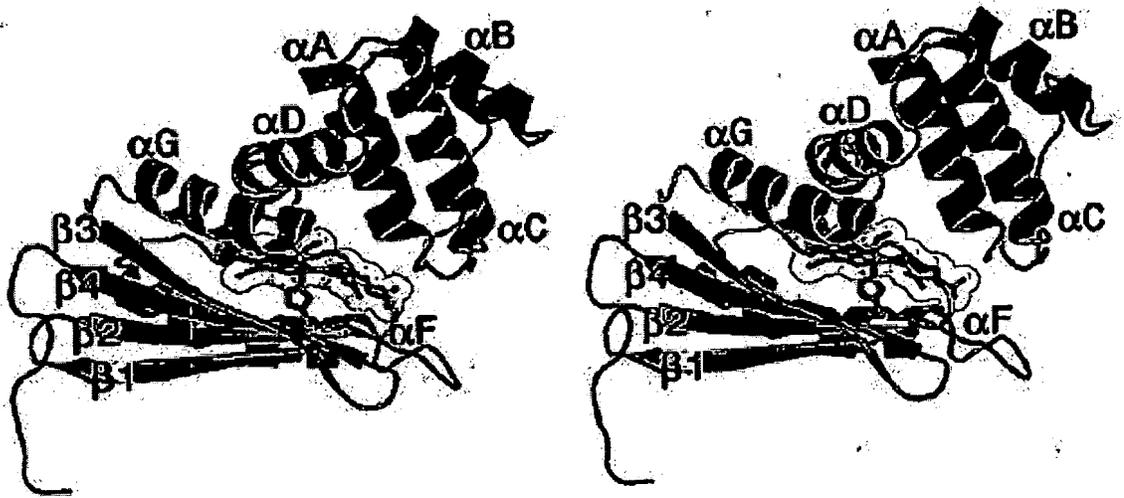
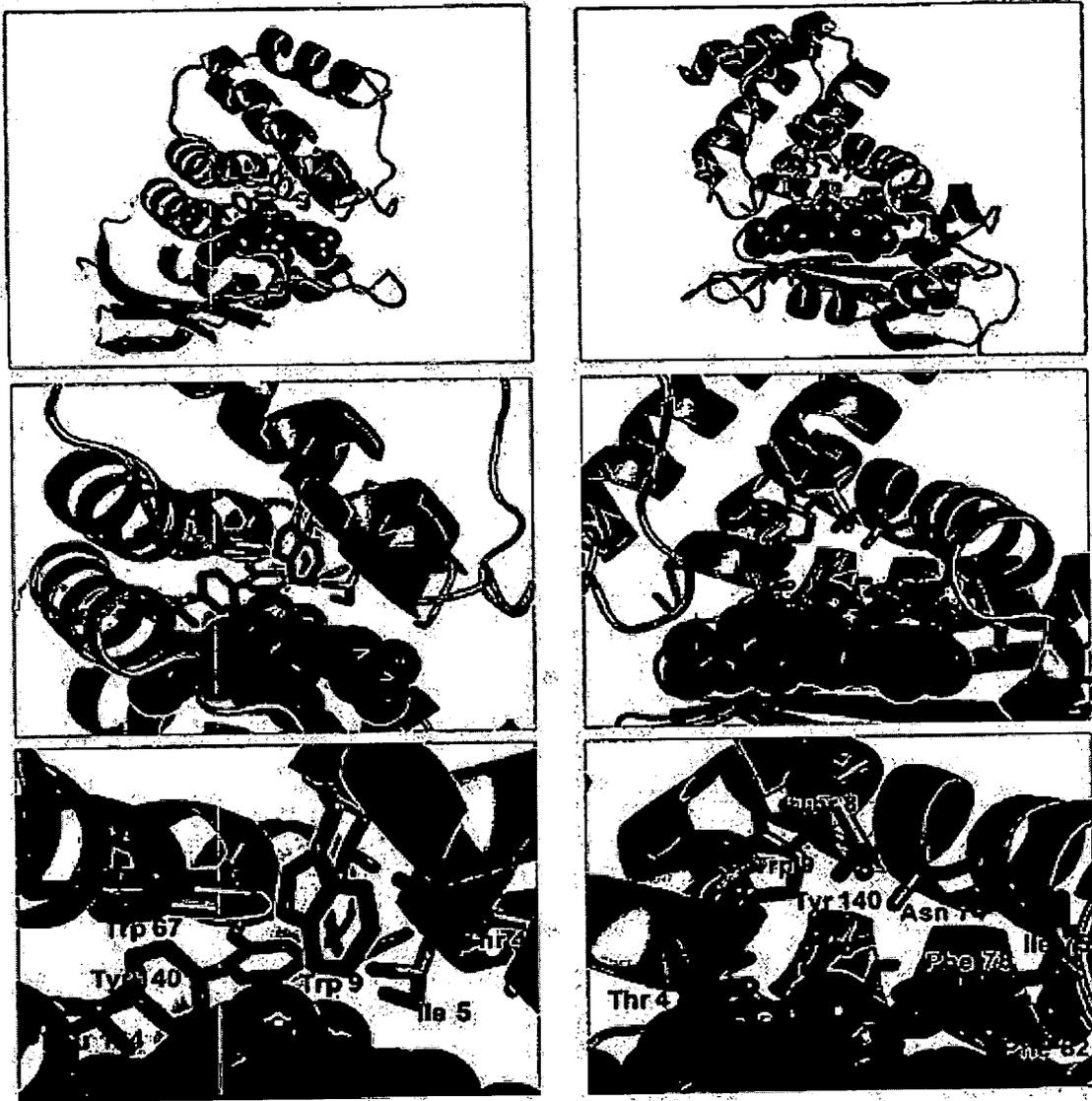


Figura 1B



Figuras 1C-1H

### Exemplos de H-NOX de ligação de oxigênio

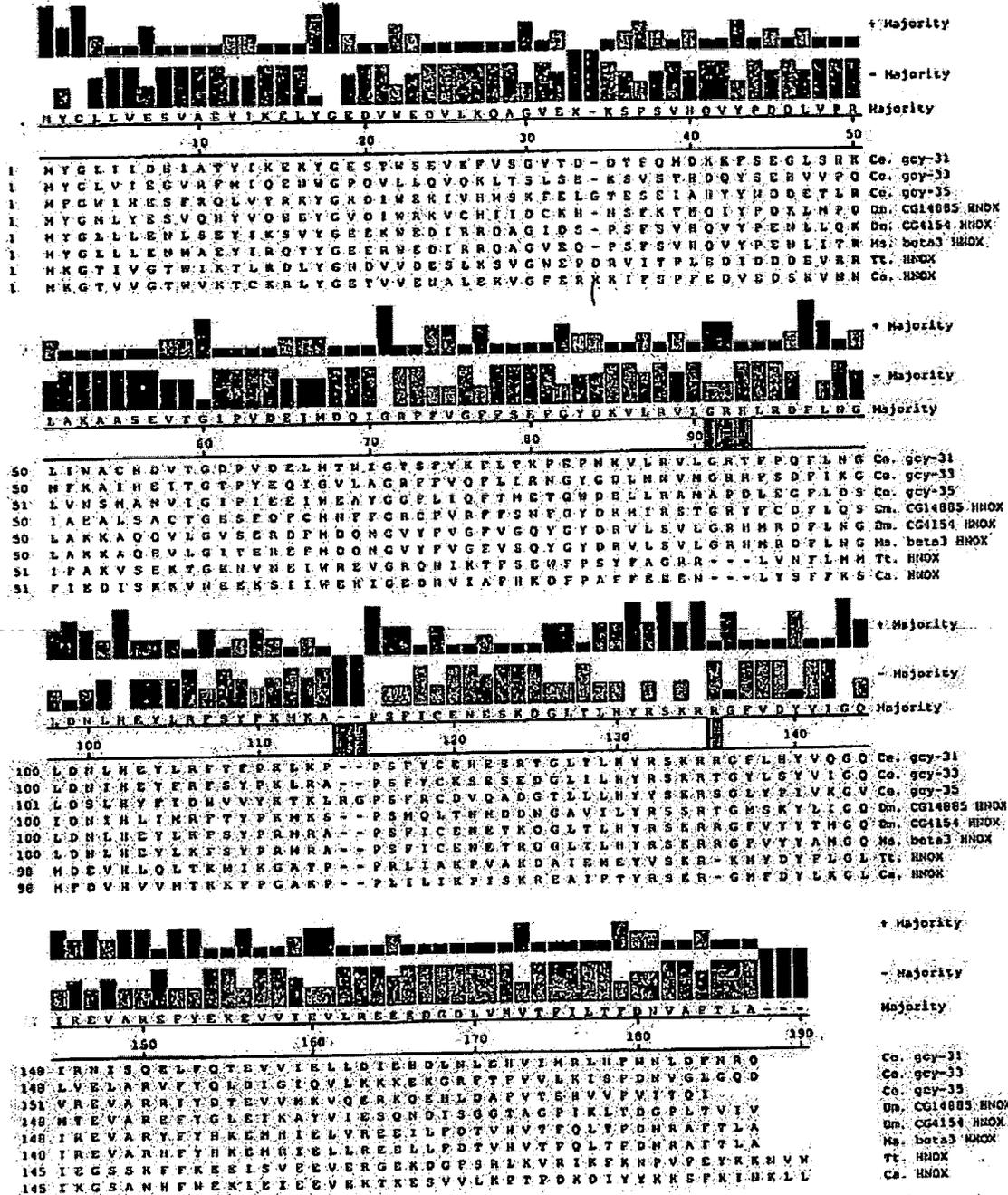


Fig. 2

Exemplos de H-NOX de ligação de NO

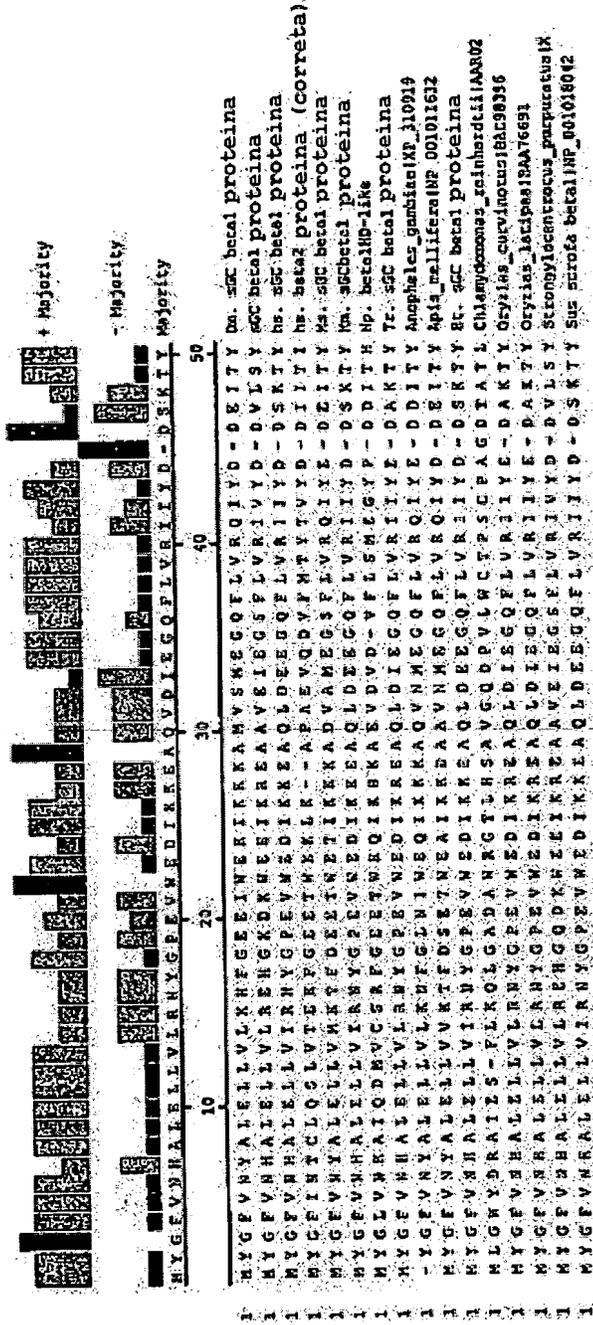


Figura 3A

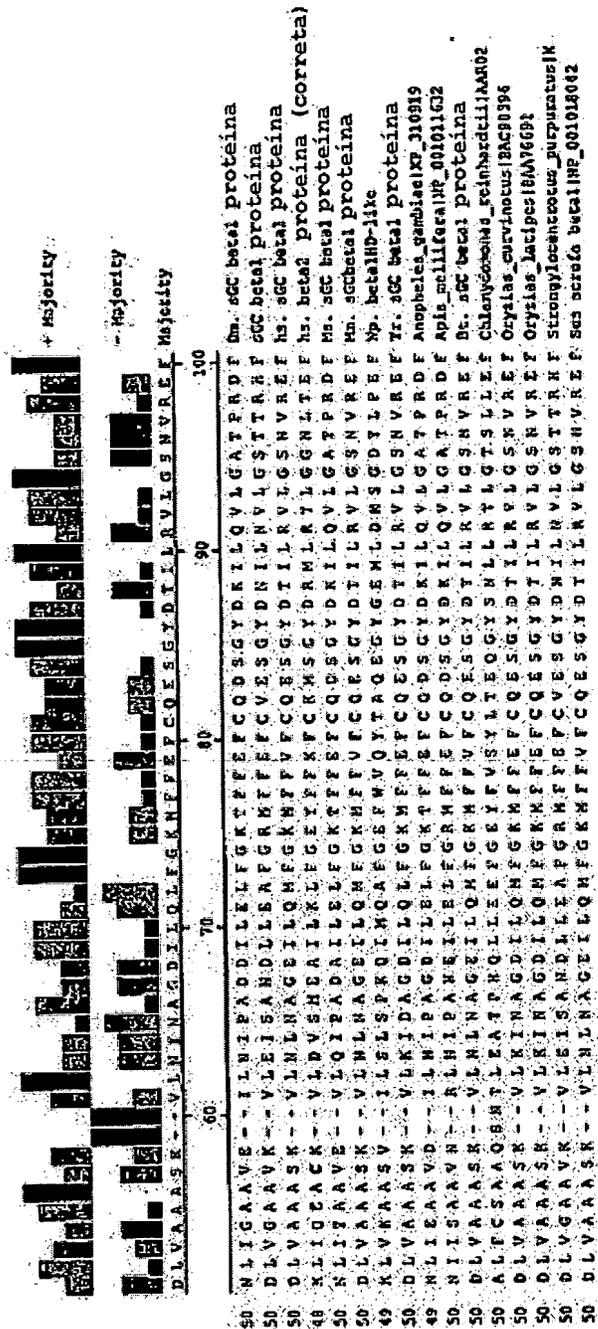


Figura 3B

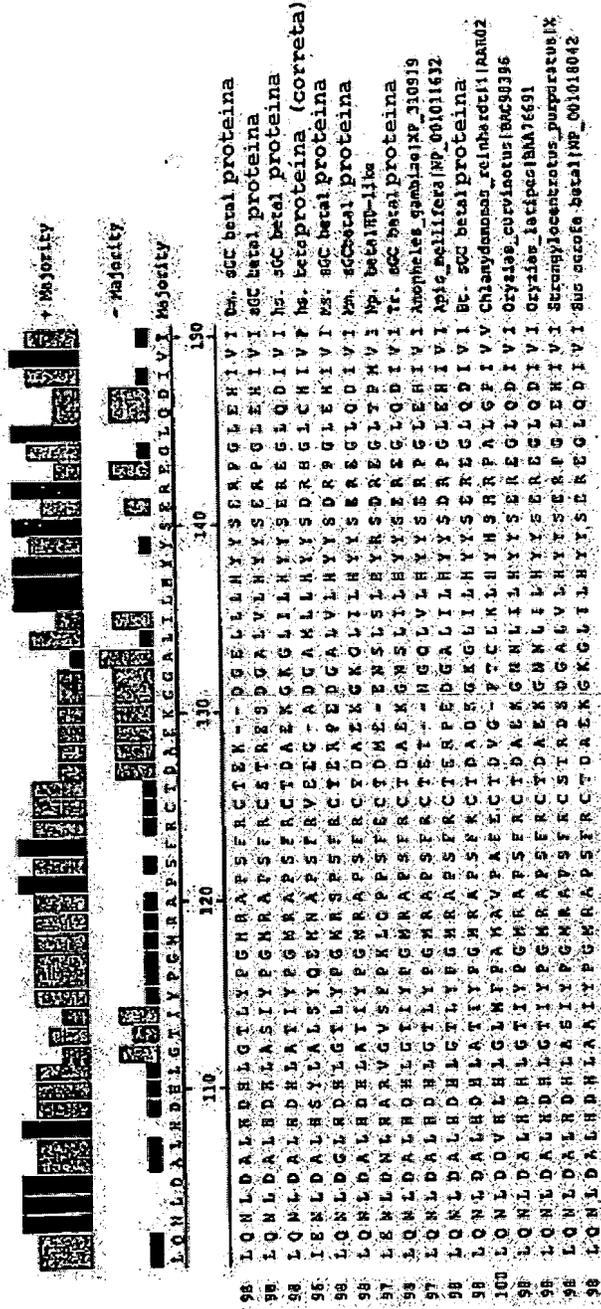


Figura 3C

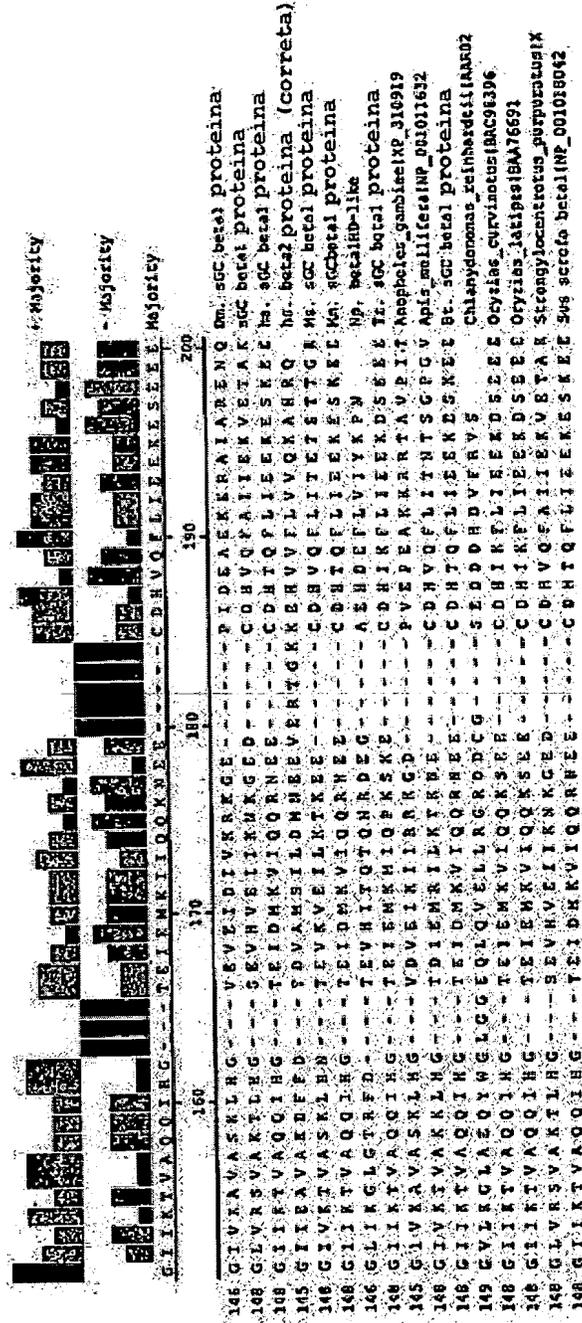


Figura 3D



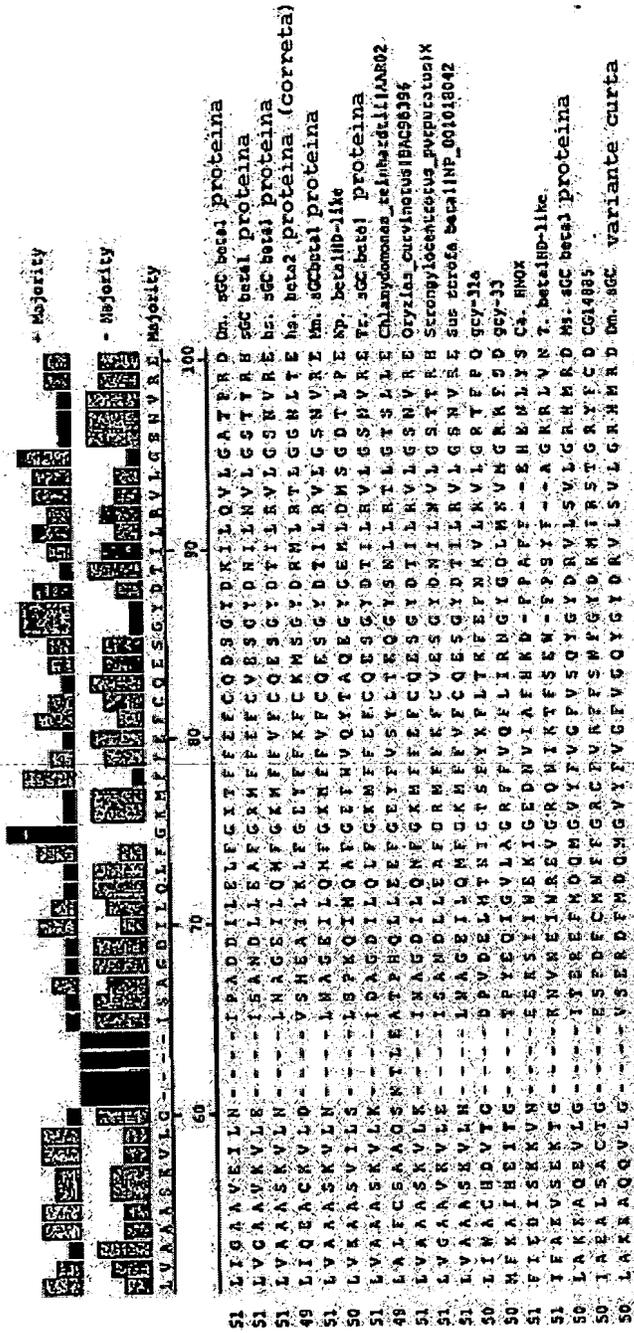


Figura 4B

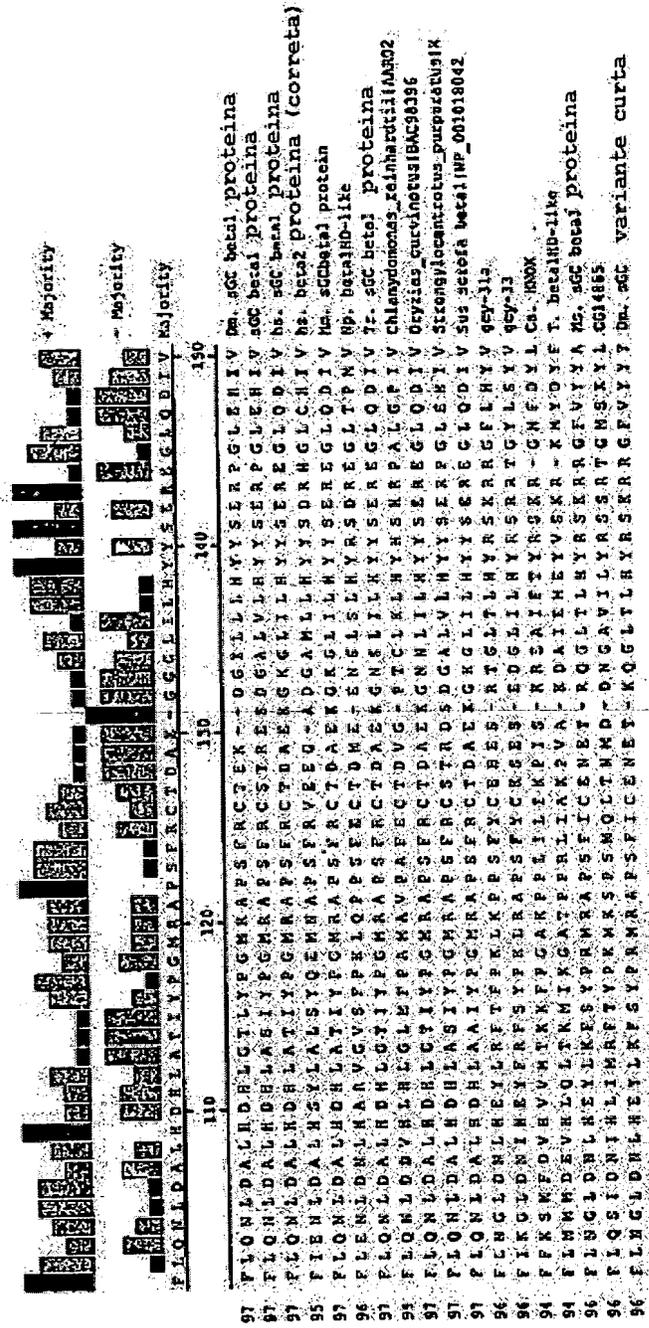
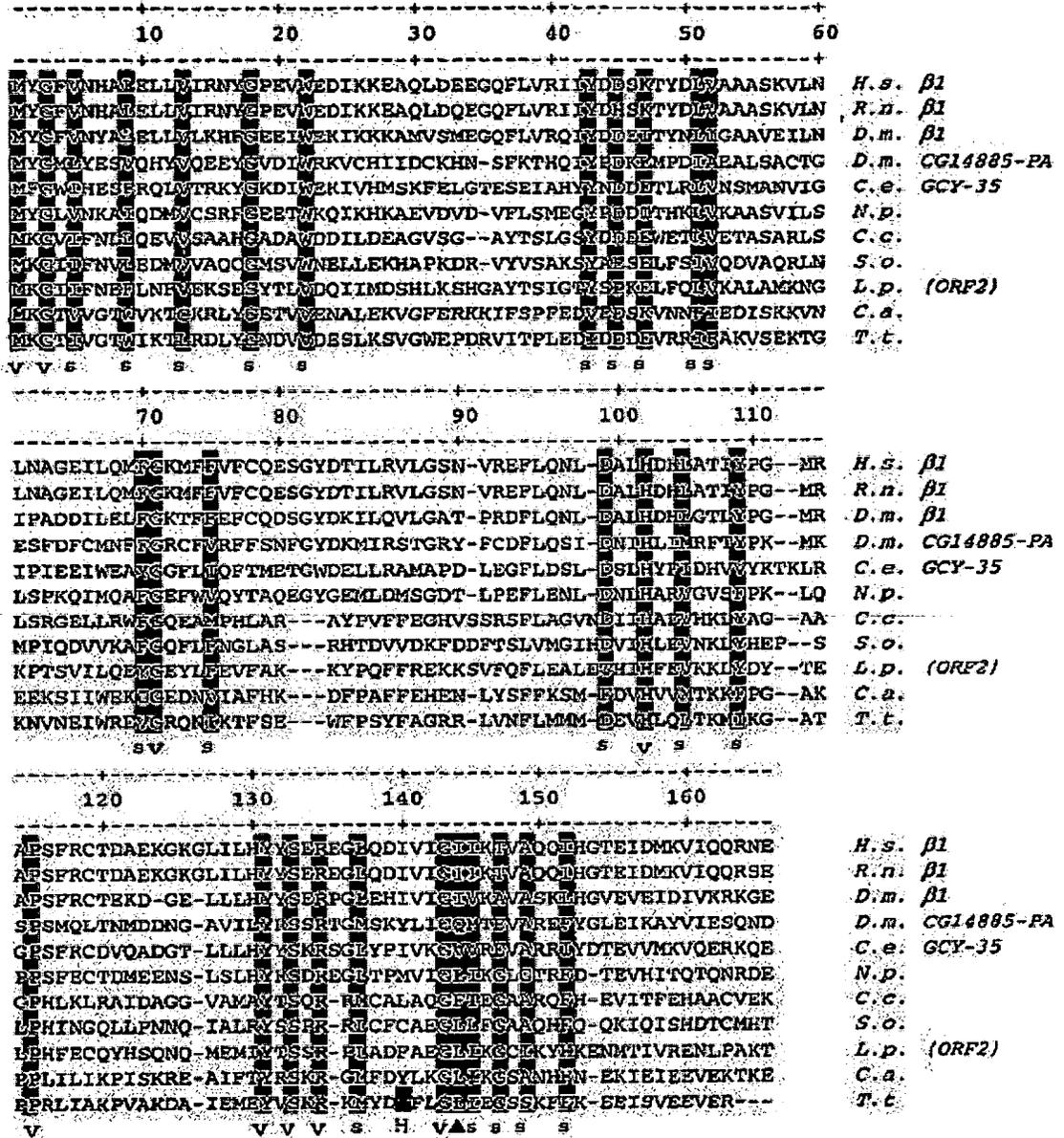


Figura 4C

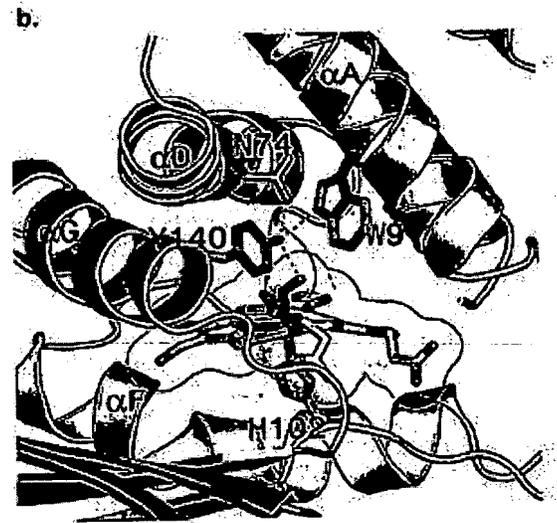
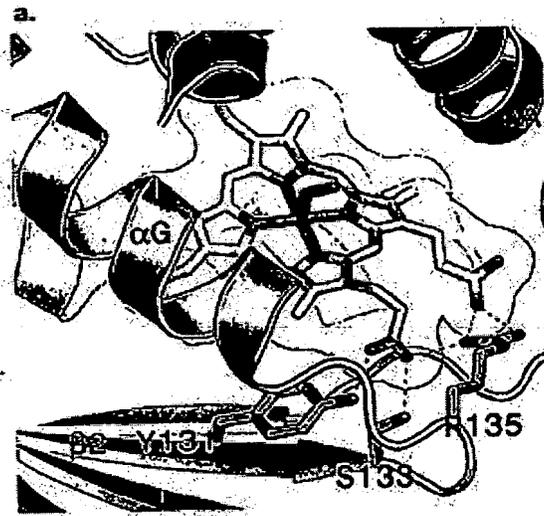


Figura 5A

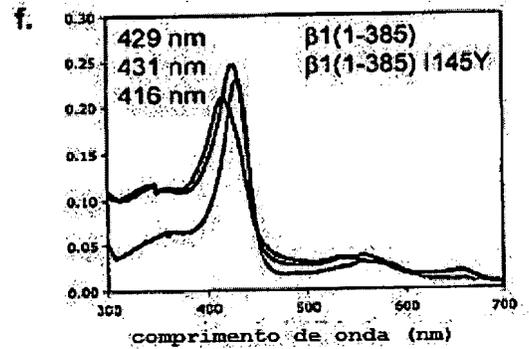
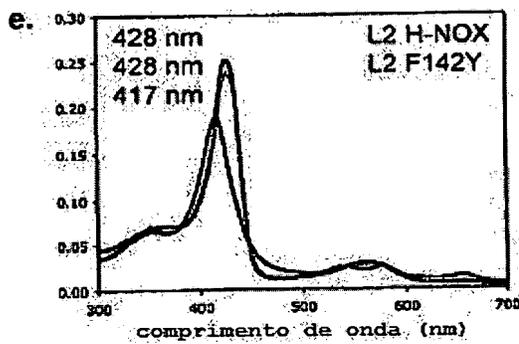
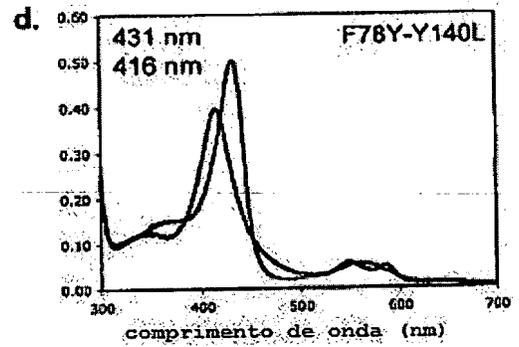
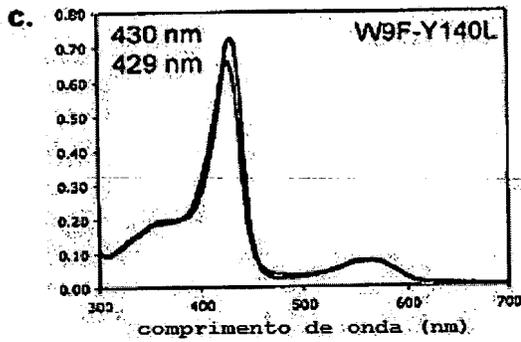
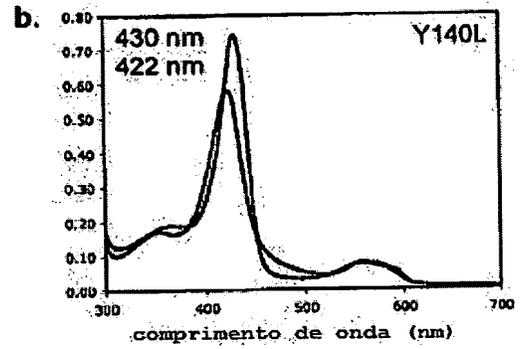
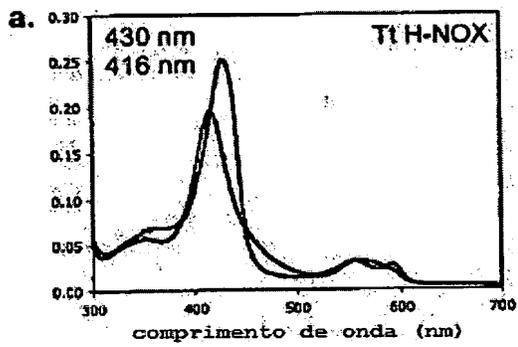




Figuras 6A e 6B



## Figuras 7A-7E



Seqüências de H-NOX mutante e a WT H-NOX parente

NUCLEOTÍEDOS seguidos por AMINOÁCIDOS

*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX

Tt. WT

(ID. DE SEQ. n°: 53)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC  
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAAGATGTACGATTAGTTTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAAATTCAGTGGAAGAGGTGCAAAGAGGCGAAAAA  
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:54)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
WREVGRONIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNPVFE

Tt. Y140F

(ID. DE SEQ. n°: 55)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC  
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAAGATGTACGATTTCTTTTTAGGGCTTATAG  
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAAATTCAGTGGAAGAGGTGCAAAGAGGCGAAAAA  
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:56)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
WREVGRONIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNPVFE

Figura 8A

7L Y140L

(ID. DE SEQ. N°: 57)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATCTTTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGCGAAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:58)

MKGITVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGQRNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDLFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

7L Y140H

(ID. DE SEQ. N°: 59)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATCACTTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGCGAAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 60)

MKGITVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGQRNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDHFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

7L Y140A

(ID. DE SEQ. N°: 61)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATGCCTTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGCGAAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 62)

MKGITVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGQRNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDAPFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

Figura 8B

TL W9E

(ID. DE SEQ. N°: 63)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTTATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:64)

MKGTIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL W9E/Y140L

(ID. DE SEQ. N°: 65)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTTATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTTTTTTTAAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTGAGTGA

(SEQ ID NO:66)

MKGTIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL W9E/Y140H

(ID. DE SEQ. N°: 67)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTTATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATCACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 68)

MKGTIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

Figura 8C

TL W9E-N74A

(ID. DE SEQ. N°: 69)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTTATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGCAATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 70)

MKGTIVGTFIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKKNVNEI  
 WREVGRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL W9Y

(ID. DE SEQ. N°: 71)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATACATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAAGTGA

(SEQ ID NO:72)

MKGTIVGTYIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKKNVNEI  
 WREVGRONIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

TL W9N

(ID. DE SEQ. N°: 73)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACAAATATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 74)

MKGTIVGTNIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKKNVNEI  
 WREVGRONIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

Figura 8D

TL W9H

(ID. DE SEQ. N° 75)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACACACATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N° 76)

MKGTIVGTHIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIK GATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKBEISVVEEVERGEKDGFSRLKVRJKFKNPVFE

TL 15A

(ID. DE SEQ. N° 77)

ATGAAGGGGACAACAGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N° 78)

MKGTAVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI  
 IWREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIK GATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKBEISVVEEVERGEKDGFSRLKVRJKFKNPVFE

TL 15L

(ID. DE SEQ. N° 79)

ATGAAGGGGACACTTGTCTGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N° 80)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI  
 IWREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIK GATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKBEISVVEEVERGEKDGFSRLKVRJKFKNPVFE

Figura 8E

TL ISL P115A

(ID. DE SEQ. N°: 81)

ATGAAGGGGACACTTGTCTGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTGCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGGAAAGAGGTGCGAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 82)

MKGTLVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNE  
 IWREVGQRNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPARLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

TL P115A

(ID. DE SEQ. N°: 83)

ATGAAGGGGACAATCGTCTGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTGCCAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGGAAAGAGGTGCGAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 84)

MKGTVVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGQRNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPARLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

TL N74E

(ID. DE SEQ. N°: 85)

ATGAAGGGGACAATCGTCTGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGAAATAAAAACTTTACGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGGAAAGAGGTGCGAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTATAAGAAA  
 AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 86)

MKGTVVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGQRNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEMEY  
 VSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEBKDGFSRLKVRIFKPNVFBYKKN

Figura 8F

ZL N74A/Y140H

(ID. DE SEQ. N°: 87)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGGCCATAAAAACTTTAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATCACTTTTATGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTTCAAGTGAAGAGGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGGAGTATAAGAAA  
 AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 88)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFMMMDDEVHQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDHFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEYKKN

ZL R135Q-His6

(ID. DE SEQ. N°: 89)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAACAGAAGATGTACGATTACTTTTATGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTTCAAGTGAAGAGGGTCGAAAGAGGCCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGGAGTATAAGAAA  
 AATCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

(ID. DE SEQ. N°: 90)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFMMMDDEVHQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKQKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEYKKNLEHHHHHH

Figura 8G

TL N74A

(ID. DE SEQ. N°: 91)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTC AACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGGCAGGCCATAAAAACTTTACGCGAATGGTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGTAGTATAAGAAA  
 AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 92)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGROAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNPVFEYKKN

TL N74A-His6

(ID. DE SEQ. N°: 93)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTC AACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGGCAGGCCATAAAAACTTTACGCGAATGGTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGTAGTATAAGAAA  
 AATCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

(ID. DE SEQ. N°: 94)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGROAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNPVFEYKKNLEHHHHHH

Figura 8H

Tz. W9N

(ID. DE SEQ. N°: 95)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACAAATATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTC AACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTCAGTGGAAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCOTTTTTGAGTATAAGAAA  
 AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 96)

MKGTIVGTNIKTLRDLYGNDVVDESLSKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGQRNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKKNPVFEYKKN

Tz. W9H

(ID. DE SEQ. N°: 97)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACACATATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTC AACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTCAGTGGAAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTATAAGAAA  
 AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 98)

MKGTIVGTHIKTLRDLYGNDVVDESLSKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGQRNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKKNPVFEYKKN

Figura 8I

TL N74H

(ID. DE SEQ. N°: 99)

ATGAAGGGGACAATCGTCCGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGCATATAAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGTAGTATAAGAAA  
 AATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 100)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVWPEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKKNVNEI  
 WREVGRQHIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKBEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEYKKN

TL I75F

(ID. DE SEQ. N°: 101)

ATGAAGGGGACAATCGTCCGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACTTCAAAACTTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGTAGCACCACCAC  
 CACCACCACTGA

(ID. DE SEQ. N°: 102)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVWPEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKKNVNEI  
 WREVGRQNFKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKBEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEHHHHHH

Figura 8J

7L L144E

(ID. DE SEQ. N°: 103)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTC AACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTCAGTGGAAGAGGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGCACCACCAC  
 CACCACCACTGA

(ID. DE SEQ. N°: 104)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEHHHHHH

7L WT-His6

(ID. DE SEQ. N°: 105)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT  
 GGTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG  
 ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAAT  
 GTC AACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC  
 CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA  
 GCTTACCAAGATGATAAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAAG  
 ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG  
 AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTCAGTGGAAGAGGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA  
 GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTATAAGAAA  
 AATCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

(ID. DE SEQ. N°: 106)

MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLSVSWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEI  
 WREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME  
 YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEYKKNLEHHHHHH

Figura 8K

Legionella pneumophila ORF2L2 WT

(ID. DE SEQ. N: 107)

ATGATGTCTATGAAAGGAATCATATTCAACGAATTTCTCAATTTTGTAGAAAAAAGTGAATCC  
TACACCCTGGTAGATCAAATTATFATGGATAGTCATTTGAAGTCCCATGGTGCCTACACGTCT  
ATCGGTACATACTCTCCCAAAGAATTATTTCAATTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGC  
AAACCAACATCAGTGATTTTACAAGAATATGGTGAGTATTTGTTGAGGTTTTGCAAAAAAA  
TATCCTCAATTTTTCAGGGAAAAAAAGTCCGTGTTTCAATTTTGGGAAGCGCTTGAAACACAT  
ATTCAATTTTGAAGTAAAAAATTGTATGACTATACTGAACTACCCCATTTTGAATGCCAATAT  
CACAGTCAAAATCAAATGAAAATGATTTACACTTCTTCGCGTCCTTTGGCCGATTTTGGCGAA  
GGTTTAATAAAAAGGTTGTATTAATATCATAAAGAAAACATGACTATTGTTGCGTAAAAATCTG  
CCTGCAAAAACAGGCTTTAAGGTAAGATTTGTATTAACAAAAGGCGATCCTGATGAGTGA

(ID. DE SEQ. N: 108)

MMSMKGIHFNEFLNFVEKSESYTLVDQIIMDSHLKSHGAYTSIGTYSKELFQLVKALAMKNGKPT  
SVILQEYGEYLFVFAKKYPQFFREKKSVPQFLEALETHIHFEVKKLYDYTELPHFECQYHSQNQM  
EMIYTSSRPLADFAEGLIKGCIKYHKENMTIVRENLPKGTGFKVRFVLTGDPDE

L2 F142Y

(ID. DE SEQ. N: 109)

ATGATGTCTATGAAAGGAATCATATTCAACGAATTTCTCAATTTTGTAGAAAAAAGTGAATCC  
TACACCCTGGTAGATCAAATTATFATGGATAGTCATTTGAAGTCCCATGGTGCCTACACGTCT  
ATCGGTACATACTCTCCCAAAGAATTATTTCAATTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGC  
AAACCAACATCAGTGATTTTACAAGAATATGGTGAGTATTTGTTGAGGTTTTGCAAAAAAA  
TATCCTCAATTTTTCAGGGAAAAAAAGTCCGTGTTTCAATTTTGGGAAGCGCTTGAAACACAT  
ATTCAATTTTGAAGTAAAAAATTGTATGACTATACTGAACTACCCCATTTTGAATGCCAATAT  
CACAGTCAAAATCAAATGAAAATGATTTACACTTCTTCGCGTCCTTTGGCCGATTTATGGCGAA  
GGTTTAATAAAAAGGTTGTATTAATATCATAAAGAAAACATGACTATTGTTGCGTAAAAATCTG  
CCTGCAAAAACAGGCTTTAAGGTAAGATTTGTATTAACAAAAGGCGATCCTGATGAGTGA

(ID. DE SEQ. N: 110)

MMSMKGIHFNEFLNFVEKSESYTLVDQIIMDSHLKSHGAYTSIGTYSKELFQLVKALAMKNGKPT  
SVILQEYGEYLFVFAKKYPQFFREKKSVPQFLEALETHIHFEVKKLYDYTELPHFECQYHSQNQM  
EMIYTSSRPLADYAEGLIKGCIKYHKENMTIVRENLPKGTGFKVRFVLTGDPDE

Figura 8L

L2 F9W-F142Y

(ID. DE SEQ. N°: 111)

ATGATGTCTATGAAAGGAATCATATGGAACGAATTTCTCAATTTTGTAGAAAAAAGTGAATCC  
TACACCCTGGTAGATCAAATTATTATGGATAGTCATTTGAAGTCCCATGGTGCCTACACGTC  
ATCGGTACATACTCTCCCAAAGAATTATTCAATTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGC  
AAACCAACATCAGTGATTTTACAAGAATATGGTGAGTATTTGTTGAGGTTTTTGCAAAAAA  
TATCCTCAATTTTTTCAGGGAAAAAAGTCGGTGTTCATTTTTTGGAAAGCGCTTGAAACACAT  
ATTCATTTTGAAGTGAAAAAATTGTATGACTATACTGAACTACCCCATTTTGAATGCCAATAT  
CACAGTCAAATCAAATGGAAATGATTTACACTTCTTCGCGTCCTTTGGCCGATTATGCCGAA  
GGTTAATAAAAAGGTTGTATTAATATCATAAAGAAAAACATGACTATTGTTTCGTGAAAAATCTG  
CCTGCAAAAACAGGCTTTAAGGTAAGATTTGTATTAACAAAAGGCGATCCTGATGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 112)

MMSMKGIWNEFLNFVEKSESYTLVDQIIMDSHLKSHGAYTSIGTYSPKELFQVKALAMKNGKP  
TSVILQBYGEYLFVFAKKYPQFFREKKSVMQFLEALETHIHFEVKKLYDYTELPHFECQYHSQNJ  
MEMIYTSSRPLADYAEGLIKGCIKYHKNEMTIVRENLPKATGFKVRFVLTGKDPDE

Legionella pneumophila ORF1LI WT

(ID. DE SEQ. N°: 113)

ATGAAAGGTATCGTTTTTACCTCCTTAAATGACATGATTATAGAACAATTTGGCATAGAAACC  
TGGGACCAACTCGTATCCTCACTAGACCTTCCAAGTGGTGGAAAGTTATACAGCAGGCGGCACT  
TACTCGGATACAGAATTCAGCAATTGATTAAGGCCATTGCGAAGAGGACCAATCAGCAGCCT  
TCTGTTTTTTAGAGGCCTTTGGTGAATACATGTTTCTATCTTATCGAGTAAGTGCGCAATTTT  
TTAAAAAAGGACATGACATTAAGAATTTTTAAAAAGCATTGATGGAACAATTCATGTGG  
AAGTAGAAAAGTTATACCCAGATGAAACATTACCTACCATTAGCTATGAAGAGCCTGCTGCA  
AACCAATTGTTATGGTGTATCGATCGCATAGAAGACTCTGTCAATTTTGAATGGGGCTCATC  
CAGGGAGCAGCGCAACATTTAAAAAGAAAATTAACATTAAGCAGACTCACTGCATGTTAAA  
AAAAGATGATCATTGTCGTTTGGAGATTACCTTTGAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 114)

MKGIVFTSLNDMIEQFIETWDQLVSSLDLPSGGSYTAGGTYSDTEFQQLIKALAKRTNQHASVFL  
EAFGEYMFILSSKCAIFLKKDMLKEFLKSIDGTHVEVEKLYPDETLPTISYEPAANQLVMVYR  
SHRRLCHFAMGLIQGAAQHFKKITIKQTHCMLKDDHCRLEITFE

Figura 8M

LI F142Y

(ID. DE SEQ. N°: 115)

ATGAAAGGTATCGTTTTTACCTCCTTAAATGACATGATTATAGAACAAATTTGGCATAGAAACC  
 TGGGACCAACTCGTATCCTCACTAGACCTTCCAAGTGGTGGAAAGTTATACAGCAGCGGCACT  
 TACTCGGATACAGAATTTTCAGCAATTGATTAAGGCCATTGCGAAGAGGACCAATCAGCAGCT  
 TCTGTTTTTTTAGAGGCCTTTGGTGAATACATGTTTCTTATCGAGTAAGTGGCAATTTT  
 TTTAAAAAAGGACATGACATTAAGAATTTTAAAAAGCATTGATGGAACAATTCATGTGG  
 AAGTAGAAAAGTTATACCCAGATGAAACATTACCTACCATTAGCTATGAAGAGCCTGCTGCA  
 AACCAATGGTTATGGTGTATCGATCGCATAGAAGACTCTGTCAATACGCAATGGGGCTCATC  
 CAGGGAGCAGCGCAACATTTTAAAAAGAAAATTACCATTAAGCAGACTCACTGCATGTTAAA  
 AAAAGATGATCATTGTCGTTTGGAGATTACCTTGAAGTGA

(ID. DE SEQ. N°: 116)

MKGIVFTSLNDMIEQFGIETWDQLVSSLDLPSSGGSYTAGGTYSDFEQOLIKAIKRTNQHASVFL  
 EAFGEYMPILSSKCAJFLKDMTLKEFLKSIDGTHIVEVEKLYPDETLPTISYEPPAANQLVMVYR  
 SHRRLCHYAMGLIQGAAQHFKKIKTKQTHCMLKDDHCRLEITFE

Desulfovibrio desulfuricansDd H-NOX(728-899)

(ID. DE SEQ. N°: 117)

ATGAAGATGCGCGGTATTTTCCGAAAATATTTATGAATTTTATAAAAGAGATCTATGGGGAT  
 GACGTGTTTGCTCATGTTTCTAAAACCATGGGCGAGCCTGTCTTATGCGGGAAATTCCTACC  
 CTGATCAGGTGTTGCGCCAGATGGCTGAAATAGTATGCCAGCGCACGGGCGAACAGCCCAAG  
 TTGTTTTTTGAAAAGCAGGGCGTGCAAGCCTGCAGGCTTTTAAACAGAATGTACAGGCAGTAC  
 TTTAAAGGGGAAACCCTTAAAGAGTTTCTGCTGGCCATGAATGATATCCACAGGCACCTGACA  
 AAGGACAATCCCGGCGTACGCCCGCTAAATTTGAGTATGACGATCAGGGCGATACGCTTGT  
 ATGACATATAAGTCGCAGAGGGATTACGGAGAATACITTTGTGGGCATCATCAAGGCAGCTGC  
 GGAGTTTTAAAAAGGAAAAAGTGCATCAGCTCGGAGCATGCCGTAAGGGGCGAACAAAG  
 GCAAGGGTTACATTTATTAATGA

(ID. DE SEQ. N°: 118)

MKMRGILPKIFMNFKEIYGDDVFAHVSKTMGEPVFMPGNSYPDQVLRQMAEIVCQRTGEOPKLF  
 FEKAGRASLQAFNRMRYQYFKGETLKEFLAMNDIHRHLTKDNPGRVPPKFEYDDQGDTLVMTY  
 KSQRDYGEYFVGIIKAAAEFKKEKVRJSSEHAGKGRRTARVTFIK

Figura 8N

Dd. Y139L (728-899)

(ID. DE SEQ. N°: 119)

ATGAAGATGCGCGGTATTTTGGCGAAAATATTTATGAATTTTATAAAAAGAGATCTATGGGGAT  
 GACGTGTTTGCTCATGTTTCTAAAACCATGGGCGAGCCTGTCTTCATGCCGGGAAATTCCTACC  
 CTGATCAGGTGTTGCGCCAGATGGCTGAAATAGTATGCCAGCGCACGGGGCGAACAGCCCAAG  
 TTGTTTTTTGAAAAAGCAGGGCGTGCAAGCCTGCAGGCTTTTAAACAGAATGTACAGGCAGTAC  
 TTTAAAGGGGAAACCCTTAAAGAGTTTCTGCTGGCCATGAATGATATCCACAGGCACCTGACA  
 AAGGACAATCCCGGCGTACGCCCGCCTAAATTTGAGTATGACGATCAGGGCGOATACGCTTGT  
 ATGACATATAAGTCGCAGAGGGATTACGGAGAACTTTTTGTGGGCATCATCAAGGCAGCTGC  
 GGAGTTTTAAAAGGAAAAAOTGCGTATCAGCTCGGAGCATGCCGGTAAGGGGGCGAACAACG  
 GCAAGGGTTACATTTATTAATGA

(ID. DE SEQ. N°: 120)

MKMRGILPKIFMNFKEIYGDDVFAHVSKTMGEPVFMPGNSYPDQVLRQMAEIVCQRTGEQPKLF  
 FEKAGRASLQAFNRMRYQYFKGETLKEFLAMNDIHRHLTKDNPGVRPPKFEYDDQGDTLVMTY  
 KSORDYGELFVGIKAAAEFKKEKVRISSEHAGKGRRTARVTFIK

Homo sapiens B1(1-385)Hs. WT (1-385)

(ID. DE SEQ. N°: 121)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTCAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGCGTGTCTGGGCTCTAATGTCAGAGAAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC  
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGGGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAGGACTCATTTTGCCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCAAT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC  
 CATATACATTCTGCAAAGCTTTTCTTTTATATAAATTTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA  
 GTGTTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCT  
 GTCTTCTCGTGGTTCGTCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTCTCACATCAATAC  
 TGTITTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG  
 AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG  
 CAGATAGCATACTTTTTCTATGTTACCAAGTGTCATGAACCTGGACGATTTGACAAGGAGAG  
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGCGATCTTGTCTTTTGGGAGAAC  
 AATTTAGAGAGGAATACAAACTCACCCAAGAAGTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC  
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 122)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFVKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCCTDAEKGKG  
 LILHYYSEREGLDIVIGIKTVAQQIHGTBIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF  
 EENGTQESRISPYTFCKAFPFHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDISFHG  
 ILSHINTVFVLRKSKEGLLDVEKLECEDELTGTBISCLRLKGMVYLPADSLFLCSPSVMNLDDLTR  
 RGLYLSDIPLHDATRDVLLGGEQFREYKLTQELBILTDRLQLTRALED

Figura 80

Hs. BM(1-385) 1145Y

(ID. DE SEQ. N°: 123)

ATGTACGGATTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAATTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGGGTGTCCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCCTTGATGCTCTGCAC  
 GACCACCTTGCTACCATCTAACCAGGAATGCGTGCACCTTCCCTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAGGACTCATTTTGCCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATTATGTCATT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGA AATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTAATTGAAGAAAAGAGTCAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC  
 CATATACATTCTGCAAAGCTTTTCCCTTTTCATATAATATTTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA  
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCT  
 GTCTTCTCGCTGGTTCGTCTCATATTGATATTAGTTCCATGGGATCCTTCTCACATCAATAC  
 TGTTTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG  
 AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG  
 CAGATAGCATACTTTTCTATGTTTACCAAGTGTGATGAACCTGGACGATTGACAAGGAGAG  
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGCGATCTTGTCTTTGGGAGAAC  
 AATTTAGAGAGGAATACAAACTCACCAAGAAGTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC  
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 124)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFVKMFFVFCQESGYDILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATYFGMRAPSFRCCTDAEKGKG  
 LILHYYSEREGLDYVIGIHKTVAQIHGTEIDMKVIQQRNEBCDHTQFLIBEKESKEEDFYEDLDRF  
 EENGTQESRISPYTFCKAFPFIIFDRDLVVTQCGNATYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDISFHG  
 ILSHINTVFVLRKSKEGLLDVEKLECEDELGTETISCLRLKGMVYLPEADSIIFLCSPSVMNLDLDR  
 RGLYLSDIPLHDATRDVLLGEQFREYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

Figura 8P

**Hs. 81(1-385) 1145H**

(ID. DE SEQ. N°: 125)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGGCTGTCTCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC  
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAGGACTCATTTTGCCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATCATGTCATT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTTAATTGAAGAAAAGAGTCAAAAAGAG  
 AGGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC  
 CATATACATTCGCAAAGCTTTTCTTTTCATATAATATTTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA  
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCT  
 GTCTTCTCGCTGGTTCGTCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTTCTCACATCAATAC  
 TGTTTTGTATTGAGAAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAAGATGTGAGGATG  
 AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG  
 CAGATAGCATACTTTTTCTATGTTTACCAAGTGTGATGAACCTGGACGATTTGACAAGGAGAG  
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGGATCTTGTCTTTTGGGAGAAC  
 AATTTAGAGAGGAATACAACTCACCCAAGAAGTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC  
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 126)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATTYPGMRAPFRCTDAEKGKG  
 LILHYYSERGLQDHVIGIHTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEBKESKEEDFYEDLDRF  
 EENGTQESRISPYTFCKAFFPHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVVRPHIDISFHG  
 ILSHNTVFVLRKSKEGLDVEKLECEDELGTBISCLRLKGQMIYLPEADSILFLCSPSVMNLDLDR  
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEOFREEYKLTQELEILTDRQLTLRALED

**Figura 8Q**

**Hs. B1(L-385) C78Y**

(ID. DE SEQ. N°: 127)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAOTTTCTTGTCAAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTGGGAAGATGTTTTTCGCTTTTACCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGGGTGCTCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC  
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACCTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAGGACTCATTITGCACTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC  
 CATATACATTCTGCAAAGCTTTTCCTTTTCATATAAATTTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA  
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCT  
 GTCTTCTCGTGGTTCGTCCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTCTCATCAATAAC  
 TTTTTTTGATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG  
 AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG  
 CAGATAGCATACTTTTTCTATGTTACCAAGTGTGATGAACCTGGACGATTTGACAAGGAGAG  
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGGATCTTGTCTTTGGGAGAAC  
 AATTTAGAGAGGAATACAAACTCACCCAAGAACTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC  
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 128)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFVKMFFVIFYQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATYPGMRAPSFRCDAEKGKG  
 LILHYYSEREGLQDIVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIBEKESKEEDFYEDLDRF  
 BENGTOESRISPYTFCKAFPHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDISFHG  
 ILSHINTVPVLRSEKGLLDVEKLECEDELGTETISCLRLKGQMIYLPEDSILFLCSPSVMNLDLDR  
 RGLYLSDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILIDRLQLTLRALED

**Figura 8R**

**Hs. 81 (1-385) H105F**

(ID. DE SEQ. N°: 129)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTCAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGCGTGTCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGTTCC  
 ACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGACCTTCCITTAGGTGCACTGATGCAGAAA  
 AGGGCAAAGGACTCATTITGCACTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATTG  
 GAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCAG  
 CAAAGAAATGAAGAAATGTGATCATACTCAATTTTTAATGAAGAAAAGAGTCAAAGAAGA  
 GGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCCC  
 ATATACATTCTGCAAAGCTTTTCCITTTTTCATATAATATTTGACCGGGACCTAGTGOTCACTCAG  
 TGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCG  
 TCTTCTCGCTGGTTCGTCCFCATATTGATATTAGTTCCATGGGATCCTTCTCACATCAATACT  
 GTTTTTGATATGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATGA  
 ACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAGC  
 AGATAGCATACTTTTTCTATGTTACCAAAGTGTGATGAACCTGGACGATTTGACAAGGAGAGG  
 GCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCCGATCTTGTCTTTTGGGAGAACAA  
 ATTTAGAGAGGAATACAAACTCACCAAGAACTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTCA  
 CGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 130)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAFDHLATTYPGMRAPSFRCTDAEKGKGL  
 ILHYYSEREGLDIVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIOQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFE  
 ENGTQESRISPYTFCKAPPHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDISFHGI  
 LSHINTVPLRSKEGLDVEKLECEDELGTBISCLRLKQMIYLPEDSILFLCSPSVMNLDLDRR  
 GLYLSDIPLHDA TRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRQLTLRALED

Figura 8S

**Hs. B1 (1-385) H105G**

(ID. DE SEQ. N°: 131)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGCCTGCTCCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCCTTGATGCTCTGGGT  
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAGGACTCATTTTGCCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTTAATTGAAGAAAAGAGTCAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAAATGGTACCCAGGAATCACGCATCAGCC  
 CATATACATTCTGCAAAGCTTTTCCTTTTCATATAATTTTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA  
 GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCT  
 GTCTTCTCGTGGTTCGTCCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTTCTCACATCAATAC  
 TGTTTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG  
 AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG  
 CAGATAGCATACTTTTTCTATGTTCCACCAAGTGTATGAACCTGGACGATTTGACAAGGAGAG  
 GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGGATCTTGTCTTTTGGGAGAAC  
 AATTTAGAGAGGAATACAACTCACCCAAGAACTGGAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTC  
 ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 132)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEBQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALGDHLATYPGMRAPSFRCCTDAEKGKG  
 LILHYYSERBGLQDIVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF  
 EENGTQESRISPYTFCKAFPHIFDRDLVVTQCONAIYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDISFHG  
 ILSHNTVFVLRSEGLELDVEKLECEDELGTBEISCLRLKGQMIYLPADSLFLCSPSVMNLDLDR  
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREBYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

**Hs. B1(1-194)**

(ID. DE SEQ. N°: 133)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGCCTGCTCCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCCTTGATGCTCTGCAC  
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAGGACTCATTTTGCCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTTAATTGAAGAAAAGAGTCAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 134)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEBQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATYPGMRAPSFRCCTDAEKGKG  
 LILHYYSERBGLQDIVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

**Figura 8T**

**Hs. B1(1-194) II45Y**

(ID. DE SEQ. N°: 135)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGGCTGCTCCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC  
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAGGACTCATTITGCACTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATTATGTCATT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTAATTGAAGAAAAGAGTCAAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 136)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCCTDAEKKGK  
 LILHYYSEREGLDYVIGIHKVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

**Hs. B1(1-194) L9W-II45Y**

(ID. DE SEQ. N°: 137)

ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGC  
 TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGAT  
 ACAATCTTGGCTGCTCCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACCTTGATGCTCTGCAC  
 GACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGAA  
 AAGGGCAAAGGACTCATTITGCACTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATTATGTCATT  
 GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACTCAATTTTAATTGAAGAAAAGAGTCAAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 138)

MYGFVNHA WELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAG  
 EILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCCTDAEKKGK  
 GLILHYYSEREGLDYVIGIHKVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

Figura 8U

Rattus norvegicus B1(1-385)Rn. WT (1-385)

(ID. DE SEQ. N°: 139)

ATGTACGGTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC  
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGGGTGTCCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACATTGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC  
 CGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCTTTTACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCAGCA  
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC  
 TGTCTTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTCACACATCAAT  
 ACCGTCTTTGTA CTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAAACTTGAATGTGAGGA  
 TGA ACTGACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCCGTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA  
 AGCAGATAGCATCCCTCTTCTCTGTTACCAAGTGTGATGAACTTGGATGACCTAACAAGAAG  
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCTTTTGGGAGA  
 ACAGTCCCGGGAGGAGTACAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
 TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 140)

MYGFVNHAELELVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFVKMFFVFCQESGYDILRVLGNSVREFLQNLDAHDHLATITPGMRAPSFRCCTDAEKGKG  
 LILHYYSEREGLODIVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQORSEEC DHTQFLIEEKESKBEDFYEDLDRFE  
 ENGTQDSRISPYTFCKAFFFHIFDRDLVVTQCGNATYRVLPLQLQPKCSLLSVFSLVVRPHIDISFHGI  
 LSHINTVFVLSKEGLLDVEKLECEDELTAEISCLRLKGQMYLPEADSHFLCSPSVMNLDLDR  
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEOFREEYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

Figura 8V

**Rn. BI(1-385) I145Y**

(ID. DE SEQ. N°: 141)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCGCAOCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCTCAACCTCAATGC  
 TGGTGAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGGCTGTCCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGCCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACTACGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAATCAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC  
 CGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCCTTTTACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA  
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC  
 TGTCTTCTCTGCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTTCCACGGGATTCTTTACACATCAAT  
 ACCGTCTTTGACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAACTTGAATGTGAGGA  
 TGAAGTACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCCGTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA  
 AGCAGATAGCATCCTCTTCCCTGTTTACCAAGTGTGATGAACCTGGATGACCTACAAGAAG  
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCCCTTTGGGAGA  
 ACAGTTCCGGGAGGAGTACAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
 TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 142)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMPGKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATYPGMRAPSFRCTDAEKKG  
 LILHYYSERGLQDYVIGIKTYAQQIHGTEIDMKVIQRSEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF  
 EENGTQDSKRISPYTFCKAFPFHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHG  
 ILSHINTVFVLRSEGLLDVEKLECEDELTGAEISCLRLKGMYYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTR  
 RGLYLSDIPLHDATRDVLLGEQFREYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

**Figura 8W**

Rz B1(1-385) I145H

(ID. DE SEQ. N°: 143)

AIGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC  
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTGGGAAGATGTTTTTCGCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGGCTGTCCTGGGATCTAATGTCAAGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACCATGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATAACCCAATTTTTAATTGAAGAAAAGAATCAAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC  
 CGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCCTTTTACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA  
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC  
 TGICTTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTCACACATCAAT  
 ACCGTCTTTGACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAAACTTGAATGTGAGGA  
 TGAAGTACTGGGGCAGAGATFAGCTGCCTCCGTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA  
 AGCAGATAGCATCCTCTTCTCTGTTTACCAAGTGTGATGAACTTGGATGACCTAACAAGAAG  
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCTTTTTGGGAGA  
 ACAGTTCCGGGAGGAGTACAACTGACACAAGAGCTGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
 TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 144)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFVKMFFVFCQESGYDTILRVLGNSVREFLQNLDALHDHLATITPGMRAPSFRCCTDAEKGKG  
 LILHYYSEREGLQDHVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRSECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF  
 EENGITQDSRISPYTFCKAFFPHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHG  
 ILSHINTVFVLRKSKEGLLDVEKLECEDELGTAEISCLRILKGQMIYLPEADSILFLCSPVMNLDLDR  
 RGLYLSDIPLHDATRDELVLLGEQFREEYKLTQBLEILTDRLQLTLRALED

Figura 8X

**Rn. B1(1-385) C78Y**

(ID. DE SEQ. N°: 145)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCTTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCTCAACCTCAATGC  
 TGGTGAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTCTATCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGGGTGCTCTGGGATCTAATGTCAGGGAATTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACATTGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTTAATTGAAGAAAAGAATCAAAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC  
 CGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCCTTTTACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA  
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC  
 TGTCTTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTCACACATCAAT  
 ACCGTCCTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAACTTGAATGTGAGGA  
 TGAAGTACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCCGTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA  
 AGCAGATAGCATCCTCTTCTCTGTTACCAAGTGTGATGAACTTGGATGACCTAACAAGAAG  
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCTTTTGGGAGA  
 ACAGTTCGGGGAGGAGTACAAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
 TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 146)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEBQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILOMFGKMFVVFYQESGYDTLRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATTYPGMRAPSFRCIDAEBKKG  
 LILHYYSEREGLDIVIGIHKTVAAQIHGTEIDMKVIQORSECDHTQFLIEKESKEBDFYEDLDRFE  
 ENGTQDSRISPYTFCKAFPFHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHGI  
 LSHINTVFVLRSEGLLDVEKLECEDELTGABISCLRLKGOMIYLPADSIILFCSPSVMNLDDLTR  
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREBEYKLTQEILEITDRLQLLRALED

**Figura 8Y**

Rn. B1 (1-385) H105E

(ID. DE SEQ. N°: 147)

ATGTACGGITTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAGAGGGCGCAGCTGGATGAAGAAGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC  
 TGGTGAATCCTGCAGATGTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGGGTGTCCTGGGATCTAATGTGAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGTTCG  
 ACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCGGGTGCACCGATGCAGAAA  
 AAGGCAAAGGGCTCATCTGCACTACTCTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACATTTGTGATC  
 GGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAATCAAAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC  
 CGTACACCTTCTGCAAAGGTTTCCTTTTACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCCA  
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC  
 TGTCTTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCCTTTCACACATCAAT  
 ACCGTCTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAAACTGAATGTGAGGA  
 TGAAGTACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCCGTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA  
 AGCAGATAGCATCCTCTTCTCTGTTACCAAGTGTGATGAACTTGOATGACCTAACAAAGAAG  
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCCTTTGGGAGA  
 ACAGTTCGGGAGGAGTACAAACTGACACAAGAGCTGGAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
 TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 148)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMPFGKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAFDHLATTYPGMRAPSRCTDAEKKGKGL  
 ILHYYSERBGLQDIVIGIKTVAQQIHGTBDMKVIQQRSECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFEE  
 NGTQDSRISPYTFCCKAPFFHIFDRDLVVTQCGNAIYR.VLPQLQPGKCSLLSVFSLVVRPHIDISFHGIL  
 SHINTVFLRSKEGLLDVEKLECEDELTAEISCLRLKGMFYLPEADSILFLCSPSVMNLDLTLRR  
 GLYLSDIPLHDA TRDLVLLGEQFREYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

Figura 8Z

Rn. BI (1-385) H105G

(ID. DE SEQ. N°: 149)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCCAGCAAAGTCTCAACCTCAATGC  
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGGGTGTCCTGGGATCTAATGTGAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGGGG  
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACATTGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTAATTGAAGAAAAGAATCAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCAGGACTCCCGTATCAGCC  
 CGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCTTTTACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCAGGCA  
 GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTC  
 TGCTTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTACACATCAAT  
 ACCGTCTTTGTAAGCAAGGAAGGGTTGCTGGATGTTGAGAACTTGAATGTGAGGA  
 TGAAGTACTGGGGCAGAGATTAGCTGCTCCGCTCTCAAAGGCCAAATGATCTATTTACCGGA  
 AGEAGATAGCATCCTCTTCTCTGTTACCAAGTGTGATGAACTTGGATGACCTAACAAAGAAG  
 AGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGOTCCTTTTGGGAGA  
 ACAGTTCCGGGAGGAGTACAAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC  
 TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 150)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFVKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALGDHLATTYPGMRAPSFRCCTDAEKGGK  
 LILHYYSEREGLDIVIGIHKTVAAQIHGTEIDMKVIQRSEECDHQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFE  
 ENGTQDSRISPYTFCKAFFFHIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVVRPHDISFHGI  
 LSHINTVFLRSKEGLLDVEKLECEDEL TGAEISCLRKGMFYLP EADSILFLCSPSVMNLDLDR  
 RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREETKL TQELEILTDRLQLTLRALED

Rn. BI(1-194)

(ID. DE SEQ. N°: 151)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCCAGCAAAGTCTCAACCTCAATGC  
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGGGTGTCCTGGGATCTAATGTGAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGGCTTCAGGACATTGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTAATTGAAGAAAAGAATCAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 152)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEBQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFVKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATTYPGMRAPSFRCCTDAEKGGK  
 LILHYYSEREGLDIVIGIHKTVAAQIHGTEIDMKVIQRSEECDHQFLIEEKESKEEDFYED

Figura 8AA

**Rn. B1(1-194) I145Y**

(ID. DE SEQ. N°: 153)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC  
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGCCTGTCCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTCATCTGCACTACTACTCGGAAAAGAGAGGGGCTTCAGGACTACGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTTAATTGAAGAAAAGAATCAAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 154)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWBDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE  
 ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCDAEKGGK  
 LILHYYSEREGLDQYVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRSEEDHTQFLIEEKESKEEDFYED

**Rn. B1(1-194) L9W-I145Y**

(ID. DE SEQ. N°: 155)

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG  
 TGGGAAGACATCAAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAAT  
 CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGC  
 TGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCCTTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT  
 ACCATCTTGCCTGTCCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGCCCTGCAC  
 GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTCCGGTGCACCGATGCAGAA  
 AAAGGCAAAGGGCTCATCTGCACTACTACTCGGAAAAGAGAGGGGCTTCAGGACTACGTGAT  
 CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA  
 GCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTTAATTGAAGAAAAGAATCAAAAGAAG  
 AGGATTTTTATGAAGATTGA

(ID. DE SEQ. N°: 156)

MYGFVNHA WELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAG  
 EILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCDAEKGGK  
 GLJLHYYSEREGLDQYVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRSEEDHTQFLIEEKESKEEDFYED

**Figura 8BB**

*Rattus norvegicus* 62

(ID. DE SEQ. N°: 157)

ATGTATGGATTTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACA  
 TGGGAGAAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAGTGCAAGATGCTTCATGACCTACACCGTGTATGAT  
 GACATCATCACCATTAAGCTCATCCAAGAAGCCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGCC  
 ATTCTGAAGCTCTTTGGCGAATACTTCTTTAAGTTCTGTAAGATGTCTGGCTATGACAGGATGC  
 TGGGACACTTGGAGGAAATCTCACCAGTTTATTGAAAACCTAGATGCACTCCACAGTTACC  
 TGGCACTGTCTATCAGGAAATGAACGCACCATCCTTTCGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGGG  
 GCOATGCTTCTCCACTACTACTCAGACAGACATGGTCTGTGTCAACATTGTACCAGGTATCATTG  
 AAGCTGTGGCCAAGGACTTCTTTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCCTGGATATGAACGAAG  
 AGGTGGAAAGGACAGGGAAGAAAGAACATGTTGTGTTTCTGGTCTGCAGAAGGCTCACAGA  
 CAGATAAGAGGAGCAAAGGCAAGCCGGCCACAAGGCAGTGAGGACAGCCAGGCAGACCAGG  
 AGGCTCTCCAGGGAACACTCCTTCGGATGAAGGAGAGATATTTAAACATCCCTGTTTGCCTG  
 GGGAAATCTCACTCAACTGTGTGAGGGCATCGTCTCTTTTGGAAAAGGGCCCTCAGGG  
 ACACCTTCAGCCCTATCTCTGAGAGCATGGGTGCAAGAGGAGGTTCTGTGCTGCTT  
 TTCCTTCCACATTGTCTTTGATGAAGCACTAAGGGTCAAGCAAGCTGGAGTGAATATTCAGA  
 AGTATGTCCCTGGAATCTTAACCCAGAAGTTTGCCTAGATGAGTATTTTCCATCATCCACC  
 TCAAGTTACTTTCAACATCTCCAGCATCTGCAAGTTTCAACAGTCAAGTTTGTCTTGAAGACA  
 AGAAAAGAAATGATGCCCAAAGCAAGGAAGAGCCAGCCGATGCTCAAACCTCCGGGGTCAAG  
 TGATCTGGATGGAGTCTCTGAGGTGCATGATCTTTCATGTGTTCCCAAACGTCGCCAGCCTGC  
 AAGAGCTGGAAGAGAGCAAGATGCATCTTCTGATATCGCTCCGCACGACACGACCAGGGAT  
 CTCATCCTCCTCAACAGCAGAGGCTGGCAGAGATGOAGCTGTCTGCCAACTGGAAAAGAA  
 GAAGGAGGAGTTGCGTGTCTTTCCAATCACCTGGCCATCGAGAAGAAGAAGACAGAGACCT  
 TGCTGTATGCCATGCTGCCTGAACATGTGGCCAACCAACTCAAGGAGGGCAGAAAAGGTGCT  
 GCAGGAGAATTTGAAACATGTACAATCCTTTTCAGCGATGTTGTGACATTTACCAACATCTGT  
 GCAGCCTGTGAACCTATCCAAATCGTGAACATGCTGAATTCATGTACTCCAAGTTTGCAGG  
 TFAACCAAGTGTCCATGATGTCTACAAAGTAGAAACAATAGGGGATGCTTACATGGTGGTGGT  
 GGAGTACCAGTACCCGTTGAAAGCCATGCTCAAAGAGTCGCCAATTTGCTCTGGGGATGAGA  
 ATTTCTGCAAAAAGAGTGATGAATCCTGTCACTGGGGAACCTATCCAGATCAGAGTGGGAATC  
 CACTGGAACAGTCTTAGCAGGTGTTGTGGGAGACAAGATGCCTCGGTACTGCTTGTGGT  
 GACACTGTAACACAGCCTCTAGGATGGAAAGTCACGGGCTTCCAGCAAAGTGCATCTGAG  
 CCCCACAGCCACAGAGCCCTGAAAACAAAGGOTTGAAATTTGTCAGGAGAGGGGAGATGG  
 AAGTGAAGGGGAAAGGAAAGATGACCACATACTTCTGATCCAGAACCTGAAATGCCACCGAG  
 GATGAGATAATGGGGCGACCTCAGCCCCGCTGATGGGAAGGAAGTATGTACTCCCGGAAA  
 CCAAGTCAGGAAGTCCCTGCTGTCCCGAGGAACACAGACCATCAGCAAACAAGTCTACAAAG  
 GAGACCCAGCAGACGCTTCTAATGAAGTCACACTTGTGCTGGGAGCCAGTGGCAGGGGCGAAA  
 TCCAAGATGCAGTCAATAACCAGCCATCACCAGATGAGACCAAGACAAGTGTGCTGCTAG  
 TGGCCCTGTGCTGTCTGCTTCTGTGTTGTGCTGGA

(ID. DE SEQ. N°: 158)

MYGFINTGLQSLVTEKFGBEETWEKLRKAPAEVQDVFMTYTVYDDIITIKLIQEACKVLDVSMELK  
 LFGELYFFKFKMSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSYLALSQEMNAPSFRVEEGADGAMLLH  
 YYSDRHGLCHIVPGHBAVAKDFDITDVAMSILDMNEEVERTGKKEHVVFVQKAHRQIRGAKA  
 SRPQGSSEDSQADQEQALQGTLLRMKERYLNIPVCPGKESHSTAVRASVLFKGPLRDTFQPVYPERL  
 WVEBEVFCDAFFPHIVFDEALRVKQAGVNIQKYVPGILTQKPFALDEYFSIHPQVTFNISSICKFINSQ  
 PVLKTRKEMMPKARKSQPMLKLRGQMIWMESLRCMIFMCPNVRSLQELEESKMHLSDIAPHDT  
 TRDLILNQRLAEMELSCQLEKKKEBLRVLSNHLAIEKKKTETLLYAMLPEHVANQLKEGRKVA  
 AGEFETCTILFSDVVTFTNICAACEPIQIVNMLNSMYSKFDRLTSVHDVYKVEITGDAYMVGVP  
 VPVESHQRVANFALGMRISAKEVMNPVTGEPQIRVGIHTGPVLAGVVGDKMPRYCLFQDTVNT  
 ASRMPHGLPSKVHLSPTAHRALKNKGFIVRRGEIEVKGKGKMTTYFLIQNLNATEDEIMGRPSA  
 PADGKEVCTPGNQVRKSPAVPRNTDHHQQQVYKGDPAASNEVTLAGSPVAGRNSTDAVNNQPS  
 DETKTSVVASGPVLSAFVVL

Figura 8CC

Homo sapiens β2 (1-217)

(ID. DE SEQ. N°: 159)

ATGTATGGATTTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACA  
 TGGGAGAAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAGTGCAAGATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGAT  
 GACATCATCACCATTAAGCTCATCCAAGAAGCCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGCC  
 ATTCTGAAGCTCTTTGGCGAATACTTCTTTAAGTTCTGTAAGATGTCTGGCTATGACAGGATGC  
 TGGGACACTTGGAGGAAATCTCACCGAGTTTATTGAAAACCTAGATGCACTCCACAGTTACC  
 TGGCACTGTCTATCAGGAAATGAACGCACCATCCTTTTCGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGGG  
 GCGATGCTTCTCCACTACTACTCAGACAGACATGGTCTGTGTACATTGTACCAGGTATCATTG  
 AAGCTGTGGCCAAGGACTTCTTTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCCTGGATATGAACGAAG  
 AGGTGGAAGGACAGGGAAGAAAGAACATGTTGTGTTTCTGGTCGTGCAGAAGGCTCACAGA  
 CAGATAAGAGGAGCAAAGGCAAGCCGGCCACAAGGCAGTGAGGACAGCCAGGCAGACCAGG  
 AGGCTCTCCAGGGAACACTCCTT

(ID. DE SEQ. N°: 160)

MYGFINTCLQSLVTEKFGEBETWEKPKAPAEVQDVFMTYTVYDDIITIKLIQEACKVLDVSMBAIK  
 LFGBYFFKFKMSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSYLALSYQEMNAPSFRVEEGADGAMLLH  
 YYSDRHGLCHIVPGIIEAVAKDFFDIDVAMSILDMNEEVERTGKKEHVFLVVQKAHRQIRGAKA  
 SRPQGSSEDSQADQEALQGTL

Homo sapiens β2 (1-217) H42Y

(ID. DE SEQ. N°: 161)

ATGTATGGATTTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACA  
 TGGGAGAAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAGTGCAAGATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGAT  
 GACATCATCACCATTAAGCTCATCCAAGAAGCCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGCC  
 ATTCTGAAGCTCTTTGGCGAATACTTCTTTAAGTTCTGTAAGATGTCTGGCTATGACAGGATGC  
 TGGGACACTTGGAGGAAATCTCACCGAGTTTATTGAAAACCTAGATGCACTCCACAGTTACC  
 TGGCACTGTCTATCAGGAAATGAACGCACCATCCTTTTCGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGGG  
 GCGATGCTTCTCCACTACTACTCAGACAGACATGGTCTGTGTCACTATGTACCAGGTATCATTG  
 AAGCTGTGGCCAAGGACTTCTTTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCCTGGATATGAACGAAG  
 AGGTGGAAGGACAGGGAAGAAAGAACATGTTGTGTTTCTGGTCGTGCAGAAGGCTCACAGA  
 CAGATAAGAGGAGCAAAGGCAAGCCGGCCACAAGGCAGTGAGGACAGCCAGGCAGACCAGG  
 AGGCTCTCCAGGGAACACTCCTT

(ID. DE SEQ. N°: 162)

MYGFINTCLQSLVTEKFGEBETWEKPKAPAEVQDVFMTYTVYDDIITIKLIQEACKVLDVSMBAIK  
 LFGBYFFKFKMSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSYLALSYQEMNAPSFRVEEGADGAMLLH  
 YYSDRHGLCHYVPGIIEAVAKDFFDIDVAMSILDMNEEVERTGKKEHVFLVVQKAHRQIRGAK  
 ASRPOGSSEDSQADQEALQGTL

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.