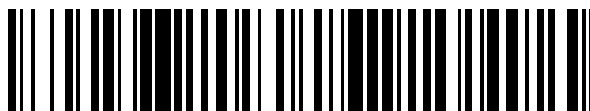


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 088**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2007 E 07810316 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2046368**

54 Título: **Composiciones y tratamiento contra la cocaína**

30 Prioridad:

10.07.2006 US 819569 P

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

14.06.2016

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (33.3%)
535 West 116th Street 412 Low Memorial Library
New York, NY 10027, US;
UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION (33.3%) y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LANDRY, DONALD;
ZHAN, CHANG-GUO;
WOODS, JAMES, H.;
SUNAHARA, ROGER;
NARASIMHAN, DIWAHAR, L.;
MACDONALD, JOANNE;
YANG, VICTOR;
KO, MEI-CHUAN, HOLDEN;
DENG, SHI-XIAN;
TESMER, JOHN, J.;
LEE, TIEN-YI;
KWON, YOUNG, MIN y
GAO, DAQUAN**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 574 088 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y tratamiento contra la cocaína

5 DECLARACIÓN REFERENTE A LA INVESTIGACIÓN O DESARROLLO PATROCINADO FEDERALMENTE

Esta invención se realizó en parte con el apoyo del Gobierno de Estados Unidos bajo la subvención n.º NIDA DA021416. El Gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

10 CAMPO DE LA INVENCION

La invención descrita en este documento se refiere en general a agentes terapéuticos contra la cocaína.

ANTECEDENTES

15

El abuso de cocaína es un problema social y médico intratable que es resistente a la remediación por farmacoterapia. La cocaína actúa bloqueando la recaptación de las monoaminas dopamina, norepinefrina y serotonina, prolongando y magnificando de este modo los efectos de estos neurotransmisores en el sistema nervioso central (Benowitz NL (1993) *Pharmacol Toxicology* 72, 3-12). La toxicidad de la cocaína está marcada tanto por convulsiones como por disfunción cardíaca (por ejemplo, infarto de miocardio, arritmias cardíacas, aumento de la presión arterial, infarto cerebral o aneurisma disecante, y el aumento de la demanda de oxígeno del miocardio), debido a los efectos sobre los sistemas de neurotransmisores y el bloqueo del canal de sodio del miocardio (Bauman JL y DiDomenico RJ (2002) *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 7, 195-202; Wilson LD y Shelat C (2003) *J Toxicol Clin Toxicol* 41, 777-788; Knuepfer MM (2003) *Pharmacol Ther* 97, 181-222). Debido a la capacidad de la cocaína para cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica y sus efectos generalizados sobre los sistemas nerviosos central y periférico, la sobredosis puede provocar muerte súbita (véase Bauman JL y DiDomenico RJ (2002) *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 7, 195-202, para una revisión).

20

25

Aunque el mecanismo de acción de la cocaína se conoce bien, esta información aún no se ha traducido en el desarrollo de un antagonista efectivo de la cocaína que se pueda utilizar en situaciones de abuso y sobredosis. Los efectos rápidos y pleiotrópicos de la cocaína presentan un problema complejo para el tratamiento de la toxicidad aguda por cocaína (Carroll FI, Howell LL y Kuhar MJ (1999) *J Med Chem* 42, 2721-2736). Los dos tipos de terapias que están disponibles para el tratamiento del abuso de opiáceos, el antagonismo (por ejemplo, naltrexona) y la sustitución (por ejemplo, metadona), no tienen análogos en el caso de la cocaína, aunque se están considerado intentos de este última (por ejemplo, J. Grabowski et al. (2004) *Addictive Behaviors* 29, 1439-1464). Una estrategia consiste en impedir que la cocaína alcance o reducir la cocaína que alcanza los sitios de acción mediante la administración de esterasas endógenas, anticuerpos específicos de la cocaína, o un anticuerpo catalítico.

30

35

La cocaína de origen natural se hidroliza en el éster de benzoílo por la butirilcolinesterasa sérica (BChE) al éster metílico de ecgonina y ácido benzoico no tóxicos. En el hígado, la carboxilesterasa HCE-2 hidroliza el éster metílico para producir benzoilecgonina y metanol (véase, por ejemplo, Figura 1). La semi-vida de eliminación de la cocaína en la sangre oscila de 0,5 a 1,5 h (T. Inaba (1989) *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 67, 1154-1157). Ha habido algunos intentos de utilizar BChE de origen natural o BChE manipulada genéticamente para aumentar la descomposición de la cocaína (véase, por ejemplo, Carmona et al. (2000) *Drug Metabolism & Disposition* 28, 367-371; Xie et al. (1999) *Molecular Pharmacology* 55, 83-91; Sun et al. (2002a) *Molecular Pharmacology*; Sun et al. (2002b) *Pharmacology & Experimental Therapeutics* 302, 710-716; Duysen et al. (2002) *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics* 302, 751-758; Gao Y y Brimijoin S (2004) *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 310, 1046-1052; Gao et al. (2005) *Molecular Pharmacology* 67, 204-211). Otros investigadores han utilizado un anticuerpo monoclonal, Mab 15A10, como anticuerpo catalítico para la cocaína (véase, por ejemplo, Landry et al., 1993; Mets et al., 1998; Baird et al., 2000; Larsen et al., 2004), mientras otros están explorando el uso de vacunas de cocaína (véase, por ejemplo, Kosten et al. (2002) *Vaccine* 20, 1196-1204).

40

45

50

Tabla 1: Cinética de varias enzimas que hidrolizan la cocaína contra (-) cocaína.

Enzima	Kcat (min ⁻¹)	Km (μM)	Eficiencia (kcat/Km)	Referencia
BChE	4,1	4,5	$9,1 \times 10^6$	Sun et al., 2002a
Ala328W/Y332A	154	18	$8,5 \times 10^6$	Sun et al., 2002a
Mab15A10	2,2	220	1×10^4	Larsen et al., 2004
AME 359	620	20	$3,1 \times 10^7$	Gao et al., 2005
CocE	468	0,64	$7,2 \times 10^8$	Turner et al., 2002

5 Una bacteria, *Rhodococcus* sp. MB 1, autóctona de la tierra que rodea a la planta de coca, ha desarrollado la capacidad de utilizar la cocaína como su única fuente de carbono y nitrógeno. La bacteria expresa una cocaína esterasa (CocE) que actúa de manera similar a la BChE para hidrolizar el éster de benzoilo de cocaína, produciendo el éster metílico de ecgonina y ácido benzoico (véase, por ejemplo, Figura 1) (Bresler et al. (2000); Appl Environ Microbiol 66, 904-908; Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307; Larsen et al. (2002) Nature Struct Biol 9, 10 17-21). El gen de la CocE ha sido aislado y clonado (Bresler et al. (2000) Appl Environ Microbiol 66, 904-908), y se ha determinado la estructura cristalina de la CocE (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307; Larsen et al. (2002) Nature Struct Biol 9, 17-21). La estructura de la CocE (véase, por ejemplo, Figura 2) revela un plegamiento clásico de serina esterasa además de otros dos dominios que se combinan para formar un bolsillo de unión de la cocaína. La alteración de cualquiera de los tres aminoácidos (Asp, His, o Ser) dentro de la tríada catalítica en el sitio 15 activo (para una revisión, véase Dodson G y Wlodawer A (1998) Trends Biochem Sci 23, 347-352) inactiva la actividad de la esterasa contra la cocaína. Además, la mutación de los restos que hacen contacto con el resto benzoato de cocaína (por ejemplo, Tyr44) también interrumpe la hidrólisis de la cocaína, presumiblemente alterando la estabilización del oxianión en el estado de transición (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307; Larsen et al. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21). La enzima purificada (PM ~65 kDa) cataliza la cocaína de manera 20 muy eficiente con cinética de Michaelis-Menten $k_{cat} = 7,2 \text{ s}^{-1}$ y $K_m = 640 \text{ nM}$ (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307; Larsen et al. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21), casi tres órdenes de magnitud mayor que las esterases endógenas y, muy probablemente, actuaría con la suficiente rapidez para desintoxicar seres humanos que hayan tomado una sobredosis de cocaína (Landry et al. (1993) Science 259, 1899-1901; Mets et al. (1998) National Academy of Sciences of the United States of America 95, 10176-10181). Además, la esterasa también metaboliza el 25 cocaetileno, un potente metabolito de la cocaína y alcohol, casi tan eficientemente como metaboliza la cocaína ($k_{cat} = 9,4 \text{ s}^{-1}$ y $K_m = 1600 \text{ nM}$) (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307; Larsen et al. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21).

Por lo tanto, sería deseable proporcionar una CocE estable para agentes terapéuticos contra la cocaína.

30

SUMARIO DE LA INVENCION

En consecuencia, los presentes inventores han tenido éxito en el descubrimiento de mutantes de la cocaína esterasa muy eficientes, termoestables, y de larga duración que pueden proteger contra los efectos tóxicos y de refuerzo de la 35 cocaína en sujetos.

Un aspecto de la invención proporciona polipéptidos de la cocaína esterasa (CocE) mutantes aislados de la secuencia de aminoácidos CocE de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1), pero con al menos un resto aminoácido sustituido. Los polipéptidos de la CocE mutante de la invención comprenden una secuencia de 40 aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico, la secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, en la que la SEQ ID NO: 2 es un polinucleótido que codifica un polipéptido de la CocE de tipo silvestre; en el que la secuencia de aminoácidos comprende al menos una sustitución, adición o supresión de un resto aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en T172R, F189A/T172R, T172R/A193D, G173Q, T172R/G173Q, T172R/G173Q-I175-G-G- 45 A186, T172R/G173Q-T176-G-G-D185, L169K y F189K; y el polipéptido de la CocE mutante tiene actividad cocaína esterasa con el aumento de la estabilidad térmica a 37 °C en comparación con la CocE de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Diversas realizaciones incluyen polipéptidos de la CocE mutante con al menos dos, tres, cuatro, cinco, o más 50 sustituciones de la secuencia de aminoácidos de CocE de tipo silvestre. Los ejemplos de polipéptidos de la CocE mutante dentro del alcance de la invención incluyen los que tienen una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 (T172R); SEQ ID NO: 32 (G173Q); SEQ ID NO: 39 (T172R-G173Q); SEQ ID NO: 40 (L169K) y SEQ ID NO: 44 (F189K), o uno de sus fragmentos funcionales. Otros polipéptidos de la CocE mutante descritos en la presente invención incluyen los que tienen una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 (L163V); SEQ ID NO: 7 55 (V2251); SEQ ID NO: 8 (I218L); SEQ ID NO: 9 (A310D); SEQ ID NO: 10 (A149S); SEQ ID NO: 11 (S159A); SEQ ID NO: 12 (S265A); SEQ ID NO: 13 (S56G); SEQ ID NO: 14 (W220A); SEQ ID NO: 16 (S140A); SEQ ID NO: 17 (F189L); SEQ ID NO: 18 (A193D); SEQ ID NO: 19 (T254R); SEQ ID NO: 20 (N42V); SEQ ID NO: 21 (V262L); SEQ

ID NO: 22 (L508G); SEQ ID NO: 23 (Y152H); SEQ ID NO: 24 (V160A); SEQ ID NO: 25 (T172R); SEQ ID NO: 26 (Y532F); SEQ ID NO: 27 (T74S); SEQ ID NO: 28 (W285T); SEQ ID NO: 29 (L146P); SEQ ID NO: 30 (D533S); SEQ ID NO: 31 (A194R); SEQ ID NO: 32 (G173Q); SEQ ID NO: 33 (C477T); SEQ ID NO: 34 (K531A); SEQ ID NO: 35 (R41I); SEQ ID NO: 36 (L119A); SEQ ID NO: 37 (K46A); SEQ ID NO: 38 (F84Y), T172R-G173Q (SEQ ID NO: 39);
 5 L169K (SEQ ID NO: 40); F189A (SEQ ID NO: 41), N197K (SEQ ID NO: 42), R182K (SEQ ID NO: 43), F189K (SEQ ID NO: 44), V190K (SEQ ID NO: 45), Q191K (SEQ ID NO: 46), y A194K (SEQ ID NO: 47), o uno de sus fragmentos funcionales. Polipéptidos de la CocE mutantes ejemplares adicionales incluyen F189A/T172R, T172R/A193D, T172R/G173Q-1175-G-G-A186, T172R/G173Q-T176-G-G-D185, y similares. Teniendo en cuenta las convenciones de nomenclatura y las secuencias de polipéptidos desveladas en el presente documento, un experto en la materia
 10 puede determinar las secuencias de polipéptidos para los polipéptidos de la CocE mutante anteriormente mencionados.

Otro aspecto de la invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen entre sus componentes un polipéptido de la CocE mutante dentro del alcance de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente
 15 aceptable.

Otro aspecto de la invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican el polipéptido de la CocE mutante de acuerdo con la invención. En diversas realizaciones, los ácidos nucleicos incluyen aquellos con secuencias que se hibridan con el ácido nucleico que codifica CocE de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 2), o su secuencia
 20 complementaria, en condiciones de alta rigurosidad. Dicho ácido nucleico aislado codifica un polipéptido de la CocE mutante que tiene una actividad cocaína esterasa con una mayor estabilidad térmica a 37 °C en comparación con la CocE de tipo silvestre. Diversas realizaciones de la secuencia de ácido nucleico aislada tienen al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la CocE de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 2). Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislado que tiene al menos
 25 aproximadamente el 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99 % de identidad de secuencia de la CocE de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 2).

En diversas realizaciones, los polipéptidos de la CocE mutante (o polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos dentro del alcance de la invención) tienen unas temperaturas de fusión superiores en comparación con la CocE de tipo silvestre. En diversas realizaciones, los polipéptidos de la CocE mutante (o polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos dentro del alcance de la invención) aumentan la estabilidad térmica del polipéptido de la CocE mutante sobre la CocE de tipo silvestre en al menos aproximadamente 2,0 kcal/mol. Por ejemplo, el aumento de la estabilidad térmica puede ser de al menos aproximadamente 2,1 kcal/mol, al menos aproximadamente 2,2 kcal/mol, al menos aproximadamente 2,3 kcal/mol, al menos aproximadamente 2,4 kcal/mol, al menos aproximadamente 2,5
 30 kcal/mol, al menos aproximadamente 2,6 kcal/mol, al menos aproximadamente 2,7 kcal/mol, al menos aproximadamente 2,8 kcal/mol, al menos aproximadamente 2,9 kcal/mol, al menos aproximadamente 3,0 kcal/mol, al menos aproximadamente 3,1 kcal/mol, al menos aproximadamente 3,2 kcal/mol, al menos aproximadamente 3,3 kcal/mol, al menos aproximadamente 3,4 kcal/mol, al menos aproximadamente 3,5 kcal/mol, al menos aproximadamente 3,6 kcal/mol, al menos aproximadamente 3,7 kcal/mol, al menos aproximadamente 3,8 kcal/mol, al menos aproximadamente 3,9 kcal/mol, al menos aproximadamente 4,0 kcal/mol, al menos aproximadamente 4,1 kcal/mol, al menos aproximadamente 4,2 kcal/mol, al menos aproximadamente 4,3 kcal/mol, al menos aproximadamente 4,4 kcal/mol, o al menos aproximadamente 4,5 kcal/mol.

En diversas realizaciones, los polipéptidos de la CocE mutante (o polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos dentro del alcance de la invención) tienen una menor inmunogenicidad en comparación con la CocE de tipo silvestre.
 45

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la CocE mutante termoestables tienen menos actividad esterasa que la CocE de tipo silvestre. Por ejemplo, los mutantes de la CocE termoestables pueden tener aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 99 % de la actividad esterasa de la CocE de tipo silvestre. En otras realizaciones, los polipéptidos de la CocE mutante tienen aproximadamente la misma o una mayor eficacia catalítica que los polipéptidos de la CocE de tipo silvestre. Por ejemplo, los mutantes de la CocE termoestables pueden tener
 50 aproximadamente el 100 %, aproximadamente el 110 %, aproximadamente el 120 %, aproximadamente el 130 %, aproximadamente el 140 %, aproximadamente el 150 %, o superior de la actividad esterasa de la CocE de tipo silvestre.
 55

En diversas realizaciones, los polipéptidos de la CocE mutante se encuentran pegilados. En diversas realizaciones, el polipéptido de la CocE mutante está encapsulado en un glóbulo rojo. Por ejemplo, uno o más polipéptidos de la CocE mutante pegilada (o una composición farmacéutica que incluye uno o más polipéptidos de la CocE mutante pegilada) pueden estar encapsulados en un glóbulo rojo.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la CocE mutante se estabilizan con un sustrato, producto y/o inhibidor.

Otro aspecto de la invención proporciona métodos de tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína. En dichos métodos, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polipéptidos de la CocE mutante (o una composición farmacéutica que incluye uno o más polipéptidos de la CocE mutante) dentro del alcance de la invención a un sujeto que lo necesite. En diversas realizaciones, la enfermedad inducida por la cocaína incluye sobredosis de cocaína, intoxicación por cocaína, adicción a la cocaína, dependencia de la cocaína, y/o alguna de sus combinaciones.

En el presente documento también se describe un método de selección de alto rendimiento para la identificación de polipéptidos de la CocE mutante termoestables. En dicho método de detección, una célula se transforma de manera estable con un ácido nucleico que codifica un polipéptido candidato CocE mutante. El polipéptido de la CocE mutante se expresa en la célula. El polipéptido de la CocE mutante expresado se aísla o se presenta. La actividad esterasa del polipéptido de la CocE mutante aislado se mide a una o más temperaturas para determinar la estabilidad térmica de los polipéptidos de la CocE mutante aislados. Dicha(s) temperatura(s) puede(n) ser de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C. Se selecciona el polipéptido de la CocE mutante con actividad esterasa a la(s) temperatura(s) predeterminada(s).

En algunas realizaciones del método de selección, la medición de la actividad esterasa de los polipéptidos mutantes aislados se puede conseguir poniendo en contacto el polipéptido de la CocE mutante aislado con (i) cocaína y un indicador de pH o (ii) un tío-derivado de cocaína y un indicador de tior. A continuación, se detecta cualquier cambio en el indicador de pH o el indicador de tior. Dicho cambio se correlaciona con la formación de ácido benzoico procedente de la hidrólisis de la cocaína o un derivado de la cocaína por el polipéptido de la CocE mutante.

Algunas realizaciones del método de selección además incluyen la realización de varios ciclos del procedimiento de selección a temperaturas crecientes para medir la actividad esterasa. Por ejemplo, el primer ciclo puede emplear una temperatura para medir la actividad esterasa de aproximadamente 30 °C mientras que un ciclo posterior puede emplear una temperatura para medir la actividad esterasa de aproximadamente 45 °C.

En algunas realizaciones del método de selección, la expresión del polipéptido de la CocE mutante se produce a una temperatura a la que la CocE de tipo silvestre conserva sustancialmente la actividad catalítica. En otras formas de realización del método de selección, la expresión del polipéptido de la CocE mutante se produce a una temperatura a la que el polipéptido de la CocE de tipo silvestre se reparte sustancialmente en cuerpos de inclusión. Por ejemplo, la temperatura de expresión puede ser de al menos aproximadamente 35 °C, al menos aproximadamente 36 °C, al menos aproximadamente 37 °C, al menos aproximadamente 38 °C, al menos aproximadamente 39 °C, o al menos aproximadamente 40 °C.

Otros objetos y características serán en parte evidentes y en parte indicados más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los expertos en la materia entenderán que los dibujos, descritos a continuación, son solo para fines ilustrativos. Los dibujos no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de las presentes enseñanzas.

La Figura 1 es un diagrama que ilustra el metabolismo de la cocaína mediante diversas reacciones enzimáticas.

La Figura 2 es un diagrama de cintas que ilustra la estructura de la CocE. Se indican el dominio 1 (DOM1), el dominio 2 (DOM2), y el dominio 3 (DOM 3), junto con el sitio activo localizado en la intersección de los tres dominios. Se muestra una molécula de ácido benzoico en el sitio activo.

La Figura 3 es un diagrama de puntos que representa el perfil de elución para la CocE por FPLC (Q-Sepharose), donde se muestra la absorbancia UV y la concentración de cloruro de sodio con el tiempo. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 1.

La Figura 4 es un diagrama de puntos y de dispersión que muestra la degradación *in vitro* de la cocaína en presencia de la CocE en plasma humano. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 2.

La Figura 5 es una gráfica de la cinética enzimática de Michaelis-Menten de la CocE de tipo silvestre, la CocE mutante T172R (SEQ ID NO: 26), y la CocE mutante S159A (SEQ ID NO: 11) para reacciones llevadas a cabo a 30 °C y 37 °C. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 4.

La Figura 6 es una serie de fotografías de la tinción de proteína total después de la separación PAGE de la CocE de tipo silvestre y T172R mutante utilizando condiciones desnaturalizantes (SDS + β Me) o no desnaturalizantes (nativas) después de la incubación a 37 °C a diversos intervalos de tiempo. Para más información véase Ejemplo 4.

La Figura 7 es un diagrama de puntos que representa las temperaturas de fusión determinadas por difracción circular de la CocE de tipo silvestre y T172R. El espectro completo se muestra en A, el espectro UV cercano se muestra en B, y la temperatura de fusión estimada para cada mutante se muestra en C. Para más información véase Ejemplo 4.

5

La Figura 8 contiene (A) un dibujo de la hidrólisis del derivado de benzoiltioéster de cocaína (tio-1) y de la des-carbometoxi cocaína (tio-2) seguido por la reacción de los tioles liberados (R-SH) con el reactivo de Ellman; y (B) un diagrama de puntos que muestra la reacción colorimétrica de las células BL21 de control y células BL21 que contienen CocE incubadas con el derivado de benzoiltioéster (tio-1) y el reactivo de Ellman. Para obtener más

10 información, véase Ejemplo 15.

La Figura 9 es un diagrama de puntos y de dispersión que muestra el efecto de 1,0 mg de CocE (círculos cerrados) o PBS (vehículo, círculos abiertos) sobre la letalidad inducida por la cocaína cuando se administra un minuto después de aumentar la dosis de cocaína (n = 6-7). Los datos presentados se expresan como porcentaje y su

15 desviación típica. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 5.

La Figura 10 es un gráfico de barras que muestra el efecto de dosis crecientes de CocE (CE) o BChE humana (BChE), o PBS, sobre la letalidad inducida por la cocaína cuando se administra un minuto antes de 180 mg/kg de cocaína (n = 6-7). Los datos presentados se expresan como porcentaje y la media de su desviación típica. Para más

20 información de la metodología, véase Ejemplo 5.

La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra el efecto de las CocE mutantes S117A y Y44F, o CocE tratada con PMSF sobre las convulsiones y la letalidad inducidas por la cocaína cuando se administra 1 minuto antes de 180 mg/kg de cocaína (n = 5-6). Para más información de la metodología, véase Ejemplo 5.

25

La Figura 12 es un gráfico de barras que muestra el efecto de 1,0 mg de CocE o PBS administrado un minuto después de 560 mg/kg de WIN-35065-2, la DL100 determinada del compuesto (n = 6-8). Para más información de la metodología, véase Ejemplo 5.

30 La Figura 13 es un diagrama de puntos y de dispersión que muestra la inactivación dependiente del tiempo de la CocE (125 ng/ml) *in vitro*. El decaimiento exponencial $t_{1/2}$ se calculó en 13,2. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 6.

La Figura 14 es un gráfico de barras que muestra los efectos protectores dependientes del tiempo de 1 mg de CocE cuando se administra en diversos momentos antes y después de 100 mg/kg de cocaína (n = 6-8). Para más información de la metodología, véase Ejemplo 6.

35

La Figura 15 es un gráfico de barras que muestra las concentraciones de cocaína en plasma humano tratado con cocaína esterasa o vehículo de esterasa 0,8 μ M a tiempo cero y un minuto después de la administración de la esterasa. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 6.

40

La Figura 16 es una serie de diagramas de puntos y de dispersión que muestran el efecto de 0,32 mg de CocE (círculos cerrados), 0,32 mg de CocE mutante T172R (triángulos cerrados) o PBS (vehículo, círculos abiertos) sobre la letalidad inducida por la cocaína cuando se administra un minuto después de aumentar las dosis de cocaína (panel izquierdo) y minutos hasta la muerte después de la administración de cocaína (panel derecho). Para más información de la metodología, véase Ejemplo 7.

45

La Figura 17 es un diagrama de puntos y de dispersión que muestra el efecto de 0,32 mg/kg de CocE (círculos cerrados) o CocE mutante T172R (triángulos cerrados) sobre la letalidad inducida por la cocaína cuando se administra a 1, 10, 30, y 60 minutos antes de la administración de 320 mg/kg de cocaína (n = 6). Para más información de la metodología, véase Ejemplo 7.

50

La Figura 18 es una serie de diagramas de puntos y de dispersión que muestran el efecto de 1 mg de hBChE (triángulo cerrado), 0,32 mg de CocE (círculo cerrado), o 1 mg de CocE (cuadrado cerrado) sobre la letalidad inducida por la cocaína. La Figura 18A muestra la letalidad en función de la concentración de cocaína. La Figura 18B muestra minutos hasta la muerte después de la administración de cocaína en función de la concentración de cocaína. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 8.

55

La Figura 19 es una traza del espectro de masas MALDI-TOF de la CocE pegilada. La diferencia de masas entre los picos corresponde a -5500 Da; equivalente al peso molecular de una sola cadena de PEG. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 11.

60

La Figura 20 es una imagen SEM de glóbulos rojos fijados a glutaraldehído. La Figura 20A son glóbulos rojos normales sin tratamiento. La Figura 20B son glóbulos rojos sometidos a rotura osmótica-resellado cargados con L-

ASNasa. La Figura 20C son glóbulos rojos cargados con PBPM-ASNasa. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 12.

La Figura 21 es un diagrama de dispersión que muestra el porcentaje de actividad asparaginasa en sangre en función del tiempo (días) para glóbulos rojos/LMP-ASNasa o glóbulos rojos fantasma/ASNasa. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 12.

La Figura 22 es un diagrama de puntos que muestra la supervivencia de ratones DBA/2 que portan células de linfoma L5178Y. Se les administró enzima o solución salina el día 5, momento en el que los síntomas estaban presentes. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 12.

La Figura 23 son diagramas de puntos y de dispersión que demuestran los efectos protectores de la CocE y sus mutantes contra la toxicidad inducida por la cocaína. La Figura representa el porcentaje de ratones que presenta letalidad inducida por la cocaína en función de la concentración de cocaína inyectada en CocE de tipo silvestre (0,3 mg), T172R (0,3 mg), T172R-G173Q (0,3 mg), o L169K (1 mg) administrada en ratones. Se administró CocE o mutantes (mg) por vía intravenosa 1 minuto antes de la administración de cocaína (mg/kg, ip). Los diferentes símbolos representan las curvas de dosis-respuesta de la letalidad inducida por la cocaína en ausencia o presencia de CocE o mutantes. Cada punto de datos representa el porcentaje de ratones (n = 8 para cada condición de dosificación) que presenta letalidad inducida por la cocaína.

La Figura 24 es una serie de diagramas de puntos y de dispersión que demuestran los efectos protectores de la CocE contra la toxicidad de la cocaína con el curso del tiempo. Se administró CocE o mutantes (0,1, 0,3, y 1 mg, iv) a diferentes puntos de tiempo antes de la administración ip de cocaína 180 mg/kg. La Figura 24A representa el porcentaje de ratones que presenta letalidad inducida por la cocaína en función del tiempo de administración de la CocE de tipo silvestre (0,1 mg), T172R (0,1 mg), L169K (0,1 mg), o T172R-G173Q (0,1 mg) antes de la administración ip de cocaína 180 mg/kg. La Figura 24B representa el porcentaje de ratones que presenta letalidad inducida por la cocaína en función del tiempo de administración de la CocE de tipo silvestre (0,3 mg), T172R (0,3 mg), L169K (0,3 mg), o T172R-G173Q (0,1 mg) antes de la administración ip de cocaína 180 mg/kg. La Figura 24C representa el porcentaje de ratones que presenta letalidad inducida por la cocaína en función del tiempo de administración de la CocE de tipo silvestre (1 mg), T172R (1 mg), L169K (1 mg), o T172R-G173Q (1 mg) antes de la administración ip de cocaína 180 mg/kg. Cada punto de datos representa el porcentaje de ratones (n = 8 para cada condición de dosificación) que presenta letalidad inducida por la cocaína.

La Figura 25 es un diagrama de puntos y de dispersión que muestra la duración estimada de la protección para una letalidad del 50 %: La Figura representa la duración estimada (horas) de la protección (50 % de letalidad) de mutantes de la CocE en ratones en función de la dosificación (mg, iv) de T172R-G173Q, L169K, T172R, y la CocE de tipo silvestre. El tiempo requerido para alcanzar el 50 % de letalidad se determinó a partir de la Figura 24.

La Figura 26 es una serie de diagramas de puntos y de dispersión que muestran los efectos protectores de la CocE, T172R-G173Q, y sus formas pegiladas contra la toxicidad inducida por la cocaína. Cada enzima (0,3 mg) se administró por vía intravenosa 1 min antes de la administración de cocaína (mg/kg, ip). Los diferentes símbolos representan las curvas de dosis-respuesta de la letalidad inducida por la cocaína en ausencia o presencia de la enzima. Cada punto de datos representa el porcentaje de ratones (n = 8 para cada condición de dosificación) que presenta letalidad inducida por la cocaína. La Figura 26A representa el porcentaje de aparición de letalidad en función de la dosis de cocaína (mg/kg, ip) de vehículo/PBS, de la CocE de tipo silvestre (0,3 mg), y de PEG-CocE de tipo silvestre (0,3 mg). La Figura 26B representa el porcentaje de aparición de letalidad en función de la dosis de cocaína (mg/kg, ip) de vehículo/PBS, T172R-G173Q (0,3 mg), y PEG-T172R-G173Q (0,3 mg).

La Figura 27 es una serie de diagramas de puntos y de dispersión que muestran la estabilidad térmica de la cocaína esterasa y de mutantes: (A) CocE de tipo silvestre, (B) T172R, (C) T272R/G173Q y L169K. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 17.

La Figura 28 es una serie de cromatogramas que muestran enzimas preincubadas a 37 °C durante 0 minutos o 60 minutos y resueltos mediante cromatografía de exclusión por tamaños de (A) CocE de tipo silvestre, (B) T172R, (C) T172R/G173Q. En A se incluyen los patrones de pesos moleculares, BSA (66 kDa) y AD (150 kDa). Para más información de la metodología, véase Ejemplo 18.

La Figura 29 es una serie de espectros de DC suavizados de la CocE de tipo silvestre y cuatro mutantes que muestran fusión dependiente de la temperatura observada entre 200 y 250 nm. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 19.

La Figura 30 es una serie de espectros de la CocE de tipo silvestre y cuatro mutantes sometidos a desconvolución a 3 curvas mediante el algoritmo CCA lo que sugiere que la fusión de la CocE es al menos un proceso de dos etapas pasando de la curva original (curva 1) a una etapa de desplegamiento intermedia (curva 2) y a una proteína

totalmente desnaturalizada (curva 3). Para más información de la metodología, véase Ejemplo 19.

La Figura 31 es una serie de diagramas de puntos y de dispersión que muestran el porcentaje de contribución de cada temperatura en la descripción de las 3 curvas CCA sometidas a desconvolución mostradas en la Figura 30.

5 Para más información de la metodología, véase Ejemplo 19.

La Figura 32 es un diagrama de puntos y de dispersión que muestra las temperaturas de fusión y de formación a la que (1) se funde el espectro inicial, (2) la formación y fusión del estado intermedio, y (3) la acumulación de la proteína totalmente fundida. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 19.

10

La Figura 33 es una imagen de un gel que muestra que la cocaína (intervalo de mM) impidió la formación inducida a 37 °C de agregados de la CocE de alto peso molecular (concentraciones de enzima 0,1 mg/ml). Para más información de la metodología, véase Ejemplo 20.

15 La Figura 34 es un diagrama de puntos y de dispersión que muestra que la cocaína (cantidades μ M) se estabilizó a una pérdida de actividad inducida a 37 °C. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 20.

La Figura 35 es una imagen de un gel que muestra que el ácido benzoico (intervalo de mM) impidió la formación inducida a 37 °C de agregados de la CocE de alto peso molecular (concentraciones de enzima 0,1 mg/ml). Para más

20 información de la metodología, véase Ejemplo 20.

La Figura 36 es un diagrama de puntos y de dispersión que muestra que la cocaína (cantidades μ M) se estabilizó a una pérdida de actividad inducida a 37 °C. Para más información de la metodología, véase Ejemplo 20.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Realizaciones de la invención desveladas en las que se proporcionan composiciones y métodos para una estrategia de degradación catalítica para agentes terapéuticos contra la cocaína. La tecnología descrita en este documento se basa en parte en el descubrimiento de mutantes de cocaína esterasa muy eficientes, termoestables, y de larga

30 duración que pueden proteger contra los efectos tóxicos y de refuerzo de la cocaína en sujetos. Dichos mutantes proporcionan opciones de tratamiento para enfermedades inducidas por la cocaína como la sobredosis de cocaína y la adicción a la cocaína.

POLIPÉPTIDOS DE LA CocE MUTANTE

35

A pesar de la potencia de la CocE de tipo silvestre (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, n.º de Acceso AF173165) en la metabolización de la cocaína (véase, por ejemplo, Ejemplo 2; Ejemplo 4; Ejemplo 5), la aplicación de la CocE de tipo silvestre como agente terapéutico en el tratamiento de sobredosis de cocaína puede ser limitada debido a su

40 baja estabilidad térmica a la temperatura fisiológica (véase, por ejemplo, Ejemplo 4; Ejemplo 6). La inestabilidad térmica contribuye a la corta semi-vida en plasma de la CocE de tipo silvestre. Se observó descomposición significativa (> 50 %) de la actividad CocE después de la incubación de la enzima en plasma a 37 °C, o después de su administración intravenosa en ratón. El $t_{1/2}$ de la CocE a 37 °C es de aproximadamente 15 minutos, mientras que a 4 °C, el $t_{1/2}$ es superior a 6 meses. Estudios preliminares en ratas demostraron una duración relativamente corta del efecto contra la cocaína de poco más de 30 minutos para la CocE.

45

Un aspecto de la invención por lo tanto proporciona polipéptidos de la CocE mutante purificados que presentan una estabilidad térmica y una semi-vida en plasma superiores en comparación con la CocE de tipo silvestre. Los polipéptidos de la CocE mutante de la invención tienen un valor clínico significativo debido a su capacidad para hidrolizar eficientemente la cocaína, al tiempo que también presentan una estabilidad térmica y/o una semi-vida en

50 plasma superiores.

La invención proporciona polipéptidos de la CocE mutante en los que se sustituye al menos un resto aminoácidos de la CocE de tipo silvestre, donde la CocE mutante tiene una mayor estabilidad térmica al tiempo que conserva una eficiencia catalítica relativamente alta. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la CocE mutante mantienen

55 sustancialmente la actividad esterasa funcional del polipéptido de la CocE de tipo silvestre (es decir, la hidrólisis de cocaína). Los polipéptidos de la CocE mutante tienen una secuencia de péptidos que difiere de un polipéptido de la CocE nativa en uno o más aminoácidos. La secuencia del péptido de dichos mutantes se puede caracterizar por una sustitución, supresión o adición de uno o más aminoácidos de un polipéptido de la CocE nativa. Las inserciones de aminoácidos preferentemente son de aproximadamente 1, 2, 3, y 4 a 5 aminoácidos contiguos, y las supresiones

60 preferentemente son de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 a 10 aminoácidos contiguos. En diversas realizaciones, el polipéptido de la CocE mutante puede contener al menos una, dos, tres, cuatro, o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos, en las que el polipéptido de la CocE mutante resultante tiene una mayor estabilidad térmica.

Los polipéptidos de la CocE mutante de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico, la secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, en la que la SEQ ID NO: 2 es un polinucleótido que codifica un polipéptido de la CocE de tipo silvestre; en el que la secuencia de aminoácidos comprende al menos una sustitución, adición o supresión de un resto aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 1 seleccionada del grupo que consiste en T172R, F189A/T172R, T172R/A193D, G1730, T172R/G173Q, T172R/G173Q-I175-G-G-A186, T172R/G1730-T176-G-G-D185, L169K y F189K; y el polipéptido de la CocE mutante tiene actividad cocaina esterasa con el aumento de la estabilidad térmica a 37 °C en comparación con la CocE de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

10

El término aminoácido, como se usa en el presente documento, pretende incluir aminoácidos naturales así como aminoácidos no naturales, incluyendo análogos y derivados de aminoácidos. Este último incluye moléculas que contienen un resto aminoácido. Un experto en la materia reconocerá que la referencia en este documento a un aminoácido incluye, por ejemplo, L-aminoácidos proteogénicos de origen natural; D-aminoácidos; aminoácidos químicamente modificados tales como análogos y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteogénicos de origen natural, y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica por ser características de los aminoácidos. Para todas las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento, se entiende que los nucleótidos y aminoácidos equivalentes se pueden sustituir en las secuencias sin afectar la función de las secuencias. Dicha sustitución está dentro de las capacidades de una persona de experiencia ordinaria en la técnica.

20

En el presente documento también se desvelan polipéptidos de la CocE mutante purificados con las siguientes sustituciones: L163V (SEQ ID NO: 3); V121D (SEQ ID NO: 4); S167A (SEQ ID NO: 5); Q123E (SEQ ID NO: 6); V225I (SEQ ID NO: 7); I218L (SEQ ID NO: 8); A310D (SEQ ID NO: 9); A149S (SEQ ID NO: 10); S159A (SEQ ID NO: 11); S265A (SEQ ID NO: 12); S56G (SEQ ID NO: 13); W220A (SEQ ID NO: 14); T122A (SEQ ID NO: 15); S140A (SEQ ID NO: 16); F189L (SEQ ID NO: 17); A193D (SEQ ID NO: 18); T254R (SEQ ID NO: 19); N42V (SEQ ID NO: 20); V262L (SEQ ID NO: 21); L508G (SEQ ID NO: 22); Y152H (SEQ ID NO: 23); V160A (SEQ ID NO: 24); T172R (SEQ ID NO: 25); Y532F (SEQ ID NO: 26); T74S (SEQ ID NO: 27); W285T (SEQ ID NO: 28); L146P (SEQ ID NO: 29); D533S (SEQ ID NO: 30); A194R (SEQ ID NO: 31); G173Q (SEQ ID NO: 32); C477T (SEQ ID NO: 33); K531A (SEQ ID NO: 34); R41I (SEQ ID NO: 35); L119A (SEQ ID NO: 36); K46A (SEQ ID NO: 37); F84Y (SEQ ID NO: 38); T172R-G173Q (SEQ ID NO: 39); L169K (SEQ ID NO: 40); F189A (SEQ ID NO: 41); N197K (SEQ ID NO: 42); R182K (SEQ ID NO: 43); F189K (SEQ ID NO: 44); V190K (SEQ ID NO: 45); Q191K (SEQ ID NO: 46); y A194K (SEQ ID NO: 47). Por ejemplo, el polipéptido de la CocE mutante T172R (SEQ ID NO: 25) tiene una mayor estabilidad térmica, una mayor $V_{\text{máx}}$ y K_m a 37 °C, una mayor temperatura de fusión (T_m), una mayor semi-vida en plasma, una mayor reducción de la letalidad debida a la toxicidad de la cocaína, y de mayor duración de sus efectos contra la cocaína, en comparación con la CocE de tipo silvestre (véase, por ejemplo, Ejemplo 4, Ejemplo 7).

35

El aumento resultante de la estabilidad térmica del polipéptido de la CocE mutante es de al menos aproximadamente 2 kcal/mol. La estabilidad térmica de un polipéptido dado se puede evaluar por diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, espectroscopia de dicroísmo circular (DC) o con calorimetría diferencial de barrido. Por ejemplo, el aumento resultante en la estabilidad térmica puede ser de al menos aproximadamente 2,1, al menos aproximadamente 2,2, al menos aproximadamente 2,3, al menos aproximadamente 2,4, al menos aproximadamente 2,5, al menos aproximadamente 2,6, al menos aproximadamente 2,7, al menos aproximadamente 2,8, al menos aproximadamente 2,9, al menos aproximadamente 3,0, al menos aproximadamente 3,1, al menos aproximadamente 3,2, al menos aproximadamente 3,3, al menos aproximadamente 3,4, al menos aproximadamente 3,5, al menos aproximadamente 3,6, al menos aproximadamente 3,7, al menos aproximadamente 3,8, al menos aproximadamente 3,9, al menos aproximadamente 4,0, al menos aproximadamente 4,1, al menos aproximadamente 4,2, al menos aproximadamente 4,3, al menos aproximadamente 4,4, o al menos aproximadamente 4,5 kcal/mol. Se contemplan aumentos de la estabilidad térmica aún mayores. Se cree que la reducción de la energía en aproximadamente 2,1 a aproximadamente 4,5 kcal/mol puede prolongar el tiempo de semi-vida de la proteína de aproximadamente 30 a aproximadamente 1000 veces más a temperatura ambiente.

50

En general, los polipéptidos de la CocE mutante tienen actividad esterasa con una mayor estabilidad térmica en comparación con la CocE de tipo silvestre. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la CocE mutante termoestables pueden tener menos actividad esterasa que la CocE de tipo silvestre. Por ejemplo, los mutantes de la CocE termoestables pueden tener aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 99 % de la actividad esterasa de la CocE de tipo silvestre. En otras realizaciones, los polipéptidos de la CocE mutante tienen aproximadamente la misma o una mayor eficacia catalítica que los polipéptidos de la CocE de tipo silvestre. Por ejemplo, los mutantes de la CocE termoestables pueden tener aproximadamente el 100 %, aproximadamente el 110 %, aproximadamente el 120 %, aproximadamente el 130 %, aproximadamente el 140 %, aproximadamente el 150 %, o superior de la actividad esterasa de la CocE de tipo silvestre.

60

En el presente documento también se desvelan variantes de los polipéptidos de la CocE mutante tales como fragmentos, análogos y derivados. En el presente documento se desvelan fragmentos de polipéptido de la CocE correspondientes a uno o más motivos y/o dominios particulares o a tamaños arbitrarios, por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1150 y 1200 aminoácidos de longitud. Se pueden obtener partes peptídico aisladas de polipéptidos de la CocE por selección de péptidos producidos de forma recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica dichos péptidos. Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente usando técnicas conocidas en la materia tales como química de f-Moc o t-Boc en fase sólida Merrifield convencional. Por ejemplo, un polipéptido de la CocE como se describe en este documento se puede dividir arbitrariamente en fragmentos de longitud deseada sin solapamiento de los fragmentos, o preferentemente se puede dividir en fragmentos superpuestos de una longitud deseada.

Otro aspecto de la invención desvelada en el presente documento se refiere a formas recombinantes del polipéptido de la CocE. En algunas formas de realización, las moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención incluyen aquellos polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la CocE de la invención. Otros polipéptidos recombinantes desvelados en esta memoria están codificados por un ácido nucleico que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99 %) con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, donde el polipéptido de la CocE recombinante expresado retiene sustancialmente la misma o una mayor eficiencia catalítica de polipéptido de la CocE de tipo silvestre y tiene una mayor estabilidad térmica en comparación con la CocE de tipo silvestre.

También en el presente documento se describen ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones rigurosas con los ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 2 o los complementarios de la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, en el presente documento se describen dichos ácidos nucleicos que se hibridan con la SEQ ID NO: 2 o el complementario de la SEQ ID NO: 2 en condiciones de baja rigurosidad, condiciones de rigurosidad moderada, o condiciones de alta rigurosidad y también codifican un polipéptido de la CocE mutante que tiene actividad esterasa con una mayor estabilidad térmica en comparación con la CocE de tipo silvestre. Los ácidos nucleicos preferidos son aquellos que tienen una secuencia de nucleótidos que es la complementaria de la totalidad o de una parte de la SEQ ID NO: 2. Otras variantes del gen de la CocE nativo dentro de la invención son polinucleótidos que comparten al menos el 65 % (por ejemplo, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 o el complementario de la SEQ ID NO: 2. Se pueden obtener ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones rigurosas o comparten al menos el 65 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 o el complementario de la SEQ ID NO: 2 por técnicas conocidas en la materia tales como realización de mutaciones en el gen de la CocE nativo, o por aislamiento de un organismo que expresa un ácido nucleico (por ejemplo, una variante alélica).

En el presente documento también se describen moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión de CocE mutante. Dichos ácidos nucleicos se pueden fabricar mediante la preparación de una construcción (por ejemplo, un vector de expresión) que expresa la proteína de fusión de CocE mutante cuando se introduce en un huésped adecuado. Por ejemplo, una construcción de este tipo se puede realizar por ligación de un primer polinucleótido que codifica la proteína CocE mutante fusionada en marco de lectura con un segundo polinucleótido que codifica otra proteína de tal manera que la expresión de la construcción en un sistema de expresión adecuado produce una proteína de fusión.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento se pueden modificar en un resto básico, resto de azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación, y similares. Las moléculas de ácido nucleico utilizadas en las realizaciones de la invención desveladas en el presente documento pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN (por ejemplo, ADNc, ADN genómico y ADN sintético). El ADN puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, y si es de cadena sencilla puede ser la cadena codificante (sentido) o no codificante (antisentido). La secuencia codificante que codifica un polipéptido de la CocE mutante puede ser idéntica a la secuencia de nucleótidos reivindicada, o también puede ser una secuencia codificante diferente que, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido que los polinucleótidos de las SEQ ID NOS: 3-37.

DISEÑO DE CocE MUTANTE

Las mutaciones termoestabilizantes de la CocE pueden estar diseñadas para aumentar la estabilidad termodinámica de un polipéptido a través de la reducción de ΔG (desplegada \rightarrow plegada) o una disminución de la tasa de desplegamiento mediante el aumento de la energía libre de activación del proceso de desplegamiento. La ΔG (desplegada \rightarrow plegada) es la diferencia de energía libre entre el estado desplegado y plegado. Para un polipéptido termodinámicamente estable, ΔG (desplegada \rightarrow plegada) debe tener un valor negativo. Generalmente, cuanto menor sea el valor ΔG (desplegada \rightarrow plegada), más estable será el estado plegado. La energía libre de activación

del proceso de desplegamiento es la diferencia de energía libre entre el estado plegado y el estado de transición de desplegamiento (Steipe, 1999).

Los polipéptidos de la CocE mutante con una mayor estabilidad térmica pueden estar diseñados y se pueden generar por diversos métodos conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, diseño racional, evolución dirigida (por ejemplo, mutagénesis aleatoria, mutagénesis del organismo huésped de la CocE), o una combinación de los mismos. La evolución dirigida se puede conseguir a través de la mutación y la recombinación seguida de la detección de la característica deseada o mediante la aplicación de una presión selectiva para obtener el rasgo de interés (véase, por ejemplo, Lehmann y Wyss, 2001). La mutagénesis se puede llevar a cabo sobre el gen específico de interés o por medio de mutagénesis y selección de un organismo huésped tal que se confiera la propiedad diseñada a la proteína de interés. Preferentemente, la estabilidad térmica de mutantes de la CocE se diseña por medio de una estrategia de tres puntas de (i) diseño racional a través de mutagénesis dirigida al sitio asistida por ordenador (véase, por ejemplo, Ejemplo 3; Ejemplo 4), (ii) mutagénesis al azar del gen de la CocE y selección de alto rendimiento (véase, por ejemplo, Ejemplo 4; Ejemplo 15); y (iii) mutagénesis del organismo huésped de la CocE seguido por selección genética (véase, por ejemplo, Ejemplo 14).

Los expertos en la materia conocen varios conceptos de diseño racional para llevar a cabo la reducción de ΔG (desplegada \rightarrow plegada) y/o el aumento de la energía libre de activación del proceso de desplegamiento (véase, por ejemplo, Lehmann, 2001). Por ejemplo, se puede: disminuir la entropía del estado desplegado mediante la introducción de puentes disulfuro adicionales o por mutaciones $X \rightarrow Pro$; aumentar la propensión hacia la α -hélice por sustituciones $Gly \rightarrow Ala$ o por estabilización de macrodipolos de α -hélices; mejorar las interacciones electrostáticas entre los restos superficiales cargados mediante la introducción de puentes salinos adicionales o incluso redes de puentes salinos, o por mutaciones termoestabilizantes basadas en cálculos de los potenciales electrostáticos.

El modelado molecular, basado en simulaciones apropiadas de dinámica molecular (DM), puede guiar racionalmente la mutagénesis dirigida al sitio con el fin de diseñar polipéptidos de la CocE mutante que posean una mayor estabilidad térmica. La simulación de DM clásica permite el estudio de la evolución temporal de un sistema de gran tamaño mediante la adopción de muchos pequeños intervalos de tiempo sucesivos bajo fuerzas atómicas determinadas por un conjunto de funciones con parámetros de interacción (campo de fuerza), incluyendo las interacciones de unión (enlaces, ángulos y ángulos diedros), interacciones no de unión de van der Waals y basadas en interacciones electrostáticas o cargas atómicas netas. Debido a la forma sencilla del campo de fuerza, la simulación de DM se puede llevar a cabo durante un tiempo de simulación suficientemente largo para dar propiedades significativas promediadas del conjunto, incluso para un sistema muy grande en el que participen más de un centenar de miles de átomos. Así, para la CocE y cada mutante propuesto, la simulación de DM puede dar lugar a una estructura 3D razonable promediada dinámicamente del polipéptido simulado en agua.

Una estrategia utilizada con éxito en el presente documento se centra en el diseño racional de mutaciones termoestabilizantes que disminuyen el valor de ΔG (desplegada \rightarrow plegada) del polipéptido (véase, por ejemplo, Ejemplo 3). Esta estrategia requiere solo el cálculo de ΔG (desplegada \rightarrow plegada), sin realizar un cálculo que requiera más tiempo sobre la estructura y la energética del estado de transición del desplegamiento. Por lo tanto, para aumentar la estabilidad térmica de un polipéptido antes de la pegilación, se puede utilizar un método implementado en un programa de diseño racional (por ejemplo, RosettaDesign) que utiliza una función de energía para evaluar la idoneidad de una secuencia particular para un plegamiento dado y un algoritmo de búsqueda Monte Carlo para la toma de muestras del espacio de secuencias. Se sabe que dicha estrategia produce un aumento de la estabilidad térmica de otras enzimas sin reducir la eficacia catalítica (véase, por ejemplo, Korkegian, 2005). Por ejemplo, el plegamiento utilizado en el cálculo puede corresponder al de la estructura cristalina de rayos X disponible de la CocE.

El programa de diseño racional permite predecir una serie de secuencias de aminoácidos modificados que potencialmente tienen energías más bajas (por ejemplo, los valores de ΔG (desplegadas \rightarrow plegadas)) y, por lo tanto, una mayor estabilidad térmica. Así, se puede utilizar el diseño computacional descrito en este documento para predecir las mutaciones en el núcleo del polipéptido de la CocE que pueden dar lugar a la termoestabilización del polipéptido sin pérdida de eficacia catalítica. Esta estrategia minimiza el tiempo de prueba experimental y aumenta en gran medida el éxito de los resultados experimentales. Las mutaciones termoestabilizantes predichas se pueden someter a ensayo individualmente por mutagénesis dirigida al sitio y, a continuación, en combinación, en un proceso iterativo (véase, por ejemplo, Ejemplo 15).

También se puede utilizar la evolución dirigida para generar mutantes de la CocE termoestables. La evolución dirigida comprende una serie de técnicas experimentales que producen diversidad y adaptación acelerada a través de la mutación y la recombinación seguida de la detección de la característica deseada o mediante la aplicación de una presión selectiva para obtener el rasgo de interés (Lehmann y Wyss (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12, 371-375). Por lo tanto la evolución dirigida implica tanto un proceso para generar diversidad como un método de cribado o selección eficiente para la detección o el enriquecimiento de la característica deseada. La evolución

dirigida se ha aplicado previamente con éxito a la producción de proteínas termoestables, y se ha logrado la generación de la diversidad, por ejemplo, a través de PCR propensa a errores, mutagénesis de saturación, combinación aleatoria de ADN, mutagénesis química, y sus combinaciones. La PCR propensa a errores amplifica el gen de interés con polimerasas sin corrección de pruebas y condiciones de estrés diseñadas para generar aleatoriamente mutaciones de un solo par de bases. Después de cada ronda se seleccionan los mejores mutantes y se usan como secuencias parentales en la siguiente ronda de mutagénesis. Esta técnica se ha utilizado para generar un número de variantes de proteínas termoestables, incluyendo propilo endopeptidasa (Uchiyama ma., et al. 2000), betaglucuronidasa (Flores, H. y A.D. Ellington (2002) *Journal of Molecular Biology* 315, 325-337) y la familia 10 xilanasas (Andrews et al. (2004) *J Biol Chem* 279, 54369-79). La mutagénesis de saturación también amplifica el gen de interés pero incorpora bases universales durante la amplificación para generar un número mucho mayor de mutaciones. Esta técnica se ha utilizado para generar estabilidad térmica de una enzima psicrófila (Miyazaki et al. (2000) *Journal of Molecular Biology* 297, 1015-1026). La combinación aleatoria de ADN implica uno o más ciclos de recombinación entre una serie de secuencias homólogas para obtener variantes mejoradas de una enzima dada. Esta técnica también se puede utilizar junto con la PCR propensa a errores, donde los mejores mutantes obtenidos por PCR propensa a errores se combinan por combinación aleatoria de ADN para generar un nuevo subconjunto de mutantes. La combinación aleatoria de ADN se ha implementado para generar variantes termoestables de beta-glucuronidasa (Flores, H. y A.D. Ellington (2002) *Journal of Molecular Biology* 315, 325-337). La mutagénesis química implica el tratamiento de ADN plasmídico con productos químicos que introducen mutaciones puntuales en la secuencia tales como hidroxilamina, nitrosaminas o sulfato de dimetilo. El tratamiento del plásmido con hidroxilamina se ha utilizado para generar mutantes termoestables de beta-glucosidasa A de *Bacillus polymyxa* (López-Camacho et al. (1996) *Biochemistry Journal* 314, 833-838) y luciferasa de luciérnaga (White et al. (1996) *Biochemistry Journal* 319 (Pt 2), 343-350).

La mutagénesis del organismo huésped de la CocE también se puede utilizar para generar mutantes de la CocE termoestables. Un método simple y rápido para la producción de variantes de la CocE termoestables se puede conseguir mediante la utilización de la capacidad de la enzima para conferir el metabolismo de la cocaína como única fuente de carbono en su organismo huésped. El gen de la CocE fue secuenciado originalmente a partir de *Rhodococcus* MB1 subclonando fragmentos génicos en *Rhodococcus erythropolis* CW25, una bacteria que no puede metabolizar la cocaína, pero capaz de crecer en los subproductos de la cocaína esterasa, éster metílico de ecgonina y benzoato de etilo (Bresler et al. (2000) *Applied & Environmental Microbiology* 66, 904-908). Otro organismo del que previamente se ha demostrado que metaboliza los subproductos de la cocaína es *Pseudomonas fluorescens* (mber), que era capaz de crecer en una relación simbiótica con otra bacteria capaz de metabolizar la cocaína a través de la esterasa, *Comamonas acidovorans* (MBLF).

Aunque difíciles de transformar con plásmidos a eficiencias altas, estas cepas bacterianas se pueden transformar de forma relativamente fácil con el gen de la CocE nativo clonado en vectores lanzadera apropiados y a continuación se puede realizar mutagénesis bacteriana tradicional (véase, por ejemplo, Ejemplo 14). Debido a que estas bacterias normalmente solo crecerían a 25-30 °C en productos de hidrólisis de la cocaína, sería de esperar que la selección de mutantes capaces de metabolizar la cocaína eficientemente a 37 °C seleccionase mutantes muy activos y de la CocE que sean estables a 37 °C.

La exposición de las bacterias a agentes de radiación o químicos para la producción de mutantes que llevan nuevos fenotipos es muy conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Maron, D.M. y Ames, BN (1983) *Mutation Research* 113, 173-215). La mutagénesis por irradiación puede implicar tanto radiaciones ionizantes como no ionizantes; sin embargo, la radiación no ionizante es ampliamente utilizada, y la radiación UV a 260 nm es la más efectiva como agente letal. La mutagénesis es causada por la inducción de dímeros de pirimidina, aumentando la probabilidad de incorporar emparejamientos erróneos durante la replicación. Las células se exponen a radiación UV a una dosis predeterminada para matar el 90-95 % de la población de células, y a continuación se buscan los mutantes entre los supervivientes. La mutagénesis química incluye el uso de análogos de bases, tales como 5-bromouracilo y 2-aminopurina que aumentan el error de copia durante la replicación, o el uso de agentes que reaccionan directamente con el ADN tales como hidroxilamina o nitrosoguanidina que inducen mutaciones a una frecuencia más alta que los análogos de base.

GENERACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE LA CocE MUTANTE

En la presente memoria además se describen métodos de producción de polipéptidos de la CocE mutante. Por ejemplo, se puede cultivar una célula huésped transfectada con un vector de ácido nucleico que dirige la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos de la CocE mutante en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del péptido. Las células se pueden recoger, lisar, y la proteína se puede aislar. Un polipéptido de la CocE mutante se puede aislar de las células huésped utilizando técnicas conocidas en la materia para purificar proteínas incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación por inmunofinidad con anticuerpos específicos para tales proteínas (véase, por ejemplo, Ejemplo 1).

Por ejemplo, después de que se haya expresado un polipéptido de la CocE mutante en una célula, se puede aislar utilizando cualquier cromatografía de inmovilización de anticuerpos. Más específicamente, se puede inmovilizar un anticuerpo dirigido contra CocE sobre una matriz de cromatografía en columna, y la matriz se puede utilizar para la cromatografía de inmovilización de anticuerpos para purificar el polipéptido de la CocE mutante a partir de lisados celulares por métodos convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook y Russel (2006) *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0879697717). Después de la cromatografía de inmovilización de anticuerpos, el polipéptido de la CocE mutante se puede purificar adicionalmente mediante otras técnicas convencionales, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento. En otra realización, un polipéptido de la CocE mutante se expresa como proteína de fusión que contiene un marcador de afinidad (por ejemplo, Hisx6) que facilita su purificación (véase, por ejemplo, Ejemplo 1).

PEGILACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE CocE MUTANTE

La CocE mutante se puede pegar con el fin de aumentar la duración de la acción y la estabilidad térmica, y disminuir la inmunogenicidad. La pegilación puede mejorar aún más la estabilidad térmica de la CocE mutante de la invención y aumentar la semi-vida en suero reduciendo el aclaramiento renal, la proteólisis, la captación de los macrófagos, y la respuesta inmunológica.

La pegilación es el proceso de fijación de unidades de repetición de etilenglicol (es decir, polietilenglicol, o PEG) a un polipéptido para reducir la inmunogenicidad del polipéptido y su velocidad de aclaramiento renal (véase, en general, Veronese, FM y Harris, JM (2002b) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 457-606, Veronese, FM y Harris, JM (2002c) *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 1259-1345, que revisan la tecnología de Pegilación). Cada unidad de etilenglicol puede unir dos o tres moléculas de agua, lo que aumenta eficazmente el tamaño del péptido, y puede proteger el péptido de la respuesta inmunitaria, de la degradación enzimática, y/o del aclaramiento renal rápido. El polietilenglicol también puede estabilizar contra cambios de temperatura y pH. El resultado neto es que el polipéptido terapéutico se puede mantener más tiempo en la sangre, e induce una menor respuesta inmunitaria (Harris, JM y Chess, RB (2003) *Nature Reviews. Drug Discovery* 2, 214-221). El PEG posee una serie de propiedades únicas, incluyendo la ausencia de toxicidad, antigenicidad e inmunogenicidad, una disminución del aclaramiento renal dependiente de la masa, y una alta flexibilidad y solubilidad en agua. Imparte estas características a las proteínas a las que está unido (Veronese, FM y Harris, JM (2002b) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 457-606).

Un polímero de PEG primero se puede activar con un grupo funcional que fomenta la unión covalente a un aminoácido de la proteína. El grupo hidroxilo terminal del PEG puede estar modificado por un carbonato activo, éster activo, aldehído o un derivado tresilato. El PEG se puede unir a lisinas o a restos de cisteína introducidos de la CocE mutante. Se pueden construir unidades de repetición de óxido de etileno en muchas configuraciones que tienen diferentes longitudes, con o sin ramificación, y con diversos pesos moleculares. Los medios de incorporación pueden incluir mutagénesis dirigida al sitio o el uso de derivados de maleimida de la transglutaminasa.

El PEG ha sido aprobado por la FDA para su uso como vehículo o base en productos farmacéuticos, incluyendo formulaciones inyectables, tópicas, rectales y nasales (Harris y Chess, 2003). Y los fármacos Pegilados se han aprobado para uso clínico (véase, por ejemplo, PEG-interferon alpha-2a (Hamidi, M and Tajerzadeh, H (2003) *Drug Delivery* 10, 9-20; PEG-interferon alpha-2b (Reddy et al. (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 571-586).

Debido a una movilidad dinámica espacial sin igual del PEG, la modificación de la superficie de una CocE mutante por el polímero de PEG puede proteger a la enzima recubierta de la acción de las enzimas proteolíticas y el reconocimiento por el sistema inmunitario, reduciendo de este modo la inmunogenicidad y prolongando la semi-vida en circulación de la CocE mutante pegilada. El éxito de las estrategias de pegilación incluyen liposomas modificados con PEG (es decir, los liposomas ocultos, denominados así debido a su capacidad para esquivar la detección inmunitaria y el aclaramiento renal para producir un tiempo de circulación significativamente prolongado (Lasic, DD (1997) *Journal of Controlled Release* 48, 203- 222), así como la asparaginasa pegilada cuya semi-vida *in vivo* se ha mejorado drásticamente para la asparaginasa libre de 26 horas observadas a 15 días (Avramis et al. (2002) *Blood* 99, 1986-1994). Además, en la técnica se reconoce que la pegilación puede mejorar significativamente la estabilidad térmica de una enzima (Kazan, D. y Erarslan, A. (1997) *Applied Biochemistry & Biotechnology* 62, 1-13; Efremova et al. (1998) *Biochemistry (Moscú)* 63, 441-447) y reducir la activación del sistema del complemento (Chang et al. (2005) *Bioconjugate Chemistry* 16, 147-155). Por lo tanto, la tecnología de Pegilación es muy adecuada para mejorar los efectos farmacológicos y farmacéuticos de la CocE mutante de la invención (véase, por ejemplo, Ejemplo 11). La pegilación de la CocE mutante también se puede utilizar junto con la encapsulación en glóbulos rojos.

ENCAPSULACIÓN DE CocE MUTANTE EN GLÓBULOS ROJOS

El CocE mutante se puede encapsular en glóbulos rojos sanguíneos (GRS) a fin de aumentar la duración de la acción y la estabilidad térmica, y disminuir la inmunogenicidad. La cocaína, de la misma forma que atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica, también cruza rápidamente la membrana plasmática de los glóbulos rojos, y esta absorción se ha demostrado en un estudio de la administración de cocaína por vía intravenosa en el ser

humano (Javaid et al. (1978) Journal of Chromatography 15, 105-113). Además, las concentraciones de cocaína en glóbulos rojos superan las concentraciones en plasma (Javaid et al. (1978) Journal of Chromatography 15, 105-113). Como tal, la encapsulación en glóbulos rojos se puede utilizar para proteger del aclaramiento a formas termoestables de la CocE.

5

Los eritrocitos se han utilizado ampliamente por sus posibles como vehículos de fármacos (Wang et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). Al ser las células más abundantes del cuerpo humano, los glóbulos rojos ofrecen ventajas incomparables para funcionar como vehículo de fármacos. En primer lugar, los eritrocitos son completamente biocompatibles y biodegradables, en particular cuando se utilizan células autólogas para la carga de fármacos. Además, la forma de disco bicóncava de los eritrocitos les proporciona la relación de superficie a volumen más alta ($1,9 \times 10^4$ cm/g) (Guyton, AG & Hall, JE (1996) Textbook of Medical Physiology, 425-433) utilizable para la encapsulación de fármacos. La encapsulación en glóbulos rojos también evita que el fármaco cargado se inactive por factores endógenos, además de proteger a los organismos de los efectos tóxicos del fármaco encapsulado (Wang et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). Por otra parte, la encapsulación en glóbulos rojos permite evitar las respuestas inmunitarias no deseables (es decir, antigenicidad e inmunogenicidad) que pueden ser provocadas por cuerpos extraños (Wang et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). Además, los eritrocitos poseen una semi-vida en circulación más prolongada en comparación con otros vehículos sintéticos. Por ejemplo, se informa que la duración de la vida normal de un eritrocito en circulación sistémica es de unos 120 días (Guyton, AG & Hall, JE (1996) Textbook of Medical Physiology, 425-433).

20

La encapsulación de la CocE mutante en los eritrocitos se puede realizar de acuerdo con varias técnicas conocidas en la materia, incluyendo electroporación, endocitosis inducida por fármacos (por ejemplo, primaquina), y ósmosis (véase, por ejemplo, Green, R. y Widder, KJ (1987) Methods in Enzymology, Vol. 149). Estos métodos pueden incluir la hinchazón y rotura de la membrana celular, liberando el contenido de su interior, incluida principalmente la hemoglobina y también el citoesqueleto, atrapando el fármaco, y a continuación el resellado de la membrana para producir glóbulos rojos esféricos con forma de copa de color rosa o de color blanco (generalmente denominados "glóbulos rojos fantasma").

Como alternativa, se pueden emplear los péptidos que penetran la membrana para encapsular CocE mutante en eritrocitos (véase, por ejemplo, Ejemplo 12). Los péptidos que penetran la membrana, o los péptidos del dominio de transducción de proteínas (PTD) son una familia de péptidos pequeños (normalmente compuestos de 10 a 15 restos de aminoácidos) que incluyen TAT, PBPM, y otros péptidos catiónicos ricos en arginina (véase, en general, Dietz, GPH y Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131). En la técnica se sabe que, mediante la unión covalente de PTD a casi cualquier tipo de especies moleculares que incluyen proteínas (PM > 150 kDa; ya se han probado más de 60 proteínas diferentes (Dietz, GPH y Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131) y nano-vehículos (por ejemplo, liposomas), el PTD puede transportar las especies unidas a través de la membrana celular de todos los tipos de órganos, incluyendo el cerebro (Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572). El PTD no es ni tóxico ni inmunógeno (Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572), y la internalización celular mediada por PTD no induce perturbación o alteración de la membrana celular de los eritrocitos (Suzuki et al. (2002) Journal of Biological Chemistry 275, 2437-2443). El PTD se ha utilizado con éxito en la carga de glóbulos rojos con proteínas, y da lugar a eritrocitos con atributos físicos y químicos no alterados (véase, por ejemplo, Li et al. (2003) American Pharmaceutical Review 6, 22-26). Por lo tanto, la conjugación del péptido PTD a CocE mutante puede facilitar la encapsulación en glóbulos rojos. La encapsulación en glóbulos rojos también se puede llevar a cabo mediante el uso de la CocE mutante pegilada.

45

ESTABILIZACIÓN DE CocE MUTANTE

Otro aspecto de la invención se refiere a la estabilización de polipéptidos de la CocE mutante de la invención en una composición farmacéutica utilizando sustratos, productos, y/o inhibidores de la cocaína. Los sustratos y productos útiles en las realizaciones desveladas en el presente documento incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, cocaína; derivados de la cocaína, tales como, por ejemplo, (-)-cocaína, (+)-cocaína, tropococaína, y similares; derivados de tío-cocaína, tales como, por ejemplo, tiol-1, tiol-2, y similares; derivados de amida-cocaína; derivados de provitamina-cocaína, como la cocaína PABA, cocaína niacina, y similares; ácido benzoico; acetato de 4-nitrofenilo (4NPA); 4-nitrofenol (4NP); y similares. Los inhibidores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, análogos de sustrato, tales como, fosfo-fluorococaína, O-fosfo-cocaína, O-metilfosfococaína, S-metilfosfococaína, y similares; análogos de productos, como por ejemplo, ecgonina y derivados de ecgonina, como por ejemplo, análogo del éster metílico de ecgonina del ácido borónico; ácido fenilborónico; derivados del ácido benzoico, tales como, ácido 4-terc-butil benzoico, ácido 1-naftoico, éster metílico del ácido 2,3,4-trimetil-benzoico, y similares. Productos químicos adicionales incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, SDS, glicerol, PEG, y similares.

60

Preferentemente, los sustratos, productos y/o inhibidores estabilizan la desnaturalización térmica de los polipéptidos desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, los sustratos, productos y/o inhibidores también previenen la agregación inducida térmicamente en la electroforesis en gel. En general, el uso de un sustrato, producto, y/o inhibidor da lugar a al menos aproximadamente un 10 % de aumento en la estabilidad y/o la inhibición,

respectivamente. Por ejemplo, el aumento puede ser de aproximadamente el 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 120 %, 150 %, 200 %, 300 %, o incluso del 500 % o superior. Por lo tanto, los sustratos, productos, y/o inhibidores son muy adecuados para estabilizar los polipéptidos de la CocE mutante desvelados en este documento (véase, por ejemplo, Ejemplo 20).

5

En una realización, las moléculas pequeñas se utilizan para termoestabilizar los polipéptidos de la CocE mutante desvelados en este documento. En una realización preferida, dichas moléculas no ocupan el sitio activo del polipéptido.

- 10 En algunas realizaciones, los polipéptidos desvelados en este documento se pueden infundir conjuntamente con una molécula estabilizadora. En otras realizaciones, las moléculas estabilizadoras se pueden utilizar para estabilizar el polipéptido durante la fabricación. En todavía otras formas de realización, las moléculas estabilizadoras se pueden utilizar para estabilizar los polipéptidos de la CocE mutante hasta que estén listos para su uso.

15 **MÉTODOS DE TRATAMIENTO**

Otro aspecto de la invención se refiere a la estrategia de degradación catalítica para agentes terapéuticos contra la cocaína. Se proporcionan tratamientos, tanto profilácticos como terapéuticos, de las enfermedades inducidas por cocaína mediante la administración de polipéptidos de la CocE termoestables esterasa activos mutantes a un sujeto que lo necesite. Las variantes de la cocaína esterasa de la invención tienen un valor clínico significativo debido a su mayor estabilidad térmica y a una semi-vida en plasma más prolongada que la CocE conocida de origen natural. Este aumento de la estabilidad térmica y la semi-vida en plasma permite una respuesta mucho más rápida a los síntomas tóxicos de la cocaína que amenazan la vida, que es lo que los diferencia de las variantes de la CocE de la invención de otras opciones de tratamiento.

25

Una determinación de la necesidad de tratamiento normalmente se evalúa por el historial y un examen físico de acuerdo con la enfermedad inducida por la cocaína. Las enfermedades inducidas por la cocaína incluyen, pero no se limitan a, sobredosis de cocaína, intoxicación por cocaína y dependencia y/o adicción a la cocaína. Por ejemplo, el diagnóstico de la intoxicación por cocaína puede incluir convulsiones, crisis de epilepsia, paro cardíaco, infarto de miocardio, arritmias cardíacas, aumento de la presión arterial, accidente cerebrovascular, psicosis inducida por fármacos, aneurisma disecante, y aumento de la demanda miocárdica de oxígeno. Como ejemplo adicional, en el caso de la dependencia y/o adicción a la cocaína, los síntomas de abstinencia incluyen sensaciones subjetivas de disforia leve a severa, depresión, ansiedad o irritabilidad. Los sujetos con una necesidad identificada de terapia incluyen aquellos con una enfermedad diagnosticada inducida por la cocaína, una indicación de una enfermedad inducida por la cocaína, y sujetos que han sido tratados, están siendo tratados, o serán tratados por una enfermedad inducida por la cocaína. El sujeto preferentemente es un animal, incluyendo, pero no limitado a, mamíferos, reptiles, aves y, más preferentemente caballos, vacas, perros, gatos, ovejas, cerdos y pollos, y lo más preferentemente un ser humano.

- 40 Una cantidad eficaz de los polipéptidos de la CocE mutante descritos en este documento generalmente es aquella que puede reducir la toxicidad de la cocaína o la gravedad de una enfermedad inducida por la cocaína. La reducción de la gravedad incluye, por ejemplo, una detención o una disminución de los síntomas, de los indicadores fisiológicos, de los marcadores bioquímicos o de los indicadores metabólicos. Cuando se utiliza en los métodos de la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido de la CocE mutante descrito en este documento se puede emplear en forma pura o, cuando existan dichas formas, en forma de sal farmacéuticamente aceptable y con o sin un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, los polipéptidos de la CocE mutante de la invención se pueden administrar a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico, en una cantidad suficiente para reducir sustancialmente la concentración de cocaína en la sangre y/o tejidos del sujeto.

- 50 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los polipéptidos de la CocE mutante se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares y/o animales experimentales para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀, (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico que se puede expresar como la relación DL₅₀/DE₅₀, donde se prefieren los índices terapéuticos grandes.

55

La cantidad de polipéptido de la CocE mutado que se puede combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y del modo de administración particular. Los expertos en la materia apreciarán que el contenido de agente unitario contenido en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita constituir por sí misma una cantidad terapéuticamente eficaz, puesto que la cantidad terapéuticamente eficaz necesaria se puede alcanzar mediante la administración de una serie de dosis individuales. La administración del agente puede ocurrir como un evento único o durante el transcurso del tiempo de tratamiento. Por ejemplo, un agente se puede administrar diaria, semanal, quincenal o mensualmente. Para algunas enfermedades, el tratamiento se podría prolongar de varias semanas a varios meses o incluso durante un año o más.

60

El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto particular dependerá de diversos factores incluyendo la enfermedad a tratar inducida por la cocaína y la gravedad de la enfermedad inducida por la cocaína; la actividad del polipéptido de la CocE mutante empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la semi-vida en plasma del polipéptido de la CocE mutante; la tasa de excreción del polipéptido de la CocE mutante empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o simultáneamente con el polipéptido de la CocE mutante empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas (véase, por ejemplo, Koda-Kimble et al. (2004) *Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs*, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781748453; Winter (2003) *Basic Clinical Pharmacokinetics*, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781741475; Sharqel (2004) *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*, McGraw-Hill/Appleton & Lange, ISBN 0071375503). Un experto en la materia entenderá que el uso diario total del polipéptido de la CocE mutante para su uso en realizaciones de la invención desvelada en el presente documento lo decidirá el médico asistente dentro del alcance del buen criterio médico.

Los polipéptidos de la CocE mutante descritos en el presente documento también se pueden utilizar en combinación con otras modalidades terapéuticas. Por lo tanto, además de las terapias descritas en el presente documento, también se puede proporcionar a los sujetos otras terapias conocidas por ser eficaces para determinadas enfermedades inducidas por la cocaína.

Los polipéptidos de la CocE mutante descritos en este documento se pueden formular de cualquier manera convencional usando uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables (véase, por ejemplo, Gennaro (2005) *Remington The Science and Practice of Pharmacy* 21st ed. Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781746736). Dichas formulaciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de la CocE mutante, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo con el fin de proporcionar la forma para la administración apropiada al sujeto. La formulación debe adecuarse al modo de administración. Los polipéptidos de la CocE mutante de uso con la presente invención se pueden formular por métodos conocidos para la administración a un sujeto usando varias rutas que incluyen, pero no se limitan a, vía parenteral, pulmonar, oral, tópica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oftálmica, bucal y rectal. El polipéptido de la CocE mutante también se puede administrar en combinación con uno o más agentes adicionales descritos en este documento y/o junto con otros agentes biológicamente activos o biológicamente inertes. Dichos agentes biológicamente activos o inertes pueden estar en comunicación fluida o mecánica con el agente(s) o unidos al agente(s) por fuerzas iónicas, covalentes, de Van der Waals, hidrófobas, hidrófilas o fuerzas físicas de otro tipo.

Los polipéptidos de la CocE mutante descritos en el presente documento se pueden administrar por vía parenteral, incluyendo vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, e inyecciones intraperitoneales. En las formulaciones de biomoléculas también se pueden incluir excipientes, utilizados habitualmente en la administración parenteral de moléculas de fármaco pequeñas, incluyendo mejoradores de la solubilidad, agentes osmóticos, tampones, y conservantes. La inclusión de agentes de antiagregación y antiadsorción, tales como tensioactivos y albúmina, cuando se formulan y administran biomoléculas puede añadir una mayor estabilidad y disminuir el riesgo de que la biomolécula activa interactúe con una interfaz, que puede dar lugar al desplegamiento, agregación, y/o precipitación. El polipéptido de la CocE mutante se puede liofilizar para añadir estabilidad durante el almacenamiento, y se puede volver a procesar antes de la administración parenteral.

Preferentemente, el polipéptido de la CocE mutante está pegilado, proporcionando así una mayor estabilidad y una menor inmunogenicidad (véase más arriba).

La administración pulmonar de macromoléculas, tales como polipéptidos de la CocE mutante, proporciona una administración relativamente fácil y no invasiva al sistema circulatorio para la distribución sistémica (véase, por ejemplo, Cryan (2004) *AAPS J.* 7 (1) artículo 4, E20-41, que proporciona una revisión de la tecnología de administración pulmonar). Las ventajas de la administración pulmonar incluyen la ausencia de invasividad, gran área superficial para la absorción ($\sim 75 \text{ m}^2$), epitelio alveolar delgado ($-0,1$ a $0,5 \mu\text{m}$) que permite una absorción rápida, la ausencia de metabolismo de primer paso, disminución de la actividad proteolítica, el rápido inicio de la acción, y una alta biodisponibilidad. En la técnica se conocen varios dispositivos de administración por inhalación, tales como inhaladores de dosis medidas, nebulizadores e inhaladores de polvo seco, que se pueden utilizar para administrar las biomoléculas descritas en este documento (por ejemplo, AERx (Aradigm, CA); Respimat (Boehringer, Alemania); AeroDose (Aerogen Inc., CA)). Los dispositivos de inhalación de polvo seco son particularmente preferidos para la administración pulmonar de agentes a base de proteínas (por ejemplo, Spinhaler (Fisons Pharmaceuticals, NY); Rotahaler (GSK, NC); Diskhaler (GSK, NC); Spiros (Dura Pharmaceuticals, CA); Nektar (Nektar Pharmaceuticals, CA)).

Se pueden formular preparaciones de liberación controlada (o de liberación sostenida) para prolongar la actividad del polipéptido de la CocE mutante y reducir la frecuencia de dosificación. También se pueden usar preparaciones de

liberación controlada para controlar el momento de inicio de la acción u otras características, como los niveles sanguíneos del agente, y por consiguiente afectar a la aparición de efectos secundarios. Las preparaciones de liberación controlada pueden estar diseñadas para liberar inicialmente una cantidad de polipéptido de la CocE mutante que produzca el efecto terapéutico deseado, y liberar gradual y continuamente otras cantidades para mantener el nivel de efecto terapéutico durante un período de tiempo prolongado. Con el fin de mantener un nivel casi constante de polipéptido de la CocE mutante en el cuerpo, el agente se puede liberar de la forma de dosificación a una velocidad que reemplazará la cantidad de agente que se metaboliza y/o excreta del cuerpo. La liberación controlada de un agente se puede estimular con varios inductores, por ejemplo, un cambio en el pH, cambio en la temperatura, enzimas, agua, u otras condiciones o moléculas fisiológicas.

10

Los sistemas de liberación controlada pueden incluir, por ejemplo, una bomba de infusión que se puede utilizar para administrar el agente de una manera similar a la utilizada para la administración de insulina o quimioterapia en órganos o tumores específicos. Los agentes de la invención se pueden administrar por otros medios de liberación controlada o dispositivos de administración que son bien conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, hidropropilmetil celulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, depósitos, recubrimientos multicapa, micropartículas, liposomas, microesferas, o similares, o una combinación de cualquiera de los anteriores para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Otros métodos de suministro de liberación controlada de agentes serán conocidos por el experto en la materia y están dentro del alcance de la invención.

20

Los polipéptidos de la CocE mutante se pueden encapsular y administrar en diversos sistemas de administración del vehículo. Los sistemas basados en vehículos para la administración de un agente biomolecular pueden: proporcionar administración intracelular; velocidades de liberación a medida de biomoléculas/agente; aumentar la proporción de biomolécula que llega a su lugar de acción; mejorar el transporte del fármaco a su sitio de acción; permitir la deposición colocalizada con otros agentes o excipientes; mejorar la estabilidad del agente *in vivo*; prolongar el tiempo de residencia del agente en su sitio de acción mediante la reducción del aclaramiento; disminuir la administración no específica del agente en los tejidos no diana; disminuir la toxicidad debida a dosis iniciales altas del agente; alterar la inmunogenicidad del agente; disminuir la frecuencia de dosificación, mejorar el sabor del producto; y/o mejorar la vida útil del producto.

30

Ejemplos de sistemas de administración de vehículo para polipéptidos de la CocE mutante descritos en este documento incluyen microesferas (véase, por ejemplo, Varde y Pack (2004) Expert Opin. Biol. 4 (1) 35-51), hidrogeles (véase, en general, Sakiyama et al. (2001) FASEB J. 15, 1300-1302), implantes poliméricos (véase en general, Teng et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99, 3024-3029), vehículos poliméricos inteligentes (véase, en general, Stayton et al. (2005) Orthod Craniofacial Res 8, 219-225; Wu et al. (2005) Nature Biotech (2005) 23 (9), 1137-1146.), y liposomas (véase, por ejemplo, Galovic et al. (2002) Eur. J. Pharm. Sci. 15, 441-448; Wagner et al. (2002) J. Liposome Res. 12, 259-270). Preferentemente, el polipéptido de la CocE mutante está encapsulado en glóbulos rojos (véase más arriba; Ejemplo 12).

40 **MÉTODOS DE SELECCIÓN**

En este documento también se desvelan métodos de selección para la generación, identificación y purificación de polipéptidos de la CocE mutante termoestables. En general, los polipéptidos de la CocE mutante pueden estar inicialmente diseñados de acuerdo con las estrategias descritas anteriormente. Dichos polipéptidos diseñados se pueden seleccionar entonces para características preferidas, como la retención de la eficiencia hidrolítica, el aumento de la estabilidad térmica, el aumento de la semi-vida en plasma, y/o una menor antigenicidad. Además, los polipéptidos de la CocE mutante aleatorios se pueden seleccionar para las características deseadas.

Los métodos de detección para la selección de mutantes termoestables abarcan una amplia variedad de técnicas. El siguiente es un resumen de ejemplo de un protocolo genérico. El ácido nucleico que codifica los polipéptidos de la CocE mutante (generado, por ejemplo, a través del diseño racional, mutagénesis aleatoria, o mutagénesis del huésped) se transforma en un huésped de expresión adecuado (por ejemplo, células de *E. coli* tales como *E. coli* BL21 Gold (Stratagene)), y la expresión del polipéptido mutante se induce de acuerdo con protocolos convencionales (por ejemplo, por IPTG). La expresión se realiza a temperaturas para producir la expresión óptima de proteínas (por ejemplo, 16 °C para CocE, véase, por ejemplo, Ejemplo 1) durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, de 30 minutos a 24 horas o más). Como alternativa, la expresión se lleva a cabo a una temperatura elevada (por ejemplo, la temperatura elevada puede ser de al menos aproximadamente 35 °C, al menos aproximadamente 36 °C, al menos aproximadamente 37 °C, al menos aproximadamente 38 °C, al menos aproximadamente 39 °C, al menos aproximadamente 40 °C, o incluso superior). Preferentemente, la temperatura elevada a la cual se expresa el polipéptido de la CocE mutado es de 37 °C. En torno a esta temperatura, el polipéptido de la CocE de tipo silvestre se reparte casi exclusivamente en cuerpos de inclusión. Las células que contienen los polipéptidos mutantes expresados se examinan para detectar la presencia de variantes termoestables de la CocE.

- La detección de la presencia de variantes termoestables de la CocE generalmente implica la medición directa en células cultivadas, en lisados celulares, o después de la ruptura celular y el aislamiento del polipéptido de la CocE mutante. La ruptura celular puede incluir choque osmótico, lisis química, sonicación, y/u homogeneización, y el aislamiento del polipéptido mutante se puede obtener a través de numerosos métodos que incluyen la absorción directa a una matriz o absorción de afinidad con la utilización de anticuerpos contra la cocaína o sistemas de captura específicos de proteínas de fusión. La matriz adecuada para la absorción incluye papel de nitrocelulosa, filtros, placas de microtitulación no tratadas o tratadas por afinidad, resinas de agarosa o sefarosa, y/o puntas revestidas de afinidad.
- 5
- 10 La actividad esterasa de las células cultivadas o el polipéptido mutante aislado se puede medir posteriormente a una o más temperaturas para determinar la estabilidad térmica de los mutantes. La temperatura a la que se realiza el ensayo de actividad determina el grado de detección de la estabilidad térmica. Así, aunque los mutantes finales preferentemente tendrán una temperatura de fusión de 45 °C o superior (según se determina mediante, por ejemplo, dicroísmo circular), a menudo, la selección inicial a 45 °C no encontrará enzimas activas. En vez de eso, se pueden
- 15 realizar varios ciclos de mutagénesis y selección a temperaturas crecientes para conseguir mutantes termoestables. Por lo tanto, la selección inicial se puede realizar a 30 °C, y después de ciclos adicionales de mutagénesis, la selección se puede realizar con temperaturas gradualmente crecientes (por ejemplo, 34 °C, 37 °C, 40 °C, 42,5 °C, 45 °C, etc.), hasta que se consigue un mutante con la estabilidad térmica adecuada. Los aumentos incrementales de temperatura se determinan empíricamente durante el procedimiento, y se ven afectados por el número de aciertos a
- 20 temperaturas particulares y la T_m determinada de los mutantes generados.

Si bien no se tiene la obligación de hacerlo, y aunque no se desea estar limitado por la teoría, a continuación en este documento sigue lo que se cree que es una explicación del mecanismo de fusión de varias realizaciones de polipéptidos de la CocE mutante descritos en el presente documento. Los datos de los espectros de DC ilustran que

25 la fusión DC de la cocaína esterasa y los mutantes es irreversible, puesto que el enfriamiento a 0 grados no modifica el espectro original (véase, por ejemplo, Ejemplo 19). Aunque no se pueden determinar parámetros termodinámicos, se pueden utilizar espectros de DC para determinar comparativamente si los mutantes son más o menos estables, o si tienen diferentes estructuras secundarias o propiedades de agregación. Se cree que los polipéptidos de la CocE descritos en este documento se funden a través de una etapa intermedia, es decir, los polipéptidos se someten a un

30 proceso de fusión en 2 etapas.

La detección de la actividad esterasa se puede realizar utilizando diversos métodos, en los que los sustratos están acoplados a un sistema de detección específica. Sustratos apropiados para su uso en la determinación de la actividad esterasa pueden incluir cocaína, cocaína tritiada (3H), derivados de sustrato de cocaína tales como un

35 derivado de tio-cocaína (véase, por ejemplo, Figura 6), y/o sustratos que informan de actividad esterasa general tal como acetato de 4-nitrofenilo. El sistema de detección puede estar acoplado directamente a las especificidades de sustrato, por ejemplo: la escisión de la cocaína no modificada se puede detectar controlando los cambios en la absorbancia de la cocaína a 240 nm (véase, por ejemplo, Ejemplo 4), o controlando los cambios de pH que resultan de la acumulación del producto ácido del ácido benzoico (véase, por ejemplo, Ejemplo 15), o usando aptámeros de cocaína (véase, por ejemplo, Stojanovic, M. N., de Prada, P. & Landry, D. W. (2001) J Am Chem Soc 123, 4928-

40 4931; Stojanovic, M. N. & Landry, D. W. (2002) J Am Chem Soc 124, 9678-9679) controlando los cambios en la fluorescencia tras la degradación de la cocaína (véase Ejemplo 15); la escisión de cocaína tritiada (3H) se puede detectar mediante acidificación y detección de producto de ácido benzoico tritiado mediante la separación por cromatografía (véase Ejemplo 1 y 15); la escisión de derivados de la cocaína tales como tio-cocaína se puede

45 controlar por detección de grupos sulfhidrilo reactivos, mediante la adición de reactivo de Ellman y determinación de los cambios de absorbancia a 412 nm (véase, por ejemplo, Ejemplo 15), o mediante la adición y visualización de la precipitación de sulfhidrilo que reacciona con metales pesados; la escisión del acetato de 4-nitrofenilo se puede detectar controlando los cambios en la absorbancia a 420 nm (véase, por ejemplo, Halgasova, N. et al. (1994) Biochem J 298 Pt 3, 751-755; O'Conner, CJ & Manuel, RD (1993) J Dairy Sci. 76, 3674-3682).

50 Los polipéptidos de la CocE mutante identificados mediante los procedimientos anteriores, o un ensayo de alto rendimiento similar, se pueden evaluar adicionalmente utilizando los procedimientos *in vitro* descritos en el presente documento (por ejemplo, los valores de K_{cat} y K_m , de estabilidad a 37 °C, la temperatura de fusión (T_m), los niveles de endotoxinas, la capacidad de degradar la cocaína en plasma). Los polipéptidos de la CocE mutante con actividad

55 esterasa termoestable y/o inmunogenicidad reducida se pueden evaluar adicionalmente usando procedimientos *in vivo* descritos en este documento (por ejemplo, potencia, duración de acción, efectos con la administración repetida, y/o evaluación inmunológica). Preferentemente, primero se examinan los polipéptidos de la CocE mutante que reducen enormemente la toxicidad de la cocaína (véanse, por ejemplo, Ejemplos 5, 7 y 8), y adicionalmente se pueden evaluar aquellos mutantes que reducen la toxicidad en al menos aproximadamente 5-10 veces durante el

60 transcurso de la acción (véase, por ejemplo, Ejemplo 6). Los polipéptidos de la CocE mutante candidatos se pueden estabilizar adicionalmente mediante, por ejemplo, pegilación y/o encapsulación en glóbulos rojos y se pueden reevaluar en los procedimientos descritos anteriormente.

Habiendo descrito la invención en detalle, será evidente que son posibles modificaciones, variaciones y realizaciones

equivalentes sin apartarse del alcance de la invención definida en las reivindicaciones adjuntas. Además, se debe apreciar que todos los ejemplos en la presente descripción se proporcionan como ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

5

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente diversas realizaciones de la invención desvelada en el presente documento. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan estrategias que los inventores han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se puede considerar que constituyen ejemplos de modos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían apreciar, a la luz de la presente descripción, que pueden introducirse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan.

Ejemplo 1: EXPRESIÓN DE CocE

15 Se estableció un método para la expresión y purificación de la CocE, donde CocE se expresa en *E. coli* como proteína de fusión con un marcador Hisx6 carboxilo terminal. El gen de la cocaína esterasa se subclonó en el vector de expresión de *E. coli* pET-22b(+) y se indujeron altos niveles de la enzima cocaína esterasa que contiene un marcador de histidina C-terminal tras la adición de IPTG a 23 C. La proteína recombinante se acumula a aproximadamente el 10-15 % de la proteína total. La CocE se enriqueció en una columna de quelato de cobalto
20 (Talon™ Clontech) o en una columna de agarosa quelada con níquel (Pierce) en virtud del marcador Hisx6. La proteína eluida era aproximadamente el 95 % pura por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, y se resolvió posteriormente por columna de cromatografía de intercambio iónico FPLC (Q-Sepharose) usando un gradiente de NaCl. La proteína eluida como un solo pico era aproximadamente el 99 % pura, como se clasifica por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (véase, por ejemplo, Figura 3).

25

Se determinó la actividad de la enzima a través de dos ensayos: un ensayo de actividad de radio-ligando en el que se hidrolizó cocaína tritiada y a continuación, después de la acidificación, el producto de ácido benzoico tritiado se separó del clorhidrato de cocaína tritiada por cromatografía; y un ensayo espectrofotométrico en condiciones similares según lo descrito por Turner et al. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307. Los espectros de absorción única
30 de la cocaína (coeficiente de extinción 6,7 l/mmol/cm, a 240 nm) permiten observar la cocaína restante después de la escisión enzimática. Las tasas lineales iniciales de descomposición de la cocaína, que representan la velocidad, se determinaron en un lector de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices) utilizando el *software* SOFTmax Pro (v1.13). La reacción se inició mediante la adición de 150 µl de una solución de enzima 2x a 150 µl de una solución de cocaína 2x. Las concentraciones de la CocE finales oscilaban de 100 ng/ml a 20 ng/ml. Las concentraciones
35 finales de cocaína fueron las siguientes: 250, 126, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81, 3,91, y 1,95 µM. Para la cinética de todas las enzimas, el tampón era una solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Las velocidades iniciales se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, con Kcat y Km como parámetros ajustables (GraphPad; PRISM, v4).

Como se determinó usando el ensayo espectrofotométrico de cocaína, el polipéptido de la CocE de tipo silvestre
40 purificado hidroliza cocaína con una Kcat de aproximadamente 500 min⁻¹ y una Km de aproximadamente 2 µM, que es coherente con los valores reportados previamente (véase, por ejemplo, Turner et al. 2000).

Dichos procedimientos de expresión se pueden utilizar para los polipéptidos de la CocE mutante descritos en este documento.

45

EJEMPLO 2: ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE CocE EX VIVO

Determinación *ex vivo* de los niveles de cocaína después de investigar la cocaína esterasa en plasma humano (banco de sangre del Hospital de la Universidad de Michigan). La cocaína se obtuvo del Instituto Nacional de Abuso
50 de Fármacos (Bethesda, MD, EE.UU.). La cocaína se disolvió en agua estéril. Alícuotas (3 ml) de plasma humano se mantuvieron a 37 °C en un baño de agua durante 10 minutos antes del comienzo y durante el transcurso del experimento. Después de equilibrar plasma en un baño de agua, la cocaína se añadió a una concentración final de 300 µM y se agitó durante 30 segundos. Las muestras de plasma se extrajeron y se pusieron en un tubo de microcentrífuga que contiene el patrón interno y una solución saturada de fluoruro de sodio para evitar un mayor
55 metabolismo de la cocaína. Inmediatamente después de tomar la primera muestra de plasma (cocaína sola), se añadió 0,05 mg/ml de CocE o vehículo de CocE y se agitó. Las muestras de plasma se recogieron a 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 45, 60, y 120 minutos después de la adición de la CocE. Los niveles de cocaína se midieron utilizando cromatografía de líquidos de alto rendimiento en tándem con espectrometría de masas.

60 La cromatografía de líquidos se realizó usando un sistema de HPLC Surveyor (ThermoElectron Corp., Franklin, MA) con una bomba cuaternaria y un inyector automático configurado con un bucle de inyección de 10 µl. La separación se consiguió usando una columna Phenomex C18 de 3 µm de 30 x 4,6 mm con la columna de seguridad correspondiente (Waters Corp., Milford, MA) a una velocidad de flujo de 600 µl/min. El disolvente A consistía en una solución de ácido fórmico al 0,1 %, y el disolvente B era ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (alto grado de pureza;

Burdick y Jackson, Muskegon, MI). Se utilizó un gradiente balístico de 3 minutos con la cocaína y el patrón interno co-eluye a los 2,3 min.

Para la detección y cuantificación por espectrometría de masas, se utilizó un espectrómetro de masas de triple
 5 cuadrupolo Finnigan TSQ Quantum Ultra AM equipado con una fuente de ionización por electropulverización IonMax
 (ThermoElectron Corp., Franklin, MA) en ion positivo, seleccionando el modo de monitorización de reacción. El
 nitrógeno sirve como gas de nebulización y el argón como gas de colisión. Se optimizaron los caudales de gas, los
 voltajes de aerosol, y las energías de colisión. Las curvas de calibración se determinaron para la cocaína con
 10 cocaína deuterada 50 nM (cocaína D₃) como patrón interno en muestras de plasma sin tratar. Las muestras
 desconocidas también se enriquecieron con cocaína D₃. Todas las muestras se evaluaron por triplicado. Las curvas
 de calibración y las muestras desconocidas se analizaron por el programa Quan Browser en su versión 1.4 del
software Xcalibur (ThermoElectron Corp., Franklin, MA). Las curvas de calibración se construyeron utilizando la
 regresión lineal de la relación del área del pico de la cocaína/área del patrón interno en función de la concentración
 del patrón con un factor de ponderación de 1/x. Los valores de ajuste de la curva patrón fueron aceptados a un valor
 15 que es superior a 0,99, y los valores de la RSD para las muestras replicadas se encuentran entre 0-10 %.

Los resultados demuestran que la CocE es capaz de degradar la cocaína muy rápidamente cuando las dos se
 mezclan brevemente en plasma humano (véase, por ejemplo, Figura 4). El primer punto de tiempo indica la
 concentración de cocaína antes de la adición de la cocaína esterasa o el vehículo de esterasa. Antes del tratamiento
 20 de la esterasa, los niveles de cocaína eran similares, pero en menos de un 1 min de la administración de la cocaína
 esterasa, los niveles de cocaína se redujeron al menos 100 veces a aproximadamente 2 µM, en comparación con la
 muestra de plasma tratada con vehículo. Los niveles de cocaína siguieron disminuyendo en las muestras de plasma
 tratadas con esterasa, cayendo por debajo de 1 µM en el punto de tiempo de 2 minutos.

La eficacia terapéutica de la enzima se demuestra por el aumento de la dosis de cocaína requerida para producir
 efectos tóxicos después de una sola inyección intravenosa de la CocE. La enzima de tipo silvestre mostró una
 cinética rápida para la degradación de la cocaína *ex vivo* en suero de rata y humano. Dos mutantes inactivos de la
 CocE no protegieron a las ratas de los efectos tóxicos de la cocaína, lo que confirma que los efectos protectores son
 debidos a la actividad hidrolítica. Además, la CocE no modificó la letalidad de WIN-35065-2, un análogo de la
 30 cocaína que carece del resto éster de benzoilo al que se dirige la CocE. La caracterización *in vivo* y *ex vivo* de la
 CocE respalda el papel de la enzima como antídoto adecuado para la toxicidad en seres humanos.

EJEMPLO 3: CocE MUTANTE TERMOESTABLE PREDICHA

El diseño racional de la CocE mutante descrita en este documento se basa en simulaciones de dinámica molecular
 (DM). Se construyó un modelo computacional de la CocE utilizando la estructura cristalina publicada de la CocE de
 tipo silvestre (véase, por ejemplo, Figura 2). Dichos modelos se pueden utilizar para identificar ciertas modificaciones
 de aminoácidos que aumentan la temperatura de fusión teórica de la proteína sin alterar la estructura en el sitio
 activo. La simulación de DM clásica permite el estudio de la evolución temporal de un sistema de gran tamaño
 40 mediante la adopción de muchos pequeños intervalos de tiempo sucesivos bajo fuerzas atómicas determinadas por
 una serie de funciones con parámetros de interacción (campo de fuerza), incluyendo las interacciones de unión
 (uniones, ángulos y ángulos diedros), interacciones no de unión de van der Waals y basadas en interacciones
 electrostáticas o cargas atómicas netas. Debido a la forma sencilla del campo de fuerza, la simulación de DM se
 puede llevar a cabo durante un tiempo de simulación suficientemente largo para dar propiedades significativas
 45 promediadas del conjunto, incluso para un sistema muy grande en el que participen más de un centenar de miles de
 átomos. Así, para la CocE y cada mutante propuesto, la simulación de DM puede dar lugar a una estructura 3D
 razonable promediada dinámicamente del polipéptido simulado en agua.

Basándose en la estructura cristalina de rayos X (código PDB 1JU3) de la cocaína esterasa bacteriana (CocE)
 50 (Larson et al. (2002) Nature 9, 17), se construyó un modelo 3D completo de la CocE que se une a (-)-cocaína
 adecuado para el modelado computacional de su estabilidad termodinámica. Para aumentar la estabilidad térmica de
 la CocE, se realizó un método de cálculo en el programa RosettaDesign (Kuhlman y Baker (2000) PNAS 97, 10383)
 capaz de predecir mutaciones termoestabilizantes dentro de un plegamiento dado y reducir al mínimo cualquier
 cambio en el esqueleto que pudiera interrumpir estructuralmente la estructura del sitio activo o impedir su flexibilidad.
 55 El método implementado en el programa RosettaDesign utiliza una función de energía para evaluar la idoneidad de
 una secuencia particular para un plegamiento dado y un algoritmo de búsqueda Monte Carlo para el espacio de la
 secuencia de muestreo. Se ha utilizado con éxito un método similar por otros investigadores para aumentar la
 estabilidad térmica de una enzima sin ninguna reducción en la eficacia catalítica (Korkegian et al. (2005), Science
 308, 857). Las cargas atómicas parciales de los átomos de restos no convencionales se calcularon utilizando el
 60 protocolo RESP convencional implementado en el módulo Antechamber del paquete de programas Amber7 (u 8)
 (Case, 2002). El modelado computacional usando el programa RosettaDesign permitió predecir una serie de
 mutaciones CocE calculadas como que tienen una energía más baja y, por lo tanto, el aumento de la estabilidad
 térmica (véase, por ejemplo, Tabla 2). Para este ejemplo, el cálculo solo considera posibles mutaciones en los restos
 de aminoácidos que tienen una distancia de entre 6-25 Å de la molécula de sustrato de la cocaína.

ES 2 574 088 T3

Los polipéptidos de la CocE con una mutación individual identificados que se calcula que estabilizan la CocE en aproximadamente 2,1 a aproximadamente 4,5 kcal/mol incluyen: L163V (SEQ ID NO: 3); V121D (SEQ ID NO: 4); S167A (SEQ ID NO: 5); Q123E (SEQ ID NO: 6); V225I (SEQ ID NO: 7); I218L (SEQ ID NO: 8); A310D (SEQ ID NO: 9); A149S (SEQ ID NO: 10); S159A (SEQ ID NO: 11); S265A (SEQ ID NO: 12); S56G (SEQ ID NO: 13); W220A (SEQ ID NO: 14); T122A (SEQ ID NO: 15); S140A

(SEQ ID NO: 16); F189L (SEQ ID NO: 17); A193D (SEQ ID NO: 18); T254R (SEQ ID NO: 19); N42V (SEQ ID NO: 20); V262L (SEQ ID NO: 21); L508G (SEQ ID NO: 22); Y152H (SEQ ID NO: 23); V160A (SEQ ID NO: 24); T172R (SEQ ID NO: 25); Y532F (SEQ ID NO: 26); T74S (SEQ ID NO: 27); W285T (SEQ ID NO: 28); L146P (SEQ ID NO: 29); D533S (SEQ ID NO: 30); A194R (SEQ ID NO: 31); G173Q (SEQ ID NO: 32); C477T (SEQ ID NO: 33); K531A (SEQ ID NO: 34); R41I (SEQ ID NO: 35); L119A (SEQ ID NO: 36); K46A (SEQ ID NO: 37); y F84Y (SEQ ID NO: 38)

Tabla 2: Resumen del modelado computacional usando el programa RosettaDesign con estrategia de consenso

15

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Mutación consenso	Cambio de energía (kcal/mol)
163	163	163	163	163	163	163	163	163	163	L163V	-4,5
121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	V121D	-3,9
167	167	167	167	167	167	167	167	167	167	S167A	-3,9
123	123	123	123	123	123	123	123	123	123	Q123E	-3,8
225	310	310	225	225	225	225	310	225	218	V225I	-3,6
218	225	218	218	218	218	218	225	218	225	I218L	-3,5
310	218	225	310	310	310	310	218	310	152	A310D	-3,4
149	149	152	149	149	149	149	149	149	310	A149S	-3,3
159	159	140	159	159	159	159	159	159	149	S159A	-3,3
189	265	149	265	265	265	265	265	189	265	S265A	-3,3
265	140	265	56	56	56	56	220	265	159	S56G	-3,2
56	220	159	220	220	220	220	122	56	220	W220A	-3,2
220	122	220	122	122	122	122	140	220	56	T122A	-3,1
122	189	122	140	140	140	140	189	122	122	S140A	-3,1
140	193	189	189	189	189	189	193	140	140	F189L	-3,1
254	42	193	193	193	193	193	42	254	189	A193D	-3,1
262	262	42	254	254	254	254	254	42	193	T254R	-3,1
508	508	262	42	42	42	42	262	262	262	N42V	-3,0
152	152	508	262	262	262	262	508	508	508	V262L	-3,0
160	160	198	508	508	508	508	152	152	198	L508G	-2,9
74	198	160	152	152	152	152	160	160	254	Y152H	-2,9
172	74	74	160	160	160	160	198	198	74	V160A	-2,8
193	172	172	198	198	74	198	74	172	160	T172R	-2,8
532	532	532	532	74	172	74	172	74	172	Y532F	-2,7
146	146	56	74	172	532	172	532	193	532	T74S	-2,7
285	285	285	172	532	146	532	146	532	285	W285T	-2,6
533	290	146	285	146	285	146	285	285	290	L146P	-2,6
173	254	533	146	285	533	285	533	146	146		
194	533	173	533	533	173	533	173	533	533	D533S	-2,5
477	56	194	173	194	194	173	194	173	173	A194R	-2,4
531	173	200	194	200	290	194	200	194	194	G173Q	-2,4
42	194	477	200	290	477	200	290	200	200	C477T	-2,4
119	200	531	290	477	531	477	477	290	477	K531A	-2,4
200	477	305	477	531	200	531	531	477	531		
41	531	41	41	41	41	41	41	531	42	R41I	-2,2
46	41	119	119	119	119	119	119	41	119	L119A	-2,2
84	119	46	46	173	46	46	46	119	41	K46A	-2,1
305	46	84	84	46	84	84	56	46	46	F84Y	-2,1
478	57	158	478	84	478	305	84	84	57		
57	84	307	57	478	57	478	307	478	84		
87	478	478	142	57	87	57	478	57	158		
142	87	57	263	87	142	87	57	142	478		
263	142	142	307	142	263	142	142	263	142		
307	263	263	78	263	307	263	263	307	263		

78	307	78	257	307	78	307	78	78	78		
257	78	257	531	48	257	78	257	257	257		
290	257	290	49	78	49	257	49	49	49		
291	201	49	201	257	305	201	201	201	201		
49	49	201	305	45	291	290	412	305	307		
176	291	291	412	49	176	291	291	412	291		
45	305	412	291	201	45	49	176	291	176		
54	176	176	176	305	54	176	45	45	305		
406	45	254	45	291	406	45	413	176	45		
50	54	45	413	176	50	54	54	413	54		
	406	54	54	54		406	305	54	406		
	50	413	50	406		50	406	406	50		
		406	406	50			50	50			
		50									

EJEMPLO 4: PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA CocE MUTANTE T172R Y S159A

Los polipéptidos de la CocE de tipo silvestre y de la CocE mutante T172R y S159A se sometieron a ensayo para 5 determinar la eficiencia catalítica.

Se realizó mutagénesis dirigida al sitio (QuickChange™, Invitrogen) de la CocE para generar el polipéptido de la CocE mutante S159A (SEQ ID NO: 11). Las técnicas de clonación y de expresión usadas para producir el S159A fueron las mismas que en el Ejemplo 1, excepto que se indique lo contrario. El gen de la CocE se amplificó mediante 10 la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en presencia de cebadores que contienen la mutación específica requerida (Integrated DNA Technologies, Inc.). La mutación específica se volvió a subclonar en el plásmido de expresión y se determinó la secuencia de nucleótidos de estos plásmidos para verificar la presencia de la mutación.

Se generó el mutante T172R mediante PCR de solapamiento usando los cebadores 5' y 3' que contienen la 15 mutación T172R específica, así como un sitio adicional de la enzima de restricción Sac II para facilitar la detección del gen mutado. Los pares de cebadores CocE 20-5'F-Nde I (5' GATATA CATATG GTGGACGGGAATTAC 3') y T172R-3'R (5' CAGACCTCGACGTGATGAGCCCGCGGCCTATGAGAGCTGACCAGC 3'), así como CocE-1800-3'R (5' GTGGTG CTCGAG TCGCTTGATAATCG 3') y T172R-5'F (5' GCTGGTCAGCTCTCATAGG CCGCGGGCTCATCACGTCGAGGTCTG 3') se amplificaron por PCR utilizando la enzima de alta fidelidad Pfu 20 (Stratagene) con una temperatura de hibridación de 55 °C. Los productos resultantes de la PCR se combinaron y se re-amplificaron, generando un gen de la CocE de longitud completa que codifica la mutación T172R. El gen se digirió con Nde I y Xho I, se subclonó en el vector de expresión, y se secuenció en su totalidad para verificar tanto la presencia de la mutación como la ausencia de mutaciones adicionales por error de copia en la PCR.

25 Los plásmidos que contienen las mutaciones se transformaron en células de *E. coli* BL21 y la enzima inducida por IPTG se purificó en Ni-agarosa. Las proteínas expresadas se analizaron para la actividad enzimática y para la estabilidad térmica a 37 °C. La actividad enzimática se midió utilizando el ensayo espectrofotométrico tal como se describe en el Ejemplo 1. También se analizó la estabilidad térmica mediante el ensayo espectrofotométrico por pre-incubación tanto del tipo silvestre como de mutantes a 37 °C durante diversos tiempos. Además, se analizó la 30 naturaleza de la inestabilidad térmica tanto del tipo silvestre como del mutante T172R por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes. En pocas palabras, la enzima mutante y de tipo silvestre en 0,1 mg/ml se incubaron a 37 °C para varios puntos temporales, se enfrió a 4 °C, se mezcló con SDS-colorante de carga que contenía β-mercaptoetanol y se corrió en geles de SDS-PAGE al 10 % (condiciones desnaturalizantes) o se corrió en geles nativos de poliacrilamida al 10 % (condiciones no desnaturalizantes) a 4 °C. 35 Los geles se fijaron con metanol al 10 %, ácido acético al 7 % durante 30 minutos, y a continuación se tñeron con el gel de tinción de proteínas Sypro Ruby (Molecular Probes, Invitrogen) durante 3 horas. La tinción de proteínas se visualizó con luz ultravioleta utilizando un Alphamager™ 3400 (Alpha Innotech). Por último, se determinaron la temperatura de fusión exacta tanto del tipo silvestre como del mutante T172R por dicroísmo circular usando un espectropolarímetro JASCO-810 controlado por un programa de análisis de JASCO V500/FP-750 para Windows. 40 Los espectros de DC se midieron en miligrados y se normalizaron frente a tampón PBS.

Los resultados del ensayo espectrofotométrico demostraron que T172R tenía una mayor $V_{máx}$ y K_m a temperatura ambiente y una $V_{máx}$ y K_m mucho mayor a 37 °C en comparación con la CocE de tipo silvestre (véase, por ejemplo, 45 Tabla 3; Figura 5). De hecho, la $V_{máx}$ y K_m de T172R a 37 °C era comparable a la $V_{máx}$ y K_m de la CocE de tipo silvestre a temperatura ambiente. El mutante de la CocE S159A mostró un ligero incremento de $V_{máx}$ y K_m a 37 °C, pero una menor $V_{máx}$ y K_m a temperatura ambiente, en comparación con la CocE de tipo silvestre. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Figura 6a) indicaba una única banda de proteína de aproximadamente 65.000 Da, tanto para el tipo silvestre como para T172R, independientemente de la temperatura de incubación, lo que indica que la degradación proteolítica no describe adecuadamente el mecanismo para la inestabilidad térmica. Los geles no

desnaturalizantes (Figura 6b) mostraban una sola banda de proteína de la enzima de tipo silvestre antes de la incubación a 37 °C, sin embargo tras la incubación a 37 °C, se ven aparecer especies de mayor peso molecular a medida que se desvanece la banda original. Estos agregados de proteínas putativas también se pueden observar para el mutante T172R, sin embargo, el tiempo de agregación tras la incubación a 37 °C es más largo, y en este procedimiento el mutante T172R tenía aproximadamente una semi-vida 8x más larga a 37 °C que la de tipo silvestre. El análisis de la temperatura de fusión de proteínas por dicroísmo circular (Figura 7) indicaba que se estaban produciendo cambios sensibles a la temperatura en la estructura terciaria de la proteína en el rango del espectro del UV cercano (entre 260 nm y 320 nm). El ajuste de la curva de los cambios sensibles a la temperatura en esta región del espectro indicaba que la CocE de tipo silvestre tiene una temperatura de fusión de 36,15 °C, con desnaturalización detectable a partir de aproximadamente 30 °C. Se determinó que el mutante T172R tenía una temperatura de fusión de 41,43 °C, con desnaturalización detectable que comienza aproximadamente a 28 °C. Así, se determinó que el cambio de un solo aminoácido tirosina por arginina en el aminoácido 172, con un aumento estimado en la estabilidad térmica de 2,8 kcal/mol, tenía un aumento de 5 grados completos de la temperatura de fusión en comparación con la CocE de tipo silvestre.

15

TABLA 3: Parámetros cinéticos para T172R, S159A, y CocE de tipo silvestre.

	S159A	S159A (40 minutos a 37 °C)	T172R	T172R (40 min a 37 °C)	CocE de tipo silvestre	CocE de tipo silvestre (40 min a 37 °C)
V _{máx}	876,6	130,7	1466	1267	1264	94,06
K _m	43,65	15,69	88,20	78,80	71,81	12,30

5 EJEMPLO 5: PREVENCIÓN IN VIVO DE LETALIDAD POR COCAÍNA EN RATAS POR CocE DE TIPO SILVESTRE

Para determinar la actividad esterática *in vivo* de la CocE, se implementó un modelo de roedor de toxicidad aguda por cocaína. Cuando se tratan con altas dosis de cocaína, las ratas primero presentan convulsiones seguido por el cese de la respiración y del movimiento. La dosis tóxica más baja de cocaína, cuando se administra por vía intraperitoneal, producirá mortalidad en menos de 15 minutos desde el tratamiento.

Se determinó la protección contra la letalidad inducida por la cocaína por la CocE de tipo silvestre y se comparó con los efectos protectores de la BChE humana. La actividad esterática de la CocE se estableció mediante la evaluación de la actividad de dos enzimas mutantes, cada una que carece de uno de los tres aminoácidos en el sitio activo. Además, se determinó la actividad de una enzima de tipo silvestre modificada mediante una modificación covalente de Ser17 en el sitio activo, por fluoruro de fenilmetil sulfonato (PMSF). Se demostró que la degradación esterática de la cocaína es el mecanismo de los efectos protectores de la CocE verificando si la enzima protegía contra la toxicidad inducida por WIN 35065-2 (Madras et al. (1989) J Pharmacol Exp Ther 251, 13 -141), un análogo de la cocaína que carece del puente éster en el sitio propuesto de la hidrólisis enzimática.

Se establecieron tres ratas Sprague-Dawley macho (300 gramos) (Harlan Sprague Dawley, Indianápolis, IN) por jaula. Después de la implantación quirúrgica de un catéter yugular, todas las ratas se alojaron individualmente hasta la terminación del experimento. Las ratas se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad, con las luces encendidas a las 7:30 am y con comida y agua disponibles *ad libitum*. Después de que las ratas se anestesiaran con clorhidrato de ketamina (100 mg/kg, ip) y xilazina (10 mg/kg, ip), se implantaron catéteres intravenosos (tubo Micro-renethane, 15 cm, MRE-040, Braintree Scientific Inc., Braintree, MA) en la vena yugular derecha. Se insertaron aproximadamente 3 cm del catéter en la vena; el tubo restante se pasó por vía subcutánea hacia la espalda, donde salía por una incisión realizada entre los omóplatos. El tubo expuesto se tapó con una pieza de 1 cm de acero inoxidable (0,28 de diámetro, Small Parts Inc., Miami, FL). Los catéteres se lavaron diariamente con 0,5 ml de solución salina heparinizada (50 U/ml) para mantener la permeabilidad del catéter. Después de la cirugía, a las ratas se les dio una semana para recuperarse. Cada rata se utilizó para un solo experimento, y todos los grupos experimentales estaban constituidos por 6-8 ratas.

Para determinar la dosis eficaz más baja de la CocE que bloqueaba las convulsiones inducidas por la cocaína y la muerte, se administró 0,1, 0,32, o 1,0 mg de CocE o vehículo (solución salina tamponada con fosfato, PBS) por vía intravenosa un minuto después de 180 mg/kg de cocaína (ip). Para determinar los límites catalíticos de la CocE, se administraron dosis crecientes de cocaína (100, 560, 1000 mg/kg, ip) un minuto antes de 1,0 mg de CocE (iv). Se administraron CocE mutantes y bloqueadas por PMSF (1 mg, iv) un minuto antes de 180 mg/kg de cocaína (ip). La CocE (1,0 mg, iv) también se administró un minuto después de la dosis más baja de WIN-35065-2 (560 mg/kg, ip). La CocE (1,0 mg, iv) se administró antes y después de la cocaína (100 mg/kg, ip) para determinar la semi-vida *in vivo* de la esterasa. A todas las inyecciones intravenosas le siguió una solución salina heparinizada (0,5 ml). Después del tratamiento, las ratas se sometieron a observación para convulsión; y muerte. Se registró el número de episodios convulsivos, la duración de cada episodio, y el tipo de convulsión. La muerte se definió como el cese observado de movimiento y respiración. Se calculó el porcentaje de animales en cada grupo experimental que presenta convulsiones y letalidad. A continuación, se calculó el porcentaje promedio de la desviación típica para cada punto de los datos.

Los resultados mostraron que, en el modelo de toxicidad aguda en roedor, la cocaína indujo convulsiones y muerte en ratas dependiente de la dosis; se observó la muerte en menos de 15 minutos después de la administración en el 100 % de los animales que recibieron 100 mg/kg de cocaína (véase, por ejemplo, Figura 9). La CocE (1,0 mg) infundida después de la administración de cocaína produjo un cambio de diez veces en la curva de efecto de la dosis de toxicidad de la cocaína (véase, por ejemplo, Figura 9), de manera que se requieren 1000 mg/kg de cocaína para superar las propiedades catalíticas de protección de la CocE. Este régimen de tratamiento se asemeja mucho a las situaciones de toxicidad en seres humanos, donde se da el antídoto para la sobredosis de cocaína solo después de que se haya ingerido, inhalado o inyectado.

La CocE de tipo silvestre mostró una eficacia catalítica superior sobre la BChE humana. Administrada un minuto antes de 180 mg/kg de cocaína, 1 mg de CocE ofrecía una protección del 100 % contra la letalidad inducida por la cocaína (véase, por ejemplo, Figura 10), mientras que una dosis equivalente molar de 10 veces de BChE humana

(13 mg) no ofrecía ninguna protección, similar a una dosis diez veces menor de la CocE (0,1 mg) (véase, por ejemplo, Figura 10).

5 Ambas mutaciones de la CocE (Ser117Ala o Tyr44Phe) carecían de actividad *in vivo* y, por lo tanto, no tenía efectos protectores (Figura 11b). Por otra parte, la enzima tratada con PMSF también elimina el efecto protector de la CocE contra la cocaína (Figura 11b). Además, el efecto letal del análogo de la cocaína no hidrolizable, WIN 35065-2, no fue superado por el tratamiento con CocE (Figura 12). Sobre la base de estudios de protección *in vivo* realizados con preparaciones inactivadas catalíticamente de la enzima (mutantes tratados con PMSF y de la CocE inactivos), está claro que los efectos protectores de la enzima se deben a su capacidad de hidrolizar la cocaína. Tomados en conjunto, estos datos cumplen con las evaluaciones *in vitro* de la actividad esterática de las CocE y confirman el mecanismo de protección de la enzima contra la letalidad inducida por la cocaína *in vivo*.

EJEMPLO 6: EFECTOS DE LA CocE DE TIPO SILVESTRE DEPENDIENTES DEL TIEMPO

15 Se examinaron los efectos de la administración de CocE de tipo silvestre antes de la dosis de cocaína. El modelo de toxicidad de rata fue como se describe en el Ejemplo 5. Se administró CocE de tipo silvestre 100, 30, 10, 3, y 1 minuto antes y 1 y 6 minutos después de la administración de cocaína. Se llevaron a cabo extracciones de compuesto a partir de muestras de plasma humano en acetonitrilo al 100 % (volumen 3x), se incubaron durante aproximadamente 15 min, se centrifugó a 13.000 rpm durante 4,5 min, y se recogió el sobrenadante resultante. Los extractos se concentraron en un Speed Vac Savant (ThermoElectron Corp., Franklin, MA) para eliminar el acetonitrilo. Las muestras extraídas se reconstituyeron en agua y se diluyeron 10-1000 veces más.

25 Muestras de plasma humano se enriquecieron con cocaína 300 μ M y se mantuvieron a 37 °C. Se tomó muestras de una parte alícuota de plasma antes de la adición de la cocaína esterasa o del vehículo esterasa, y se recogió otra alícuota 1 min después de la administración de la esterasa. Se mezclaron inmediatamente alícuotas de plasma con el patrón interno (cocaína-D₃) y una solución saturada de fluoruro de sodio para evitar un mayor metabolismo de la cocaína. Se realizaron extracciones de tejidos y se cuantificaron los niveles de cocaína y de patrón interno por HPLC con espectrometría de masas en tándem.

30 Para la inactivación dependiente del tiempo de la CocE *in vitro*, la enzima CocE purificada (a 250 ng/ml) se incubó en tampón de ensayo en ausencia de cocaína a 37 °C durante diversos tiempos. Después de la incubación a 37 °C, las muestras se pusieron en hielo. Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la CocE, las muestras se incubaron con (-)-cocaína a diversas concentraciones tal como se indica a una concentración final de enzima de 125 ng/ml. Se midió la tasa de descomposición de (-)-cocaína a A240 en un lector multiplaca. Los datos se ajustaron a una única descomposición exponencial usando Kaleidagraph™ (*software* Synergy) produciendo un $t_{1/2}$ de 13,2.

Se comprobó que la CocE de tipo silvestre tiene efectos protectores dependientes del tiempo; el 100 % de las ratas se salvaron cuando se tratan con CocE (1 mg) 1 minuto antes de la cocaína, mientras que solo el 66 % y el 32 % de las ratas sobrevivieron cuando se trataron con CocE 30 y 1 minuto antes de la cocaína, respectivamente (véase, por ejemplo, Figura 14). Los efectos protectores de la CocE fueron eliminados cuando las ratas se trataron 100 minutos antes de la cocaína. Este efecto dependiente del tiempo se debe muy probablemente a la desactivación térmica de la enzima *in vivo*. En el plasma de rata, se comprobó que la CocE tenía una semi-vida muy corta (unos 10 minutos, Figura 13), muy probablemente debido a la sensibilidad a los cambios en el pH y la temperatura. Además, los datos preliminares *in vitro* con la enzima purificada sugieren que la CocE sufre una inactivación dependiente de la temperatura con un $t_{1/2}$ de aproximadamente 15 min a 37 °C.

50 Teniendo en cuenta estos datos, se puede estimar que un 1 mg de dosis de la CocE administrada 30 minutos antes de la cocaína, se descompondrá aproximadamente 3 semi-vidas, dejando 0,25 mg de la enzima de tipo silvestre en la circulación general cuando se administra cocaína.

Estudios previos han sugerido que las concentraciones sanguíneas letales de cocaína en rata varían entre 50-128 μ M (Mets B y Virag L (1995) *Anesth Analg* 81, 1033-1038; Mets et al. (1999) *Life Sci* 65, 1317-1328), y los niveles plasmáticos máximos de cocaína se producen aproximadamente 13 minutos después de una inyección intraperitoneal (Sun et al. (2002) *J Pharmacol Exp Ther* 302, 710-716). Basado en la cinética notificada de la administración de cocaína por vía intraperitoneal (Sun et al. (2002) *J Pharmacol Exp Ther* 302, 710-716), se estima que 100 y 320 mg/kg de cocaína producen un pico de concentración en sangre de cocaína de 35 μ M y 113 μ M, respectivamente. Las concentraciones letales de cocaína son de una magnitud similar en seres humanos (20-200 μ M) (Finkle BS y McCloskey KL (1978) *J Forensic Sci* 23, 173-189; Wetli y Wright (1979) *J Am Med Assoc* 241, 2519-2522). Puesto que 1 mg de CocE de tipo silvestre salvó a ratas tratadas con estas dosis de cocaína (Figura 9), se puede predecir razonadamente que la enzima protegería contra la toxicidad por cocaína en seres humanos. Además, los niveles de cocaína medidos usando una cromatografía líquida de alto rendimiento en tándem con espectrometría de masas en plasma humano enriquecido con 300 μ M de cocaína, una concentración que excede los niveles tóxicos notificados de la cocaína, y después tratado con CocE (un equivalente molar de nuestra dosis de 1,0

mg *in vivo*), redujeron la concentración de cocaína a aproximadamente 2 μ M en menos de un minuto (Figura 10).

La protección contra una dosis DL50 de la cocaína en ratas requiere un tratamiento de 10 mg/kg de BChE (Lynch et al. (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 145, 363-371), suponiendo que la enzima se distribuye de manera similar en el ser humano, un individuo de 70 kg requeriría una dosis de 700 mg de BChE exógena para proteger contra una sobredosis. Además, no hay evidencias de que la BChE pueda actuar para revertir la toxicidad de la cocaína cuando se administra después de la cocaína, una característica necesaria de un antídoto para la toxicidad de la cocaína.

Por tanto, se demostró que una dosis de 1 mg de CocE de tipo silvestre en una rata de 300 gramos es suficiente para proteger contra una dosis de cocaína que excede la DL100 (Figura 9). Además, la enzima administrada, antes, y más importante, hasta 6 minutos después de la dosis DL100 de la cocaína, proporcionaba protección contra la toxicidad (Figura 14). La CocE metaboliza concentraciones de cocaína en suero de 150 veces en menos de un minuto (Figura 15).

Teniendo en cuenta estos datos, se prevé que unos 250 mg de CocE administrados a un ser humano de 70 kg después de la ingestión tóxica de cocaína rescatarían al individuo de una muerte segura. Lo anterior demuestra que la CocE de tipo silvestre es una molécula eficiente contra la cocaína, pero que el corto tiempo de actividad de la enzima en condiciones fisiológicas limita su valor terapéutico. Dichos resultados apuntan a la importancia de prolongar la estabilidad térmica de la CocE de tipo silvestre.

EJEMPLO 7: PREVENCIÓN IN VIVO DE LETALIDAD POR COCAÍNA EN RATAS POR CocE T172R MUTANTE

La actividad hidrolítica de la CocE de tipo silvestre y la CocE mutante T172R se caracterizó y se confirmó *in vivo* mediante la evaluación de su capacidad para prevenir la letalidad inducida por cocaína en ratas.

El tratamiento de los animales fue como se describe en el Ejemplo 5. Se administraron dosis crecientes de cocaína (ip) a ratas, y un minuto después se administró por vía intravenosa CocE de tipo silvestre (0,32 mg), CocE mutante T172R (0,32 mg), o vehículo. A todas las inyecciones intravenosas le siguió un lavado heparinizado (0,5 ml). Después del tratamiento, las ratas se sometieron a observación para muerte. Se registró el tiempo hasta la muerte para la dosificación de cocaína de 1 g/kg. Se administró CocE de tipo silvestre y T172R (0,32 mg) en varios momentos anteriores (1, 10, 30, y 60 minutos) a la administración ip de 320 mg/kg de cocaína, y a continuación las ratas se controlan para su muerte.

Los resultados demuestran la capacidad de la CocE intravenosa y, sobre todo, de la CocE mutante para revertir o prevenir los efectos letales producidos por la cocaína. La CocE de tipo silvestre administrada un minuto después de la administración de cocaína impedía la letalidad a dosis de cocaína que mataban a las ratas de control y no se produjo el 100 % de letalidad hasta dosis de cocaína de 1 g/kg (véase, por ejemplo, Figura 16). Las ratas tratadas con CocE mutante T172R eran capaces de tolerar dosis aún más altas, con 1 g/kg de cocaína que da lugar a solo aproximadamente el 70 % de letalidad. Y los efectos profilácticos de la CocE mutante T172R fueron más duraderos que para la CocE de tipo silvestre (véase, por ejemplo, Figura 17).

EJEMPLO 8: DOSIS DE CocE REPETIDAS IN VIVO EN RATONES

Se realizaron estudios adicionales sobre el efecto de la CocE sobre la toxicidad en ratón, en particular con respecto a las dosis repetidas.

El modelo de toxicidad animal era similar al descrito anteriormente, excepto lo que se describe. Se usaron ratones NIH Swiss macho. Para la inyección intravenosa de la cola, los ratones se colocan en una pequeña cámara de contención que expone su cola. Se coloca una lámpara de calor con una bombilla de infrarrojos de 250 W aproximadamente a 4 pulgadas de la cola, y se deja durante un par de minutos. A continuación la cola se limpia con un paño con alcohol y se inserta una aguja de deslizamiento de precisión 30G 1/2 (Fisher Scientific) en una de las venas laterales para la infusión. Para verificar si la aguja está en la vena se infunde una pequeña cantidad de fármaco, si se encuentra en la ubicación correcta la solución se debe infundir fácilmente sin ninguna indicación de una ubicación subcutánea incorrecta, que parece blanca en el sitio de inyección. Para la cateterización intravenosa, ratones machos NIH Swiss se anestesian con ketamina a 100 mg/kg y xilazina a 10 mg/kg coadministradas ip. Cuando los ratones dejan de responder a la presión de la pata, se afeita y se prepara el cuello alternando con toallitas de Betadine y alcohol. En condiciones limpias, se realiza una incisión en la parte transversal derecha del cuello y se aísla la vena yugular externa. Se inserta un catéter en la vena con la ayuda de un microscopio de disección al nivel de la aurícula derecha, y se fija a la vena con suturas de nailon 4-0 y adhesivo tisular, 3M Vetbond (3M Animal Care Products, St. Paul, MN). Los catéteres son de una longitud corta de tubo Tygon con un diámetro interno de 0,010 pulgadas y un diámetro externo de 0,030 pulgadas (Small Parts, Inc., Miami Lakes, FL). Se realiza una pequeña incisión en mitad de la espalda del animal, y se inserta un trocar por vía subcutánea a la salida en el lugar de la incisión ventral. El catéter se extrae posteriormente a través del trocar y se saca por el lomo del animal en donde se mantiene en su sitio con material de sutura de nailon y el adhesivo tisular. Se inserta un pequeño trozo de

alambre de acero con un diámetro de 0,011 pulgadas (Small Parts, Inc., Miami Lakes, FL) en el extremo del catéter. La incisión ventral se cierra con materiales de sutura Vicryl 4-0 y el ratón se coloca bajo una lámpara de calor para su recuperación. Aproximadamente una hora después, el ratón se devuelve a su jaula.

- 5 A los ratones que sobrevivieron a una primera administración de la combinación de 0,32 mg de CocE y 320 mg/kg de cocaína se les administró de nuevo esta combinación 14 días después de la administración inicial. Todos los ratones sobrevivieron a esta segunda administración. Todos los ratones sobrevivieron también a una tercera administración 21 días después de la primera combinación de dosis. La eficacia de la administración repetida sugiere que en esta preparación no se forma una respuesta inmunitaria fuerte a la CocE, tal vez debido a su rápida
10 eliminación.

Los resultados mostraban que se producía un cambio drástico hacia la derecha en la potencia de la cocaína para producir la muerte tanto para 0,32 como para 1,0 mg/kg de cocaína (véase, por ejemplo, Figura 18). La latencia de la muerte se amplió notablemente por la CocE: después de 180 mg/kg de cocaína ip, los ratones normalmente
15 morían en unos 3 minutos. Después de una dosis de 1,0 cocaína g/kg más 1,0 mg de CocE, la muerte se produjo de media a los 28 minutos. Los datos también se examinaron por la capacidad de la hBChE para bloquear la toxicidad de la cocaína. A una dosis de 1 mg, la hBChE produjo un ligero aumento de la dosis de cocaína necesaria para matar a los ratones (véase, por ejemplo, Figura 18). Esta enzima es notablemente menos eficaz que la CocE. Aunque eran necesarias dosis más grandes de cocaína para matar a los ratones después de la administración de
20 hBChE, el tiempo hasta la muerte no se modificó con esta enzima.

EJEMPLO 9: SEMI-VIDA IN VIVO Y PRUEBAS DE BIODISTRIBUCIÓN

La semi-vida *in vivo* y la biodistribución de los polipéptidos de la CocE mutante se examinan en ratones BALB/c. En resumen, los restos de tirosina de la CocE mutante se marcaron con ¹²⁵I utilizando el método bien establecido de
25 yodación con cloramina-T (Hunter, WM y Greenwood, FC (1962), Nature 194, 495-496). Los ratones Balb/c se inyectan a través de sus venas de la cola con 0,1 ml de 0,5 µCi de la CocE mutante marcada con ¹²⁵I o conjugados de la CocE mutante-PEG. Cada grupo experimental consta de 24 ratones. Tres ratones se sacrificaron por dislocación cervical a intervalos de 15, 30, 90 minutos, 3, 12, 24, 48, y 72 horas de tiempo después de la inyección
30 de los fármacos. Se recogen muestras de sangre, así como muestras de tejido de hígado, pulmón, corazón, riñón, y el bazo, se pesan y se mide la radiactividad usando un contador gamma. Las muestras de sangre también se centrifugan, y los sobrenadantes se recogieron y se sometieron a recuento para la estimación de los radiomarcadores asociados a plasma. La relación del pico al del patrón interno se utiliza como parámetro de ensayo. Los parámetros farmacocinéticos se calculan utilizando el programa informático no lineal por mínimos cuadrados
35 KINFIT (Kaltenbach, ML y Vistelle, R (1994) Anticancer Research 14, 2375-2377) ajustando los datos de radiactividad en plasma a una ecuación biexponencial (Gibaldi, M. y Perrier, D. (1982) Pharmacokinetics):

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

40 En la que A(t) = % ID/ml de plasma e ID = dosis inyectada. k₂ se utiliza para calcular el tiempo de eliminación de primer orden t_{1/2}. El área bajo la curva (AUC) de la curva de concentración plasmática-tiempo, el volumen de distribución en equilibrio (V_{ss}), el aclaramiento plasmático total (Cl), y el tiempo medio de residencia (MRT) se calculan a partir de A₁, A₂, k₁, k₂, y el peso corporal (kg) del ratón como se describe por Gibaldi y Perrier, 1982. La permeabilidad de los órganos-área específica (PS) del producto se calcula como:

45

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

En la que C_{p(60min)} es la concentración plasmática terminal (dpm/µl) a los 60 min después de la inyección, V_d es el volumen de distribución tisular determinado a partir de la relación de desintegraciones por minuto por gramo de
50 tejido a C_{p(60min)}, y V_o es el volumen de plasma en órganos. La administración de las muestras en los órganos se determina como:

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

55 En la que % ID/g es el porcentaje de dosis inyectada absorbido por gramo de órgano.

EJEMPLO 10: INMUNOLOGÍA

La CocE se puede utilizar en adyuvante incompleto de Freund (IFA) para inmunizar ratones (véase la Tabla 4). Se creó un ELISA directo específico para anticuerpos CocE por un protocolo convencional. La CocE se utilizó (1 µg/ml)
60 para recubrir una placa de microtitulación de 96 pocillos usando una solución salina tamponada de borato (NaCl 1,5

M, H₃BO₃ 0,5 M, NaOH 1,0 M) para resuspender la cocaína esterasa (50 µl/pocillo). Las placas de recubrimiento se dejaron durante la noche a 4 °C. El tampón de recubrimiento se retiró la mañana siguiente, y las placas se bloquearon con el 2 % de suero de cabra normal en PBS durante 1 h a 37 °C y se lavaron 3 veces. El suero de los diferentes grupos de ratones se diluyó en serie en 50 µl de PBS en los pocillos en un intervalo de 10² a 10⁷ y se corrieron por duplicado. Las placas se cubrieron y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces y se diluyeron 50 µl/pocillo de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón marcado con peroxidasa a 1:400. A continuación, las placas se lavaron 3 veces y se añadió a cada pocillo 100 µl de la solución de sustrato de peroxidasa (OPD disuelto en tampón de fosfato citrato). Después de una incubación de 5 a 10 minutos (en base al desarrollo de color en los controles positivos) la reacción se detuvo usando H₂SO₄ 3 M (50 µl/pocillo). Las placas se leyeron a 490 nm y se determinó el título por la mayor dilución que mostraba incrementos con la absorbancia de fondo. Los controles positivos se obtuvieron mediante la inmunización de ratones Balb/c con 100 µg en 100 µl de cocaína esterasa emulsionada en adyuvante incompleto de Freund (IPA) por inyección intraperitoneal (IP). En el grupo Positivo 1 el suero se aisló a partir de ratones inmunizados 2 semanas. En el grupo Positivo 2 ratones inmunizados se reforzaron con 100 µg en 100 µl por inyección ip 2 semanas después de la inmunización primaria y el suero se recogió después de una semana más (3 semanas después de la inmunización primaria).

Se obtuvieron títulos elevados de los dos grupos de control positivo inmunizados con CocE, 10⁵ y 10⁶, respectivamente. Los títulos de anticuerpos de los animales que recibieron CocE iv durante exposiciones a cocaína demostraron títulos detectables, pero relativamente bajos en comparación con los animales de control positivo inmunizados por CocE más IFA. El suero recogido de animales inmunizados una vez con CocE/IFA demostró títulos elevados de 10⁵, mientras que el suero de los animales que recibieron un refuerzo adicional tenían un título más alto de 10⁸ (3 ratones/grupo). El suero recogido de estos animales servirá como controles positivos para todos los experimentos de titulación posteriores.

TABLA 4: Títulos de la CocE de ratones inmunizados

Grupo	Protocolo	Título (dilución log10 +/- SE)
Positivo 1 (n = 3) 2 semanas	Inmunizado (IFA/IP)	5
Positivo 2 (n = 3) 3 semanas	Inmunizado/refuerzo (IFA/IP)	6
Expuestos y tratados (3x)	CocE administrada con la cocaína	3,33 +/- 0,333
Expuestos y tratados (4x)	CocE administrada con la cocaína	3,5 +/- 0,5

EJEMPLO 11: PEGILACIÓN DE CocE

La conjugación de uno a dos polímeros de PEG por molécula de enzima generalmente es suficiente para producir los efectos protectores deseados (Avramis et al. (2002) Blood 99, 1986-1994). Debido a que se informa que cada molécula de la CocE de tipo silvestre contiene 8 restos de lisina, con ninguno en el sitio activo, pero solo 2 que están cerca del sitio activo (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307), es poco probable que la selección de la lisina para la pegilación inactive la enzima. La CocE mutante se mezcla con diversos polímeros de monometoxi-PEG (m-PEG) (peso molecular que oscila de 3 a 12 kDa); todos contienen un grupo éster hidroxisuccinilo funcional N-terminal activado (mPEG-NHS; de Shear Water Inc., Birmingham, AL). Se intentará por primera vez con el PEG con un peso molecular de 5,5 kDa, ya que los resultados de los inventores y los de otros investigadores (véase por ejemplo, Veronese, FM y Harris, JM (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 453-456; Avramis y col. (2002) Blood 99, 1986-1994) demostraron que este peso molecular produce una protección beneficiosa. Se analizan diferentes relaciones molares de [NH₂]:[mPEG] (el primero que se calcula en base a los moles totales de restos de lisina de la CocE mutante) que oscilan de 1:2 a 1:10 para obtener condiciones óptimas. La conjugación prosigue durante unos 40 minutos a 4 °C con agitación suave. A continuación los productos de reacción se purifican por ultrafiltración (MWCO 10.000) a 4 °C. Las actividades de los productos de la CocE mutante pegilada se determinan midiendo las velocidades iniciales de hidrólisis de cocaína utilizando el procedimiento previamente establecido (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307). Además, se realiza la espectrofotometría de masas MALDI-TOF sobre estos productos para analizar el grado de pegilación y su peso molecular. Los productos pegilados se almacenaron a -40 °C y se descongelaron inmediatamente antes de su uso.

Se llevan a cabo caracterizaciones convencionales, incluyendo la determinación del pH, temperatura, fuerza iónica, así como los parámetros cinéticos óptimos (por ejemplo, Km, Vm), de los conjugados de la CocE mutante-PEG en PBS. Además, se examinó la estabilidad térmica de los productos pegilados y su estabilidad frente a la degradación proteolítica en presencia de plasma o sangre humana. Se llevan a cabo pruebas funcionales *in vivo* de los productos de la CocE mutante-PEG como se ha descrito anteriormente. Se realizan la semi-vida *in vivo* y la biodistribución de los conjugados de la CocE mutante-PEG, en comparación con la CocE libre como se ha descrito anteriormente (véase Ejemplo 9).

Se realiza el análisis estadístico sobre los resultados obtenidos de los experimentos de pegilación. Se llevan a cabo

ANOVA de dos vías de bloques al azar con post-test de Dennett sobre una serie de datos con dos variables utilizando GraphPad (San Diego, CA) Prism para Windows y GraphPad Software. Se lleva a cabo la prueba t pareada para los experimentos con dos condiciones.

- 5 También se puede realizar la conjugación de la CocE mutante a PEG ramificado de alto peso molecular (por ejemplo, hasta 60 KDa) (véase, por ejemplo, Reddy et al. (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 571-586).

Además, el sitio de PEGilación específico puede ser una alternativa viable para reducir la heterogeneidad funcional y estructural. La eliminación de los restos de cisteína cerca del sitio activo o la incorporación de restos de cisteína sobre la superficie de la proteína puede servir como los mejores sustratos de PEGilación (a través del acoplamiento de maleimida). Del mismo modo, se puede emplear el acoplamiento de la amina de PEG a CocE, por ejemplo, mediante la sustitución conservadora de restos de arginina para cualquier CocE mutante (nueve lisinas en total en la CocE de tipo silvestre, siete de las cuales son lisinas superficiales).

15 Los resultados preliminares han demostrado que la CocE de tipo silvestre (WT) estaba unida con éxito a polímeros de monometoxi-PEG (m-PEG) (PM: 5,5 KDa) que contienen un grupo funcional activado de succinimidilo en un extremo, utilizando los procedimientos descritos anteriormente. Se recuperó un alto rendimiento de la actividad CocE inicial (> 70 %) después de la reacción de pegilación. Los espectros de masas MALDI-TOF revelaron cuatro picos principales de los productos PEG-CocE, lo que indica la presencia de una mezcla heterogénea de los conjugados que contienen diferentes números de cadenas de PEG (que oscilan de 1 a 4, respectivamente) (véase, por ejemplo, Figura 19). En la bibliografía se ha sugerido que la conjugación de apenas 1-2 cadenas de PEG por molécula de proteína sería capaz de producir efectos protectores inducidos por PEG (Veronese, FM y Harris, JM (2002b) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 457-606; Avramis et al. (2002) *Blood* 99, 1986-1994). A este respecto, el método de pegilación empleado en este documento aparentemente satisface dicho requisito.

25 **EJEMPLO 12: ENCAPSULACIÓN EN GLÓBULOS ROJOS**

La encapsulación en glóbulos rojos de la CocE se puede conseguir a través de un péptido PTD unido. El PBPM se selecciona como péptido PTD para transportar CocE mutante hacia los glóbulos rojos, debido a su potencia en la translocación de proteínas a través de la membrana celular (Park et al. (2005) *FASEB Journal*, en prensa) y su falta de toxicidad (Chang et al. (2001) *AAPS Journal* 3, artículo #17, #18 y #19). Para asegurar que la CocE mutante encapsulada se integre de forma permanente en los glóbulos rojos, la unión entre la CocE y la PBPM se puede degradar automática y rápidamente una vez que los conjugados de la CocE mutante-PBPM entran en los glóbulos rojos. Un enlazador tal como un enlace disulfuro (S-S) que se degrada rápidamente en el interior de los glóbulos rojos debido a la presencia de glutatión citosólica elevada y actividad reductasa (Trouet et al. (1982)), asegura que la CocE permanezca en los glóbulos rojos.

Para producir conjugados de la CocE mutante-PBPM unidos con enlaces S-S, el grupo amina en el extremo N-final de la PBPM (este es el único grupo -NH₂ en la PBPM) se activa primero con SPDP, y la PBPM activada a continuación se mezcla con CocE mutante en presencia de ditioneitol (DTT) para permitir la formación del enlace S-S con uno de los (cuatro en el tipo silvestre) restos de cisteína libre en la CocE mutante (Turner et al. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307); de acuerdo con un procedimiento modificado desarrollado previamente (Liang et al. (2000) *AAPS Pharmaceutical Science* 2, Artículo 7). La CocE es estable cuando se almacena en DTT (Turner et al. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307), lo que sugiere que el uso de estos grupos de cisteína libres para la conjugación no es probable que perjudique a la actividad catalítica de esta enzima (la mutación ya realizada de cada cisteína en la CocE de tipo silvestre a una serina dio lugar a la ausencia de disminución de la actividad). Los productos finales PBPM-CocE a continuación se purifican a través de una columna de heparina, y se almacena por liofilización.

50 La encapsulación se consigue mediante la incubación de glóbulos rojos con el CocE mutante-PBPM durante 30-60 minutos. Debido a que la entrada de células mediada por PTD es independiente de la temperatura (Schwarze et al. (1999) *Science* 285, 1569-1572), la encapsulación se realiza a 4 °C para preservar al máximo la funcionalidad de los glóbulos rojos. El proceso y el grado de atrapamiento de la CocE mutante en los glóbulos rojos se controlan por microscopía confocal y análisis de citometría de flujo utilizando CocE mutante marcada con FITC. La morfología de la CocE mutante atrapada en los glóbulos rojos también se examina por SEM.

Se lleva a cabo la evaluación en tampón o en plasma, que incluye la caracterización básica de la funcionalidad tanto de los glóbulos rojos (por ejemplo, la actividad de transferencia de oxígeno) como de la CocE mutante (por ejemplo, la actividad hidrolizante de la cocaína, propiedades cinéticas tales como la Km, Vm, etc.), la fuga de la CocE mutante de los glóbulos rojos (es decir, incubar glóbulos rojos cargados con CocE mutante en tampón y a continuación medir la actividad enzimática en el sobrenadante), y la estabilidad de la CocE mutante atrapada contra la degradación proteolítica. Los resultados obtenidos para la CocE mutante encapsulada en los glóbulos rojos se comparan con los obtenidos para la enzima libre. Se llevan a cabo pruebas funcionales *in vivo* de la CocE mutante encapsulada en glóbulos rojos como se ha descrito anteriormente.

Se utilizan glóbulos rojos humanos (de la Cruz Roja Americana, Detroit, MI) para estudios *in vitro*. Para los estudios animales *in vivo*, incluyendo las pruebas de funcionamiento y los estudios farmacocinéticos, sin embargo, se deben utilizar glóbulos rojos autólogos de la misma especie animal para evitar la incompatibilidad celular y los posibles efectos tóxicos.

La semi-vida ($t_{1/2}$) en circulación de la CocE mutante atrapada en glóbulos rojos se determina mediante la inyección de la CocE mutante marcada con ^{125}I (es decir, antes de su carga en glóbulos rojos) en ratones, de acuerdo con los mismos procedimientos descritos anteriormente. Cada serie de experimentos consta de 24 ratones. Los ratones (3) se sacrifican a intervalos de tiempo de 3, 6, 12, 24 horas y 3, 6, 10, y 15 días. Se recogen muestras de sangre y de tejidos, se pesan, y se mide la radiactividad. Se calculan los parámetros farmacocinéticos incluyendo la $t_{1/2}$ de eliminación, así como la distribución de tejidos utilizando el programa KINFT como se ha descrito anteriormente. Los resultados farmacocinéticos obtenidos para la CocE mutante encapsulada en glóbulos rojos se comparan con los obtenidos para la CocE mutante libre.

Se realiza el análisis estadístico sobre los resultados obtenidos de los experimentos de encapsulación en glóbulos rojos. Se lleva a cabo un ANOVA de dos vías de bloques al azar con post-test de Dennett sobre una serie de datos con dos variables utilizando GraphPad (San Diego, CA) Prism para Windows y GraphPad Software. Se lleva a cabo la prueba t pareada para los experimentos con dos condiciones.

Para examinar si lo sugerido anteriormente podía cumplir con estos dos últimos requisitos, se realizaron estudios preliminares de encapsulación en glóbulos rojos mediada por el PTD usando L-asparaginasa como enzima modelo. La LMWVP, un péptido de PTD desarrollado previamente en el laboratorio del Dr. Yang (Chang et al. (2001) AAPS Journal 3, artículo # 17, # 1 y # 19) con una potente actividad probada de penetración de la membrana (Park et al. (2005) FASEB Journal, en prensa), se unió a la asparaginasa usando un procedimiento similar al descrito anteriormente. Los conjugados de PBPM-ASNasa se incubaron a continuación con glóbulos rojos (recogidos de ratones DBA/2) durante 2 horas a 4 °C. Para su comparación, también se prepararon glóbulos rojos fantasmas que contienen ASNasa encapsulada de acuerdo con los procedimientos previamente establecidos (Updike et al. (1976), Science 193, 681-683). Los resultados preliminares demostraron que la eficiencia de carga del método mediada por PBPM era al menos comparable, si no mejor que, la técnica de ruptura de células basado en ósmosis convencional. Una ventaja importante del método mediado por PTD, sin embargo, es que solo se requiere una sola etapa para el procesamiento, a diferencia de los otros métodos de entrada de células, en los que todos requieren múltiples etapas de carga y de procedimientos de lavado.

La Figura 20 presenta imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) tomadas a partir de muestras de glóbulos rojos normales, glóbulos rojos fantasma cargados con ASNasa, y glóbulos rojos cargados con PBPM-ASNasa. Como se ve, aunque los glóbulos rojos cargados con ASNasa procedentes del método de ruptura osmótica/resellado (es decir, glóbulos rojos fantasma) presentaban un cambio significativo en la forma y la morfología, los glóbulos rojos cargados con PBPM-ASNasa mostraban una forma y una morfología prácticamente indistinguibles (es decir, disco bicóncavo) de las de los glóbulos rojos normales. Estos resultados están de acuerdo con lo señalado por muchos otros investigadores de que la encapsulación celular mediada por PTD no causa ninguna perturbación o alteración significativas de la membrana celular (Dietz, GPH y Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131; Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572; Suzuki et al. (2002) Journal of Biological Chemistry 275, 2437-2443).

A fin de evaluar estos dos sistemas de encapsulación de glóbulos rojos, se llevaron a cabo estudios de aclaramiento preliminares. Se evaluó la semi-vida de la actividad ASNasa en plasma después de la inyección intravenosa de: (1) glóbulos rojos fantasma cargados con ASNasa, y (2) glóbulos rojos cargados con PBPM-ASNasa. Cada grupo de animales estaba constituido por 4 ratones DBA-2, y a cada ratón se le administró 8 unidades de actividad ASNasa cargada. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena de la cola a diferentes intervalos de tiempo, y se midió la cantidad de actividad ASNasa en la sangre completa por nesslerización directa del amoníaco producido (Ho et al. (1970) Journal of Biological Chemistry 245, 3708-15). Los resultados demostraron que había un aumento de casi dos veces en la semi-vida en circulación para los glóbulos rojos encapsulados en PBPM-ASNasa ($t_{1/2}$: 9,2 días) en comparación con la ($t_{1/2}$: 5,9 días) para los glóbulos rojos fantasma (véase, por ejemplo, Figura 21). Aún no se sabe cuál es la diferencia entre la semi-vida de los glóbulos rojos encapsulados y los glóbulos rojos normales sin tratar. No obstante, estos resultados de un aumento de 2 veces de la $t_{1/2}$ sobre los glóbulos rojos fantasma demuestran el mérito de esta estrategia, puesto que como se informa en la bibliografía, incluso utilizando el método de encapsulación en glóbulos rojos fantasma, la actividad ASNasa *in vivo* ya se había prolongado de 26 horas para la ASNasa libre a 29 días para la ASNasa encapsulada en glóbulos rojos fantasma (Kravtsoff et al. (1996) European Journal of Clinical Pharmacology 49, 465-470): un aumento de 10 veces. Por lo tanto, otro aumento de 2 veces de esta $t_{1/2}$ por el método de encapsulación descrito en el presente documento es particularmente eficaz.

Para confirmar que la ASNasa encapsulada en glóbulos rojos todavía podía conservar sus funciones biológicas originales, se examinaron los efectos anti-tumorales tanto por los glóbulos rojos fantasma-ASNasa como por los

glóbulos rojos-ASNasa en ratones que portan tumores. Se cultivaron células de linfoma de ratón L5178Y, y a cada ratón DBA/2 se le inyectaron intraperitonealmente 7×10^5 células de cáncer. Cinco días después de la implantación del tumor, se seleccionaron y se dividieron en tres grupos ratones con pesos corporales similares: (1) Grupo de control al que se le administra solamente solución salina; (2) glóbulos rojos fantasma cargados con ASNasa; y (3) glóbulos rojos cargados con PBPM-ASNasa. Cada grupo estaba formado por 5 ratones, y a cada ratón del experimento se le administró 0,1 ml de los glóbulos rojos encapsulado con los fármacos (o fantasma). Los resultados mostraron que los tiempos medios de supervivencia de los controles no tratados, los grupos tratados con glóbulos rojos fantasma-ASNasa y los grupos tratados con glóbulos rojos PBPM-ASNasa fueron de 10,0, 12,6, y 14,4 días, respectivamente (véase, por ejemplo, Figura 22). Cabe señalar que, aunque el tiempo de supervivencia entre los tres grupos difieren en solo aproximadamente 2 días, los efectos del tratamiento por la ASNasa encapsulada en glóbulos rojos aún fueron muy drásticos; teniendo en cuenta el hecho de que a cada ratón se le administró solo 0,1 ml de la suspensión de glóbulos rojos, que era equivalente a solo el 5 % del volumen total de la sangre del ratón, para el tratamiento anti-tumoral. En general, estos hallazgos con la enzima modelo ASNasa demostraron que la enzima encapsulada en glóbulos rojos todavía era terapéuticamente activa. Se observa que la cocaína es más permeable a través de la membrana de los glóbulos rojos que el sustrato asparaginasa.

Por lo tanto, la utilización de la CocE encapsulada en glóbulos rojos en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la cocaína es una estrategia eficaz porque la cocaína atraviesa fácilmente la membrana de los glóbulos rojos (y de hecho se concentra un poco en los glóbulos rojos) (Javaid et al. (1978) Journal of Chromatography 15, 105-113), la encapsulación mediada por PTD no altera las propiedades físicas y/o químicas de los glóbulos rojos, y la enzima encapsulada en los glóbulos rojos funciona como si estuviera libre.

EJEMPLO 13: ELIMINACIÓN DE LA ENDOTOXINA

La contaminación por endotoxinas de mutantes de la CocE se puede producir de varias maneras. Idealmente, la descontaminación de endotoxinas disminuye la concentración a niveles de menos de 10 UE/mg de proteína. Los métodos de descontaminación incluyen las condiciones alternativas para la cromatografía en columna de intercambio iónico, exclusión por tamaños, polietilenimina (PEI) y cromatografía en columna hidrófoba, ultrafiltración y extracción con detergente. Se utiliza un sistema de detección de endotoxinas (PYROGENT 5000, Cambrex) para determinar el contenido de endotoxinas de las preparaciones. El ensayo se basa en el factor anti-LPS de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL). La sensibilidad del ensayo se encuentra entre 0,01 y 100 UE/ml, bien dentro de los niveles requeridos. El ensayo espectrofotométrico está diseñado en un formato de placa de microtitulación de 96 pocillos. El fraccionamiento de la endotoxina y de la CocE y/o la CocE mutante se puede analizar mediante los siguientes procedimientos tanto para el nivel de endotoxina como para la actividad cocaína esterasa. La actividad cocaína esterasa se mide utilizando un ensayo espectrofotométrico que se aprovecha de la absorción intrínseca de la cocaína a 240 nm. Tras la hidrólisis, los espectros de absorción revelan una drástica reducción en el pico de 240 nm (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307).

Cromatografía de intercambio de aniones: Las condiciones actuales implican el uso de cromatografía líquida rápida (FPLC) en una columna Q-Sepharose a pH 8,0 para la descontaminación de endotoxinas. Las condiciones del tampón (pH) se pueden optimizar para maximizar tanto la adsorción de la CocE y/o CocE mutante como la separación de la endotoxina. Las fracciones eluidas se evalúan por la actividad medida de la CocE o de la actividad de la CocE (ensayo espectroscópico de la hidrólisis de la cocaína, absorción a 240 nm) o la CocE mutante. Los niveles de endotoxina se evalúan usando PYROGENT 5000 (arriba).

Cromatografía de exclusión por tamaños y ultrafiltración: Las endotoxinas pueden existir como formas monoméricas ((PM $\sim 1-2 \times 10^4$) o en forma micelar (PM $\sim 4 \times 10^5$ hasta 1×10^6), dependiendo de las condiciones del tampón. La presencia de detergentes tales como el colato favorece la forma monomérica mientras que los cationes divalentes (por ejemplo, Ca^{2+}) favorecen la forma micelar (Hirayama, C y Sakata, M (2002) Journal of Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Science 781, 419-432). Esta propiedad de la endotoxina se utiliza para separar la forma micelar (es decir, en presencia de cationes divalentes tales como Mg^{2+} o Ca^{2+}) de la CocE y/o CocE mutante por cromatografía de filtración en gel utilizando una resina de columna Sephadex 75 o Sephadex 200 (Pharmacia). La endotoxina micelar no se debe retener en la columna y debe pasar a través del vacío mientras que la CocE y/o CocE mutante debe eluir en forma de proteína monodispersa correspondiente a una proteína de 65 kDa. Del mismo modo, se evaluará la capacidad de las unidades de ultrafiltración para separar las formas micelares de la endotoxina de la CocE y/o CocE mutante. Ahora hay disponibles unidades de ultrafiltración con límites de peso molecular de 3×10^5 a 1×10^6 , bien dentro del intervalo requerido para retener endotoxina micelar pero no la propia CocE.

Cromatografía de polietilenimina: Mitzner et al. (1993) y Morimoto et al. (1985) han usado PEI inmovilizada sobre bolas de celulosa o sobre fibra de celulosa, respectivamente, para eliminar la endotoxina de las preparaciones de BSA. La columna de cromatografía PEI es un intercambiador de aniones muy débil que, de hecho, se puede aprovechar de algunas propiedades hidrófobas de la endotoxina y por lo tanto preferentemente adsorberla. Hay disponibles varias preparaciones de PEI-bolas de sílice en Sigma, dependiendo del tamaño de la bola. Aunque las

bolas a base de sílice se asocian más clásicamente con aplicaciones de HPLC, empaquetaremos columnas para un trabajo a presión más baja y seleccionaremos los tamaños de malla de 200 µm.

Extracción con Triton X-114: Se ha utilizado con éxito la separación de fases con Triton X-114 para separar endotoxinas a partir de albúmina y catalasa (Aida, Y y Pabst, MJ (1990) J Immunological Methods 132, 191-195). Adia y Pabst informan de una disminución de 1000 veces en la concentración de endotoxina después de una sola etapa de extracción con Triton X-114. Se incuban muestras de CocE y CocE mutante con volúmenes iguales de Triton 114 y se dejan incubar primero en hielo y a continuación a 37 °C durante 15 minutos. La fase de Triton X-114 que contiene la endotoxina se elimina por centrifugación. Como se ha indicado anteriormente, se ha demostrado que la CocE es térmicamente muy lábil, pero se puede proteger en cierta medida por la presencia del sustrato, la cocaína. Si la incubación de la CocE con Triton X-114 a 37 °C da como resultado una inactivación significativa de la CocE, la enzima se estabiliza mediante la inclusión de un exceso de sustrato durante la extracción.

EJEMPLO 14: MUTAGÉNESIS DEL ORGANISMO HUÉSPED DE CocE

Existen varias cepas bacterianas que presentan crecimiento sensible a la temperatura sobre subproductos de la cocaína esterasa, incluyendo varias cepas de *Pseudomonas*, y estos organismos se pueden adaptar para el crecimiento sensible a la temperatura sobre cocaína con la adición del gen de la CocE codificado dentro de vectores de plásmidos adecuados. Por ejemplo, el gen de la CocE fue secuenciado originalmente a partir de *Rhodococcus* MB1 subclonando fragmentos de genes en *Rhodococcus erythropolis* CW25, una bacteria que no puede metabolizar la cocaína, pero capaz de crecer sobre los subproductos de la cocaína esterasa, el éster metílico de ecgonina y benzoato (Bresler et al. (2000) Applied Environmental Microbiology 66, 904-908). El gen de la CocE se ha subclonado en los vectores lanzadera PJAK-14 y pMMB67EH (véase, por ejemplo, Ejemplo 1). Estos plásmidos se pueden expresar en cualquier bacteria gram-negativa incluyendo *Pseudomonas*, y, además, el plásmido pMMB67EH permite altos niveles de expresión y facilita la transformación por conjugación bacteriana con el uso del plásmido auxiliar pRK2013. La transformación de cualquiera de los plásmidos en bacterias que presentan crecimiento sensible a la temperatura sobre subproductos de la cocaína esterasa (por ejemplo, cepas de *Pseudomonas*), permite el crecimiento sensible a la temperatura en placas que contienen cocaína como única fuente de carbono. La mutagénesis tanto de la cepa *Rhodococcus* MB1 original como las cepas de *Pseudomonas* que contienen el plásmido CocE se realiza utilizando radiación de luz UV a 260 nm. La exposición se titula de manera que muere el 90-95 % de las células. Las células restantes se recuperan en medios nutrientes durante 1 hora a 26 °C, se recogen y se enriquecen en presencia de cocaína como se ha descrito previamente (Britt, et al. (1992) Journal of Bacteriology 174, 2087-2094). El enriquecimiento se lleva a cabo a 37 °C para seleccionar las variantes termoestables de la CocE. Por último, las células se siembran en placas de agar de medio mínimo con cocaína 10 mM y se incuban a 37 °C. Se cultivan colonias individuales y se analiza la actividad de la CocE a 37 °C. La amplificación por PCR del gen de la CocE se lleva a cabo en mutantes que se ha comprobado que producen CocE activa y soluble a 37 °C, y los productos de amplificación se subclonaron en el plásmido pET-22B (+) para su caracterización adicional. Como prelude a la mutagénesis de la CocE, puede ser necesario mutagenizar las cepas de *Pseudomonas* nativa con el fin de preseleccionar para ausencia de sensibilidad a la temperatura a 37 °C cuando se crece sobre productos de la hidrólisis de la cocaína, y a continuación, demostrar sensibilidad a la temperatura sobre cocaína a 37 °C después de la clonación en CocE.

EJEMPLO 15: MÉTODOS DE SELECCIÓN DE ALTO RENDIMIENTO PARA IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES CocE TERMOESTABLES

Se implementaron varios métodos de selección de alto rendimiento para la identificación de variantes termoestables de la CocE. Debido a que se sabe que la enzima de tipo silvestre presenta inestabilidad térmica a temperaturas superiores a 30 °C, después de la transformación en células de *E. coli* BL21, las colonias se subcultivaron y se indujo la expresión de proteínas a 16 °C. Las proteínas expresadas a continuación se analizaron para la actividad esterasa a temperaturas de 30 °C y superiores. Después de varias rondas de mutagénesis y ensayos a temperaturas crecientes se consiguen mutantes termoestables. Entonces se prepara cada CocE mutante individual, se purifica, y se analiza para la actividad y la estabilidad térmica a 37 °C, como se ha descrito anteriormente (véanse los Ejemplos 1 y 4)

Las colonias bacterianas que contienen polipéptidos mutantes se seleccionan directamente a partir de placas de agar por impresión del filtro de nitrocelulosa de las placas de réplica, seguido de la lisis de las bacterias y la fijación de proteínas. Se consigue la determinación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas controlando la acumulación de ácido benzoico, el subproducto ácido de (-)cocaína. Se coloca una impresión húmeda de nitrocelulosa sobre un papel de filtro seco previamente saturado con una mezcla de cocaína a pH 7,4 sin tampón y un indicador de pH que vira de incoloro a color tras su acidificación, por ejemplo, rojo de metilo. La enzima activa se identifica mediante el cambio de color y las colonias se recogen adecuadamente. Se emplea el método de detección basado en la acidificación a través de la formación de ácido benzoico para la detección de la expresión de células de anticuerpos catalíticos que hidrolizan la cocaína en el grupo éster de benzoílo, el mismo sitio escindido por la CocE. Como alternativa, la detección por impresión de nitrocelulosa se consigue mediante la exposición a derivado de tior

de la cocaína y la posterior detección de los grupos sulfhidrilo a través de un sistema indicador de metales pesados precipitantes (por ejemplo, a base de mercurio).

Las colonias bacterianas que contienen polipéptidos mutantes también se seleccionan mediante subcultivo en medio líquido y análisis directo para la actividad cocaína esterasa utilizando un derivado de tiol de la cocaína y detección utilizando el indicador de tiol colorimétrico, el reactivo de Ellman (véase, por ejemplo, Figura 6). El reactivo de Ellman forma rápidamente un enlace disulfuro con grupos tiol libres y libera un ion tiolato de color que absorbe a 412 nm. Los cultivos incubados durante la noche a 16 °C en presencia de IPTG para inducir la expresión de la proteína (20 µl) se mezclan con un derivado de benzoiltioéster de cocaína 1 mM, y el reactivo de Ellman 500 µM en 100 mM de fosfato de sodio a pH 7,4 a un volumen final de 200 µl. Los resultados (véase, por ejemplo, Figura 6) indican que las células que contienen la enzima de la CocE de tipo silvestre son capaces de escindir el benzoiltioéster a niveles mucho más altos que las células solas.

Finalmente se seleccionan colonias bacterianas que contienen polipéptidos mutantes mediante subcultivo en medio líquido seguido de lisis y aislamiento de polipéptidos mutantes usando un medio de afinidad. Por ejemplo, las células lisadas se lavan a través de placas de filtros de níquel-agarosa que permiten la recogida y posterior elución de proteínas marcadas con 6xHIS (por ejemplo, kit Ni-NTA Superflow 96-Bio-robot (Qiagen)). Como alternativa, las células se lisan dentro de placas de microtitulación recubiertas de níquel que permiten la unión de proteínas de fusión 6xHis y la posterior eliminación de los contaminantes (por ejemplo, placas de quelato inmovilizador de níquel (Nunc) o placas rápidas de quelato de níquel NEN (Perkin Elmer)). De manera similar, las células lisadas se incuban con microbolas recubiertas de níquel (tal como bolas de agarosa magnética Ni-NTA (Qiagen)), seguido de la eliminación subsiguiente de proteínas contaminantes. A continuación la actividad de la proteína aislada de la esterasa se somete a ensayo usando cualquiera de los ensayos mencionados anteriormente (tales como el ensayo de actividad espectrofotométrica (Ejemplos 1 y 4), ensayo de actividad de cocaína tritiada (Ejemplo 1), el ensayo de actividad con indicación por pH del ácido benzoico, los sistemas de detección del derivado de tiol de la cocaína, el uso de aptámeros de cocaína (Stojanovic, M. N., de Prada, P. & Landry, D. W. (2001) J Am Chem Soc 123, 4928-31; Stojanovic, M. N. & Landry, D. W. (2002) J Am Chem Soc 124, 9678-9) controlando los cambios en la fluorescencia tras la degradación de la cocaína, o por el uso de un sustrato de esterasa genérico tal como acetato de 4-nitrofenilo y controlando los cambios colorimétricos a 420 nm como se ha descrito previamente (Halgasova, N. et al. (1994) Biochem J 298 Pt 3, 751-5; O'Conner, CJ & Manuel, RD (1993) J Dairy Sci. 76: 3674-3682).

EJEMPLO 16: ANÁLISIS PRELIMINAR DEL POLIPÉPTIDO MUTANTE N197K

El análisis preliminar del polipéptido mutante N197K (SEQ ID NO: 42) mostraba una buena estabilidad después de 1 hora a 37 °C el día 0. Los valores de $V_{máx}$ y K_m se muestran en la Tabla 5. Una comprobación el día 3 mostraba una estabilidad similar. Los valores de $V_{máx}$ y K_m se muestran en la Tabla 6. Los altos valores de K_m el día 3 se debieron a la reutilización de cocaína vieja. La filtración en gel de las muestras incubadas a 37 °C mostraba la formación de agregados.

40 TABLA 5: Prueba inicial N197K (Día 0)

	N197K (0)	N197K (60)
Ecuación 1		
Valores que mejor se ajustan		
V_{MAX}	2928	2187
KM	34,77	24,24

TABLA 6: Ensayo de repetición de N197K (día 3)

	N197K (0)	N197K (60)
Ecuación 1		
Valores que mejor se ajustan		
V_{MAX}	3357	3085
KM	102,2	113,5

EJEMPLO 17: IDENTIFICACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE LA CocE MUTANTE TÉRMICAMENTE ESTABLES

Se identificaron polipéptidos de la CocE mutante térmicamente estables determinando $t_{1/2}$ de los polipéptidos de la CocE mutante. En pocas palabras, las enzimas se incubaron previamente a 37 °C durante tiempos variables. Las mediciones de actividad se determinaron a temperatura ambiente (25 °C). Enzimas mutantes con $t_{1/2}$ de más de 12 minutos (la $t_{1/2}$ la de la CocE de tipo silvestre) se consideraron térmicamente estables (véase, por ejemplo, Figura 27 y Tabla 7). Como se ha demostrado por la combinación del polipéptido de la CocE mutante T172R/G173Q, en diversas realizaciones, la combinación de dos mutaciones individuales con menor o ninguna estabilidad puede

resultar en una combinación térmicamente estable.

TABLA 7: Polipéptidos de la CocE mutantes térmicamente estables

Mutante	Estabilidad a 37 °C ($t_{1/2}$)
T122A	No
Q123E	No
S159A	No
S140A	No
S167A/W52L	No
T172R	~46 min
V121D	No
L163V	No
F189A	No
F189A/T172R	~40 min (Similar a T172R)
C107S	No
W220A	No
F189L	No
A193D	No
T172R/A193D	~40 min (Similar a T172R)
G173Q	~25 min
T254R	No
N42V	No
T172R/G173Q	~326 min
G171Q/T172R/G 73Q	No
G171A	No
G173A	No
wt-I175-G-D185	No
wt-T176-GG-D185	No
T172R/G173Q-I175-G-D185	
T172R/G173Q-I175-G-GA186	~75 min
T172R/G173Q-T176-GG-D185	~75 min
S 177Q	No
D45R	No
F47R	No
L169K	~274 min
L174R	No
A181K	No
S179R	No
F189K	25 min
V190K	No
A194K	No
R182K	No

5

EJEMPLO 18: PROTECCIÓN FRENTE A LA AGREGACIÓN DE MUTANTES DE LA COCAÍNA ESTERASA TÉRMICAMENTE ESTABLES

La protección frente a la agregación de mutantes de la CocE térmicamente estables se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaños. En pocas palabras, las enzimas se incubaron previamente a 37 °C durante 0 minutos o 60 minutos y se resolvieron mediante cromatografía de exclusión por tamaños. En la Figura 28 se muestran los resultados para la CocE de tipo silvestre, T172R y T172R/G173Q.

EJEMPLO 19: ESPECTROS DE BAJA RADIACIÓN UV

15

Los datos de los espectros de DC de baja radiación UV se obtuvieron utilizando un espectropolarímetro Aviv Spectropolarimeter Mode 400, con la ayuda de Norma Greenfield, UMDNJ, utilizando un soporte 5 de células y concentraciones de proteína de 0,2 mg/ml. Los valores de los datos en bruto obtenidos se dejaron en blanco en el control de PBS, se suavizaron, y se sometieron a desconvolución utilizando el algoritmo CCA según lo descrito por A. Perczel, K. Park, y G.D. Fasman, [Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide. Analytical Biochemistry 203, 83-93 (1992)]. Este algoritmo encuentra el número mínimo de curvas necesarias para reconstruir una serie de datos, y expresa el porcentaje en que contribuye cada curva al conjunto de datos en función de la temperatura.

25 A continuación se presenta un análisis de desconvolución CCA de baja radiación UV de la CocE WT y 4 mutantes,

obtenido en un solo espectro de DC fundido utilizando un soporte de 5 celdas. El experimento se realizó durante un período de 8 horas, de 0 a 80 °C.

Se observó una fusión que depende de la temperatura entre las longitudes de onda analizadas (200-250 nm), y los espectros suavizados para cada mutante se muestran en la Figura 29. La desconvolución mediante el algoritmo CCA indicaba que cada espectro se describe mejor mediante una serie de tres curvas, como se muestra en la Figura 30. Esto sugiere que la fusión de la CocE es un proceso de al menos dos etapas, pasando de una curva original (curva 1) a una etapa de desplegamiento intermedia (curva 2), y finalmente a la proteína completamente desnaturada (curva 3). El % de contribución que desempeña cada temperatura en la descripción de estas tres curvas se muestra en la Figura 31. Se utilizó un análisis de dosis-respuesta para aproximar la temperatura a la que se funde el espectro inicial (1), la formación y fusión del estado intermedio (2), y la acumulación de la proteína completamente fundida (3). Estos números se recogieron y se representan gráficamente en la Figura 32 y se muestran en la Tabla 8.

15 TABLA 8: Puntos de fusión de cada etapa

	# 1 fusión	# 2 formación	# 2 fusión	# 3 formación
-◆- WT	37,04	34,57	50,98	59,86
-■- T172R	39,22	38,11	54,56	56,85
T172R-A193D	38,11	46,47	47,68	58,72
-x- T172R-F189K	38,8	46,81	48,42	57,23
-*- T172R-G173Q	40,62	45,61	46,17	56,61

El mutante T172R-G173Q más termoestable (tal como se determina en otros ensayos) mostraba la temperatura de fusión más alta de la curva original 1 (40 °C frente a 37 °C de tipo silvestre), y la temperatura más baja tanto para la desaparición de la curva 2 intermedia (46 °C frente a 50 °C para el tipo silvestre) como la aparición de la curva 3 totalmente fundida (56 °C frente a 59 °C para el tipo silvestre).

En resumen, parece que todos los mutantes experimentan un proceso de fusión en 2 etapas.

25 EJEMPLO 20: ESTABILIZACIÓN USANDO PRODUCTOS Y INHIBIDORES

La cocaína esterasa (CocE) escinde la cocaína para producir ácido benzoico y éster metílico de ecgonina. En pocas palabras, en general se investigaron sustratos e inhibidores alternativos de la cocaína, así como compuestos capaces de termoestabilizar la enzima, mediante la sustitución de los análogos de amida y tiol en el enlace éster reactivo, o la eliminación del enlace (para los inhibidores), la sustitución de los análogos de benzoilo en lugar del grupo saliente ácido benzoico, y/o la eliminación o la alteración del grupo metil-éster sobre la parte ecgonina de la molécula. Como veremos más adelante, se determinó que algunos sustratos, productos, e inhibidores estabilizaron la desnaturación térmica de la CocE de tipo silvestre, e impedían la agregación inducida térmicamente en la electroforesis en gel.

La cocaína es el sustrato natural de la cocaína esterasa (CocE). La escisión de la cocaína se controló por una caída en la absorbancia a 240 nm. La cocaína (rango mM) impidió la formación inducida a 37 °C de agregados de la CocE de alto peso molecular (concentraciones de enzima de 0,1 mg/ml) (véase, por ejemplo, Figura 33). La cocaína (cantidades µM) estabilizaba la pérdida de actividad inducida a 37 °C (véase, por ejemplo, Figura 34), aunque el mecanismo de esta estabilización es complicado debido a la inhibición del sustrato a concentraciones más altas.

El ácido benzoico es el producto natural de la CocE y un inhibidor débil de la escisión de la CocE del acetato de 4-nitrofenilo (Ki 310 µM). El ácido benzoico impidió la formación inducida a 37 °C de agregados de la CocE de alto peso molecular (concentraciones de enzima 0,1 mg/ml) (véase, por ejemplo, Figura 35). El ácido benzoico (cantidades µM) estabilizaba la pérdida de actividad inducida a 37 °C (véase, por ejemplo, Figura 36), aunque el mecanismo de esta estabilización es complicado debido a la inhibición del sustrato a concentraciones más altas.

La CocE cataliza la escisión del acetato de 4-nitrofenilo (4NPA) a 4-nitrofenol (4NP) y acetato. La reacción de escisión se controló observando la formación de producto a 400 nm. Tanto 4NP como 4NPA (rango mM) impidieron la formación inducida a 37 °C de los agregados de la CocE de alto peso molecular (concentraciones de enzima 0,1 mg/ml).

El ácido fenilborónico es un potente inhibidor de la CocE (Ki 250 nM). El ácido fenilborónico estabilizó la agregación inducida a 37 °C de la CocE con una CE50 de 0,2 µM mediante análisis de densitometría.

Usando lo anterior, se desarrolló un ensayo de selección para detectar moléculas pequeñas que pudieran estabilizar la enzima de manera similar, pero no necesariamente ocupar el sitio activo. Las moléculas identificadas como

moléculas estabilizantes se utilizan para estabilizar las proteínas desveladas en este documento hasta que estén listas para su uso.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Universidad de Columbia Zhan, Guo Chang-Landry, Donald Sunahara, Roger MacDonald, Joanne Narasimhan, Diwa maderas, James Holden Ko, Mei_Chuan Deng, Shi-Xian
- 10 <120> COMPOSICIONES Y TRATAMIENTO CONTRA LA COCAÍNA
- <130> 88800730 a 0003
- <150> 60/819.569
- <151> 2006-07-10
- 15 <160> 47
- <170> Versión PatentIn 3.3
- 20 <210> 1
- <211> 574
- <212> PRT
- <213> Rhodococcus sp. MB1
- 25 <400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

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

ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala

```

ES 2 574 088 T3

130						135						140					
Asp 145	Leu	Tyr	Arg	Ala	Pro 150	Trp	Tyr	Gly	Pro	Gly 155	Gly	Ala	Leu	Ser	Val 160		
Glu	Ala	Leu	Leu	Gly 165	Trp	Ser	Ala	Leu	Ile 170	Gly	Thr	Gly	Leu	Ile 175	Thr		
Ser	Arg	Ser	Asp 180	Ala	Arg	Pro	Glu	Asp 185	Ala	Ala	Asp	Phe	Val 190	Gln	Leu		
Ala	Ala	Ile 195	Leu	Asn	Asp	Val	Ala 200	Gly	Ala	Ala	Ser	Val 205	Thr	Pro	Leu		
Ala	Glu 210	Gln	Pro	Leu	Leu	Gly 215	Arg	Leu	Ile	Pro	Trp 220	Val	Ile	Asp	Gln		
Val 225	Val	Asp	His	Pro	Asp 230	Asn	Asp	Glu	Ser	Trp 235	Gln	Ser	Ile	Ser	Leu 240		
Phe	Glu	Arg	Leu	Gly 245	Gly	Leu	Ala	Thr	Pro 250	Ala	Leu	Ile	Thr	Ala	Gly 255		
Trp	Tyr	Asp	Gly 260	Phe	Val	Gly	Glu	Ser 265	Leu	Arg	Thr	Phe	Val 270	Ala	Val		
Lys	Asp	Asn 275	Ala	Asp	Ala	Arg	Leu 280	Val	Val	Gly	Pro	Trp 285	Ser	His	Ser		
Asn 290	Leu	Thr	Gly	Arg	Asn	Ala 295	Asp	Arg	Lys	Phe	Gly 300	Ile	Ala	Ala	Thr		
Tyr 305	Pro	Ile	Gln	Glu	Ala 310	Thr	Thr	Met	His	Lys 315	Ala	Phe	Phe	Asp	Arg 320		
His	Leu	Arg	Gly	Glu 325	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala 330	Gly	Val	Pro	Lys	Val 335	Arg		
Leu	Phe	Val	Met 340	Gly	Ile	Asp	Glu	Trp 345	Arg	Asp	Glu	Thr	Asp 350	Trp	Pro		
Leu	Pro	Asp 355	Thr	Ala	Tyr	Thr	Pro 360	Phe	Tyr	Leu	Gly	Gly 365	Ser	Gly	Ala		
Ala	Asn 370	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly 375	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr 380	Ser	Ile	Ser	Gly		

ES 2 574 088 T3

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415
 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430
 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445
 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 2

<211> 2692

5 <212> ADN

<213> Rhodococcus sp. MB1

<400> 2

gatccagcga aggtcgggag tgaatggtgg acgggaatta cagtgttgcc tcgaacgtga 60
 tggttccgat gcgtgatggg gtgcgtctgg cggtcgacct gtaccgacca gatgctgatg 120
 gacctgttcc ggtcctgctg gttcgcaacc catacgacaa gttcgacgtg ttcgctggtt 180
 cgacgcagtc gacaaactgg cttgagttcg tgcgtgatgg ctatgccgtg gtcattcaag 240
 10 acacgcgtgg cttgttcgca tcggaagggtg agttcgtccc gcacgttgac gacgaagctg 300

acgccgagga	tacgttgagc	tggattctgg	aacaagcgtg	gtgcgacggc	aatgtgggca	360
tgttcggcgt	ttcgtacttg	ggtgtgaccc	agtggcaggc	cgccgtatcc	ggcgttggtg	420
ggctgaaggc	gatcgcgccg	tccatggcgt	cggcggactt	gtaccgcgcc	ccgtggtacg	480
gccctggtgg	tgcgctttca	gtcgaggcgc	tgttgggctg	gtcagctctc	ataggtactg	540
ggctcatcac	gtcgaggtct	gacgcccggc	ccgaagacgc	agccgacttc	gtccaactcg	600
cagcaattct	caatgacgtc	gctggcgcg	cgtcggtcac	gcccctggcc	gagcaaccgc	660
ttctgggccg	actgattccg	tgggtgatcg	atcaggttgt	cgatcacccc	gacaacgatg	720
aatcatggca	gtccattagc	ttgtttgaac	gactcggcgg	gttggcaaca	ccggccttga	780
tcacggctgg	gtggtacgac	gggttcgctg	gcgaatcgtt	gcgactttc	gttgcggtca	840
aggacaatgc	cgacgcacgt	ttggttgctg	gcccttgagg	tcacagcaac	ctcactggtc	900
ggaatgcgga	ccggaagttc	ggcattgccg	cgacctaccc	gattcaagaa	gccaccacga	960
tgcacaaggc	attcttcgac	cggcacctcc	gcggcgagac	cgatgcactc	gcaggcgctc	1020
ccaaagtgcg	gctgttcgta	atgggcatcg	atgagtggcg	tgacgaaacg	gactggccac	1080
tgccggacac	ggcgtatacg	cccttctatc	ttggaggtag	cggggctgcg	aatacctcca	1140
cgggtggtgg	aacactgtcg	acgtcgattt	ccggaactga	atctgctgac	acctacctgt	1200
atgatccggc	cgatcccgtg	ccttcgctcg	gggggacgct	gctgttcac	aacggagaca	1260
acggacccgc	cgaccaacgt	cccattcatg	accgggacga	cggtgtgtgt	tacagcactg	1320
aggtattgac	cgacccggtg	gaagtaaccg	gcaccgtctc	cgcccggctg	ttcgtgctgt	1380
catcagcgg	ggacactgat	ttcaccgcca	aacttgtcga	cgatattccc	gacggtcgcg	1440
cgatcgcgct	gtgtgacggg	atcgtgcgga	tgcggtaccg	cgagacgttg	gtcaatccaa	1500
ccttgatcga	agcgggcgaa	atctacgagg	ttgctatcga	catgcttgca	acctcgaatg	1560
tattcctgcc	agggcatcgc	atcatggtcc	aagtatcaag	tagcaacttc	ccgaaatacg	1620
accgcaattc	gaataccggc	ggagtaatcg	cacgggaaca	gctcgaagag	atgtgcaccg	1680
ccgtgaaccg	cattcaccga	ggacctgagc	atcccagcca	cattgtgctg	ccgattatca	1740
agcgatagtt	ttcggtgacg	ccgcgcctgg	ctgacgctgc	agctcaaacc	caatggctcg	1800
gcaaccggta	cgcgctcgcc	gccctgcact	ttccaccatg	cgtaggtcgt	cagcggccga	1860
ctgaaggccg	gattgcatcc	cgacccggcg	accctaggtc	aggcgaattg	tccgaatgtc	1920
agcggctcatg	taattcccca	ggttgagcgg	ttcgtcggtc	acgtaattcc	tcaccctgcc	1980
gtcacgtagt	tccccaccct	ggcgtgtcgc	gtcggggtgc	gggtgctgct	gcaggttcgc	2040
cccctcccaa	ggtccacctg	gggaaggggc	ccgacggtgg	caaggagaac	gtggacgatg	2100
accgatctga	cgatgaccga	tctgatggag	ttcttccggc	actggcatgc	cgggcgttcg	2160

ES 2 574 088 T3

caggttcaga tctcaccggc gtttgggatc gaccgcaaaa cctgacttgc acaagttgac 2220
 ggcggtttcc ggactcggct gacatttgcg caagtagaag gccccgcggg ttcgggattt 2280
 ggcgcactaa cgggtcggta aaatctggcg agtggcgggc tacattcgca aggtcaggac 2340
 cgcacgggg gcgaccgcg tgcagatcgc cgtcaagcag ggacgtcgcg acaaggtgcg 2400
 tcgagcacct cggttccgca cacaccgaca gcgagcttgc tgcgctactg caggccgccg 2460
 aggagaagct gcaggtcgga cagtaggaac tcgacctcga cctcggcggg agcggggatc 2520
 gagggtcggg gatcgcggcg aagcgggtccc gctggttgat cgaggcgatc gagaccggat 2580
 gacggcggct cggcttcgac gtgatcgacg acgaggtggt catctaactg gtgatcggca 2640
 ggctcgtcga accgacctg atgagcgaca ccggccggga atcgccgaga tc 2692

<210> 3

<211> 574

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido de la CocE mutante

10

<400> 3

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

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

275					280					285					
Asn	Leu	Thr	Gly	Arg	Asn	Ala	Asp	Arg	Lys	Phe	Gly	Ile	Ala	Ala	Thr
	290					295					300				
Tyr	Pro	Ile	Gln	Glu	Ala	Thr	Thr	Met	His	Lys	Ala	Phe	Phe	Asp	Arg
305					310					315					320
His	Leu	Arg	Gly	Glu	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala	Gly	Val	Pro	Lys	Val	Arg
				325					330					335	
Leu	Phe	Val	Met	Gly	Ile	Asp	Glu	Trp	Arg	Asp	Glu	Thr	Asp	Trp	Pro
			340					345					350		
Leu	Pro	Asp	Thr	Ala	Tyr	Thr	Pro	Phe	Tyr	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala
		355					360					365			
Ala	Asn	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly
	370					375					380				
Thr	Glu	Ser	Ala	Asp	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Pro	Ala	Asp	Pro	Val	Pro
385					390					395					400
Ser	Leu	Gly	Gly	Thr	Leu	Leu	Phe	His	Asn	Gly	Asp	Asn	Gly	Pro	Ala
				405					410					415	
Asp	Gln	Arg	Pro	Ile	His	Asp	Arg	Asp	Asp	Val	Leu	Cys	Tyr	Ser	Thr
			420					425					430		
Glu	Val	Leu	Thr	Asp	Pro	Val	Glu	Val	Thr	Gly	Thr	Val	Ser	Ala	Arg
		435					440					445			
Leu	Phe	Val	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Asp	Thr	Asp	Phe	Thr	Ala	Lys	Leu
	450					455					460				
Val	Asp	Val	Phe	Pro	Asp	Gly	Arg	Ala	Ile	Ala	Leu	Cys	Asp	Gly	Ile
465					470					475					480
Val	Arg	Met	Arg	Tyr	Arg	Glu	Thr	Leu	Val	Asn	Pro	Thr	Leu	Ile	Glu
				485					490					495	
Ala	Gly	Glu	Ile	Tyr	Glu	Val	Ala	Ile	Asp	Met	Leu	Ala	Thr	Ser	Asn
			500					505					510		
Val	Phe	Leu	Pro	Gly	His	Arg	Ile	Met	Val	Gln	Val	Ser	Ser	Ser	Asn
		515					520					525			

ES 2 574 088 T3

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

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

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

<210> 5

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445
 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 6

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 6

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

10

ES 2 574 088 T3

Glu Gly Glu Phe Val₈₅ Pro His Val Asp Asp₉₀ Glu Ala Asp Ala Glu₉₅ Asp
 Thr Leu Ser Trp₁₀₀ Ile Leu Glu Gln Ala₁₀₅ Trp Cys Asp Gly Asn₁₁₀ Val Gly
 Met Phe Gly₁₁₅ Val Ser Tyr Leu Gly₁₂₀ Val Thr Glu Trp Gln₁₂₅ Ala Ala Val
 Ser Gly₁₃₀ Val Gly Gly Leu Lys₁₃₅ Ala Ile Ala Pro Ser₁₄₀ Met Ala Ser Ala
 Asp₁₄₅ Leu Tyr Arg Ala Pro₁₅₀ Trp Tyr Gly Pro Gly₁₅₅ Gly Ala Leu Ser Val₁₆₀
 Glu Ala Leu Leu Gly₁₆₅ Trp Ser Ala Leu Ile₁₇₀ Gly Thr Gly Leu Ile₁₇₅ Thr
 Ser Arg Ser Asp₁₈₀ Ala Arg Pro Glu Asp₁₈₅ Ala Ala Asp Phe Val₁₉₀ Gln Leu
 Ala Ala Ile₁₉₅ Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val₂₀₅ Thr Pro Leu
 Ala Glu Gln Pro Leu Leu Gly₂₁₅ Arg Leu Ile Pro Trp₂₂₀ Val Ile Asp Gln
 Val₂₂₅ Val Asp His Pro Asp₂₃₀ Asn Asp Glu Ser Trp₂₃₅ Gln Ser Ile Ser Leu₂₄₀
 Phe Glu Arg Leu Gly₂₄₅ Gly Leu Ala Thr Pro₂₅₀ Ala Leu Ile Thr Ala₂₅₅ Gly
 Trp Tyr Asp Gly₂₆₀ Phe Val Gly Glu Ser₂₆₅ Leu Arg Thr Phe Val₂₇₀ Ala Val
 Lys Asp Asn₂₇₅ Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp₂₈₅ Ser His Ser
 Asn Leu₂₉₀ Thr Gly Arg Asn Ala₂₉₅ Asp Arg Lys Phe Gly₃₀₀ Ile Ala Ala Thr
 Tyr₃₀₅ Pro Ile Gln Glu Ala₃₁₀ Thr Thr Met His Lys₃₁₅ Ala Phe Phe Asp Arg₃₂₀
 His Leu Arg Gly Glu₃₂₅ Thr Asp Ala Leu Ala₃₃₀ Gly Val Pro Lys Val₃₃₅ Arg

ES 2 574 088 T3

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

<210> 7

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 7

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 9

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

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

- <210> 10
- <211> 574
- 5 <212> PRT
- <213> polipéptido de la CocE mutante
- <400> 10

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445
 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 11

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 11

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

10

ES 2 574 088 T3

Glu Gly Glu Phe Val₈₅ Pro His Val Asp Asp₉₀ Glu Ala Asp Ala Glu₉₅ Asp
 Thr Leu Ser Trp₁₀₀ Ile Leu Glu Gln Ala₁₀₅ Trp Cys Asp Gly Asn₁₁₀ Val Gly
 Met Phe Gly₁₁₅ Val Ser Tyr Leu Gly₁₂₀ Val Thr Gln Trp Gln₁₂₅ Ala Ala Val
 Ser Gly₁₃₀ Val Gly Gly Leu Lys₁₃₅ Ala Ile Ala Pro Ser₁₄₀ Met Ala Ser Ala
 Asp₁₄₅ Leu Tyr Arg Ala Pro₁₅₀ Trp Tyr Gly Pro Gly₁₅₅ Gly Ala Leu Ala Val₁₆₀
 Glu Ala Leu Leu Gly₁₆₅ Trp Ser Ala Leu Ile₁₇₀ Gly Thr Gly Leu Ile₁₇₅ Thr
 Ser Arg Ser Asp₁₈₀ Ala Arg Pro Glu Asp₁₈₅ Ala Ala Asp Phe Val₁₉₀ Gln Leu
 Ala Ala Ile₁₉₅ Leu Asn Asp Val Ala₂₀₀ Gly Ala Ala Ser Val₂₀₅ Thr Pro Leu
 Ala Glu₂₁₀ Gln Pro Leu Leu Gly₂₁₅ Arg Leu Ile Pro Trp₂₂₀ Val Ile Asp Gln
 Val₂₂₅ Val Asp His Pro Asp₂₃₀ Asn Asp Glu Ser Trp₂₃₅ Gln Ser Ile Ser Leu₂₄₀
 Phe Glu Arg Leu Gly₂₄₅ Gly Leu Ala Thr Pro₂₅₀ Ala Leu Ile Thr Ala₂₅₅ Gly
 Trp Tyr Asp Gly₂₆₀ Phe Val Gly Glu Ser₂₆₅ Leu Arg Thr Phe Val₂₇₀ Ala Val
 Lys Asp Asn₂₇₅ Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp₂₈₅ Ser His Ser
 Asn Leu₂₉₀ Thr Gly Arg Asn Ala₂₉₅ Asp Arg Lys Phe Gly₃₀₀ Ile Ala Ala Thr
 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala₃₁₀ Thr Thr Met His Lys₃₁₅ Ala Phe Phe Asp Arg₃₂₀
 His Leu Arg Gly Glu₃₂₅ Thr Asp Ala Leu Ala₃₃₀ Gly Val Pro Lys Val₃₃₅ Arg

ES 2 574 088 T3

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

<210> 12

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 12

ES 2 574 088 T3

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

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

ES 2 574 088 T3

485 490 495

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

ser Gly Val Gly Gly Leu Lys Ala Ile Ala Pro Ser Met Ala Ser Ala

10

ES 2 574 088 T3

130				135				140							
Asp 145	Leu	Tyr	Arg	Ala	Pro 150	Trp	Tyr	Gly	Pro	Gly 155	Gly	Ala	Leu	Ser	Val 160
Glu	Ala	Leu	Leu	Gly 165	Trp	Ser	Ala	Leu	Ile 170	Gly	Thr	Gly	Leu	Ile 175	Thr
Ser	Arg	Ser	Asp 180	Ala	Arg	Pro	Glu	Asp 185	Ala	Ala	Asp	Phe	Val 190	Gln	Leu
Ala	Ala	Ile 195	Leu	Asn	Asp	Val	Ala 200	Gly	Ala	Ala	Ser	Val 205	Thr	Pro	Leu
Ala	Glu 210	Gln	Pro	Leu	Leu	Gly 215	Arg	Leu	Ile	Pro	Trp 220	Val	Ile	Asp	Gln
Val 225	Val	Asp	His	Pro	Asp 230	Asn	Asp	Glu	Ser	Trp 235	Gln	Ser	Ile	Ser	Leu 240
Phe	Glu	Arg	Leu	Gly 245	Gly	Leu	Ala	Thr	Pro 250	Ala	Leu	Ile	Thr	Ala 255	Gly
Trp	Tyr	Asp	Gly 260	Phe	Val	Gly	Glu	Ser 265	Leu	Arg	Thr	Phe	Val 270	Ala	Val
Lys	Asp	Asn 275	Ala	Asp	Ala	Arg	Leu 280	Val	Val	Gly	Pro	Trp 285	Ser	His	Ser
Asn 290	Leu	Thr	Gly	Arg	Asn	Ala 295	Asp	Arg	Lys	Phe	Gly 300	Ile	Ala	Ala	Thr
Tyr 305	Pro	Ile	Gln	Glu	Ala 310	Thr	Thr	Met	His	Lys 315	Ala	Phe	Phe	Asp	Arg 320
His	Leu	Arg	Gly	Glu 325	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala 330	Gly	Val	Pro	Lys	Val 335	Arg
Leu	Phe	Val	Met 340	Gly	Ile	Asp	Glu	Trp 345	Arg	Asp	Glu	Thr	Asp 350	Trp	Pro
Leu	Pro	Asp 355	Thr	Ala	Tyr	Thr	Pro 360	Phe	Tyr	Leu	Gly	Gly 365	Ser	Gly	Ala
Ala	Asn 370	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly 375	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr 380	Ser	Ile	Ser	Gly

ES 2 574 088 T3

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

<210> 14

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 14

Met Val Asp Gly Asn Tyr Ser Val Ala Ser Asn Val Met Val Pro Met
 1 5 10 15
 Arg Asp Gly Val Arg Leu Ala Val Asp Leu Tyr Arg Pro Asp Ala Asp
 20 25 30

10

ES 2 574 088 T3

Gly Pro Val₃₅ Pro Val Leu Leu Val₄₀ Arg Asn Pro Tyr Asp₄₅ Lys Phe Asp
 Val₅₀ Phe Ala Trp Ser Thr Gln₅₅ Ser Thr Asn Trp₆₀ Glu Phe Val Arg
 Asp₆₅ Gly Tyr Ala Val₇₀ Val Ile Gln Asp Thr₇₅ Arg Gly Leu Phe Ala Ser₈₀
 Glu Gly Glu Phe Val₈₅ Pro His Val Asp Asp₉₀ Glu Ala Asp Ala Glu₉₅ Asp
 Thr Leu Ser Trp₁₀₀ Ile Leu Glu Gln Ala₁₀₅ Trp Cys Asp Gly Asn₁₁₀ Val Gly
 Met Phe Gly₁₁₅ Val Ser Tyr Leu Gly₁₂₀ Val Thr Gln Trp Gln₁₂₅ Ala Ala Val
 Ser Gly₁₃₀ Val Gly Gly Leu Lys₁₃₅ Ala Ile Ala Pro Ser₁₄₀ Met Ala Ser Ala
 Asp₁₄₅ Leu Tyr Arg Ala Pro₁₅₀ Trp Tyr Gly Pro Gly₁₅₅ Gly Ala Leu Ser Val₁₆₀
 Glu Ala Leu Leu Gly₁₆₅ Trp Ser Ala Leu Ile₁₇₀ Gly Thr Gly Leu Ile₁₇₅ Thr
 Ser Arg Ser Asp₁₈₀ Ala Arg Pro Glu Asp₁₈₅ Ala Ala Asp Phe Val₁₉₀ Gln Leu
 Ala Ala Ile₁₉₅ Leu Asn Asp Val₂₀₀ Ala Gly Ala Ala Ser Val₂₀₅ Thr Pro Leu
 Ala Glu₂₁₀ Gln Pro Leu Leu Gly₂₁₅ Arg Leu Ile Pro Ala₂₂₀ Val Ile Asp Gln
 Val₂₂₅ Val Asp His Pro Asp₂₃₀ Asn Asp Glu Ser Trp₂₃₅ Gln Ser Ile Ser Leu₂₄₀
 Phe Glu Arg Leu Gly₂₄₅ Gly Leu Ala Thr Pro₂₅₀ Ala Leu Ile Thr Ala Gly
 Trp Tyr Asp Gly₂₆₀ Phe Val Gly Glu Ser₂₆₅ Leu Arg Thr Phe Val₂₇₀ Ala Val
 Lys Asp Asn₂₇₅ Ala Asp Ala Arg Leu₂₈₀ Val Val Gly Pro Trp₂₈₅ Ser His Ser

ES 2 574 088 T3

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300
 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320
 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335
 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350
 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365
 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380
 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415
 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430
 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445
 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 15

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 15

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

5

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg

ES 2 574 088 T3

```

                435                440                445
Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
   450                455                460

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 16

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 16

```

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

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

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

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

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

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

```

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

<210> 17

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 17

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 18

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 18

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

10

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro

ES 2 574 088 T3

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

<210> 19

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 19

Met	Val	Asp	Gly	Asn 5	Tyr	Ser	Val	Ala	Ser 10	Asn	Val	Met	Val	Pro	Met 15
Arg	Asp	Gly	Val 20	Arg	Leu	Ala	Val	Asp 25	Leu	Tyr	Arg	Pro	Asp 30	Ala	Asp
Gly	Pro	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Val	Arg	Asn	Pro	Tyr	Asp	Lys	Phe	Asp

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

Asn Leu Thr Gly Arg Asn Ala Asp Arg Lys Phe Gly Ile Ala Ala Thr
 290 295 300
 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320
 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335
 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350
 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365
 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380
 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415
 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430
 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445
 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 20
 <211> 574
 5 <212> PRT

ES 2 574 088 T3

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 20

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

5

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 574 088 T3

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 21

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 21

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

```

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

```

<210> 22

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 22

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Gly Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 23

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 23

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 24

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

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

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

290					295					300					
Tyr 305	Pro	Ile	Gln	Glu	Ala 310	Thr	Thr	Met	His	Lys 315	Ala	Phe	Phe	Asp	Arg 320
His	Leu	Arg	Gly	Glu 325	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala 330	Gly	Val	Pro	Lys	Val 335	Arg
Leu	Phe	Val	Met 340	Gly	Ile	Asp	Glu	Trp 345	Arg	Asp	Glu	Thr	Asp	Trp 350	Pro
Leu	Pro	Asp 355	Thr	Ala	Tyr	Thr	Pro 360	Phe	Tyr	Leu	Gly	Gly 365	Ser	Gly	Ala
Ala	Asn 370	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly 375	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr 380	Ser	Ile	Ser	Gly
Thr 385	Glu	Ser	Ala	Asp	Thr 390	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Pro 395	Ala	Asp	Pro	Val	Pro 400
Ser	Leu	Gly	Gly	Thr 405	Leu	Leu	Phe	His	Asn 410	Gly	Asp	Asn	Gly	Pro 415	Ala
Asp	Gln	Arg	Pro 420	Ile	His	Asp	Arg	Asp 425	Asp	Val	Leu	Cys	Tyr 430	Ser	Thr
Glu	Val	Leu 435	Thr	Asp	Pro	Val	Glu 440	Val	Thr	Gly	Thr	Val 445	Ser	Ala	Arg
Leu	Phe 450	Val	Ser	Ser	Ser	Ala 455	Val	Asp	Thr	Asp	Phe 460	Thr	Ala	Lys	Leu
Val 465	Asp	Val	Phe	Pro	Asp 470	Gly	Arg	Ala	Ile	Ala 475	Leu	Cys	Asp	Gly	Ile 480
Val	Arg	Met	Arg	Tyr 485	Arg	Glu	Thr	Leu	Val 490	Asn	Pro	Thr	Leu	Ile 495	Glu
Ala	Gly	Glu	Ile 500	Tyr	Glu	Val	Ala	Ile 505	Asp	Met	Leu	Ala	Thr 510	Ser	Asn
Val	Phe	Leu 515	Pro	Gly	His	Arg	Ile 520	Met	Val	Gln	Val	Ser 525	Ser	Ser	Asn
Phe	Pro 530	Lys	Tyr	Asp	Arg	Asn 535	Ser	Asn	Thr	Gly	Gly 540	Val	Ile	Ala	Arg
Glu 545	Gln	Leu	Glu	Glu	Met 550	Cys	Thr	Ala	Val	Asn 555	Arg	Ile	His	Arg	Gly 560
Pro	Glu	His	Pro	Ser 565	His	Ile	Val	Leu	Pro 570	Ile	Ile	Lys	Arg		

<210> 25
 <211> 574
 5 <212> PRT

ES 2 574 088 T3

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 25

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

5

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 574 088 T3

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 26

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 26

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

<210> 27

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 27

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 28

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 28

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 29

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

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

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320
 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335
 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350
 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365
 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380
 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415
 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430
 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445
 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 30
 <211> 574
 5 <212> PRT

ES 2 574 088 T3

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 30

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

5

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 31

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

<210> 32

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 32

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 33

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 33

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560 565

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

<210> 34

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 34

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

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

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320
 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335
 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350
 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365
 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380
 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415
 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430
 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445
 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Ala Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 35
 <211> 574
 5 <212> PRT

ES 2 574 088 T3

<213> R41I

<400> 35

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

5

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu

450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 36

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 36

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

10

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

<210> 37

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 37

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 574 088 T3

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 38

<211> 574

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 38

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

10

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

ES 2 574 088 T3

405 410 415
 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430
 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445
 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg
 565 570

<210> 39

<211> 587

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 39

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

10

ES 2 574 088 T3

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

Tyr Pro Ile Gln Glu Ala Thr Thr Met His Lys Ala Phe Phe Asp Arg
 305 310 315 320
 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg
 325 330 335
 Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
 340 345 350
 Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
 355 360 365
 Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
 370 375 380
 Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
 405 410 415
 Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
 420 425 430
 Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
 435 440 445
 Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
 450 455 460
 Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Lys Leu
 565 570 575
 Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 580 585

<210> 40
 <211> 587
 5 <212> PRT

ES 2 574 088 T3

<213> polipéptidos de la CocE mutante

<400> 40

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

5

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Lys Leu
 565 570 575

Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 580 585

<210> 41

<211> 587

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 41

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

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

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

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

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

10

Glu Gly Glu Phe Val₈₅ Pro His Val Asp Asp₉₀ Glu Ala Asp Ala Glu₉₅ Asp
 Thr Leu Ser Trp₁₀₀ Ile Leu Glu Gln Ala₁₀₅ Trp Cys Asp Gly Asn₁₁₀ Val Gly
 Met Phe Gly₁₁₅ Val Ser Tyr Leu Gly₁₂₀ Val Thr Gln Trp Gln₁₂₅ Ala Ala Val
 Ser Gly₁₃₀ Val Gly Gly Leu Lys₁₃₅ Ala Ile Ala Pro Ser₁₄₀ Met Ala Ser Ala
 Asp₁₄₅ Leu Tyr Arg Ala Pro₁₅₀ Trp Tyr Gly Pro Gly₁₅₅ Gly Ala Leu Ser Val₁₆₀
 Glu Ala Leu Leu Gly₁₆₅ Trp Ser Ala Leu Ile₁₇₀ Gly Arg Gly Leu Ile₁₇₅ Thr
 Ser Arg Ser Asp₁₈₀ Ala Arg Pro Glu Asp₁₈₅ Ala Ala Asp Ala Val₁₉₀ Gln Leu
 Ala Ala Ile₁₉₅ Leu Asn Asp Val Ala Gly Ala Ala Ser Val₂₀₅ Thr Pro Leu
 Ala Glu₂₁₀ Gln Pro Leu Leu Gly₂₁₅ Arg Leu Ile Pro Trp₂₂₀ Val Ile Asp Gln
 Val₂₂₅ Val Asp His Pro Asp₂₃₀ Asn Asp Glu Ser Trp₂₃₅ Gln Ser Ile Ser Leu₂₄₀
 Phe Glu Arg Leu Gly₂₄₅ Gly Leu Ala Thr Pro₂₅₀ Ala Leu Ile Thr Ala₂₅₅ Gly
 Trp Tyr Asp Gly₂₆₀ Phe Val Gly Glu Ser₂₆₅ Leu Arg Thr Phe Val₂₇₀ Ala Val
 Lys Asp Asn₂₇₅ Ala Asp Ala Arg Leu Val Val Gly Pro Trp₂₈₅ Ser His Ser
 Asn Leu₂₉₀ Thr Gly Arg Asn Ala₂₉₅ Asp Arg Lys Phe Gly₃₀₀ Ile Ala Ala Thr
 Tyr Pro Ile Gln Glu Ala₃₁₀ Thr Thr Met His Lys₃₁₅ Ala Phe Phe Asp Arg₃₂₀
 His Leu Arg Gly Glu Thr Asp Ala Leu Ala Gly Val Pro Lys Val Arg

```

              325               330               335
Leu Phe Val Met Gly Ile Asp Glu Trp Arg Asp Glu Thr Asp Trp Pro
              340               345               350
Leu Pro Asp Thr Ala Tyr Thr Pro Phe Tyr Leu Gly Gly Ser Gly Ala
              355               360               365
Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
              370               375               380
Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
              385               390               395
Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
              405               410               415
Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
              420               425               430
Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
              435               440               445
Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
              450               455               460
Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
              465               470               475
Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
              485               490               495
Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
              500               505               510
Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
              515               520               525
Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
              530               535               540
Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
              545               550               555
Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Lys Leu
              565               570               575
Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
              580               585
    
```

<210> 42

<211> 582

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 42

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

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 574 088 T3

Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
 465 470 475 480
 Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
 485 490 495
 Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
 500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Leu Glu
 565 570 575
 His His His His His His
 580

<210> 43

<211> 582

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 43

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

10

ES 2 574 088 T3

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

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

<210> 44

<211> 582

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 44

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Val Asp His Pro Asp Asn Asp Glu Ser Trp Gln Ser Ile Ser Leu

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Leu Glu
 565 570 575

His His His His His His
 580

<210> 45

<211> 582

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 574 088 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Leu Glu
 565 570 575

His His His His His His
 580

- <210> 46
- <211> 582
- 5 <212> PRT
- <213> polipéptido de la CocE mutante
- <400> 46

ES 2 574 088 T3

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

ES 2 574 088 T3

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

500 505 510
 Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
 515 520 525
 Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
 530 535 540
 Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
 545 550 555 560
 Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Leu Glu
 565 570 575
 His His His His His His
 580

<210> 47

<211> 582

5 <212> PRT

<213> polipéptido de la CocE mutante

<400> 47

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

10

130				135				140							
Asp 145	Leu	Tyr	Arg	Ala	Pro 150	Trp	Tyr	Gly	Pro	Gly 155	Gly	Ala	Leu	Ser	Val 160
Glu	Ala	Leu	Leu	Gly 165	Trp	Ser	Ala	Leu	Ile 170	Gly	Thr	Gly	Leu	Ile 175	Thr
Ser	Arg	Ser	Asp 180	Ala	Arg	Pro	Glu	Asp 185	Ala	Ala	Asp	Phe	Val 190	Gln	Leu
Ala	Lys	Ile 195	Leu	Asn	Asp	Val	Ala 200	Gly	Ala	Ala	Ser	Val 205	Thr	Pro	Leu
Ala	Glu 210	Gln	Pro	Leu	Leu	Gly 215	Arg	Leu	Ile	Pro	Trp 220	Val	Ile	Asp	Gln
Val 225	Val	Asp	His	Pro	Asp 230	Asn	Asp	Glu	Ser	Trp 235	Gln	Ser	Ile	Ser	Leu 240
Phe	Glu	Arg	Leu	Gly 245	Gly	Leu	Ala	Thr	Pro 250	Ala	Leu	Ile	Thr	Ala 255	Gly
Trp	Tyr	Asp	Gly 260	Phe	Val	Gly	Glu	Ser 265	Leu	Arg	Thr	Phe	Val 270	Ala	Val
Lys	Asp	Asn 275	Ala	Asp	Ala	Arg	Leu 280	Val	Val	Gly	Pro	Trp 285	Ser	His	Ser
Asn 290	Leu	Thr	Gly	Arg	Asn	Ala 295	Asp	Arg	Lys	Phe	Gly 300	Ile	Ala	Ala	Thr
Tyr 305	Pro	Ile	Gln	Glu	Ala 310	Thr	Thr	Met	His	Lys 315	Ala	Phe	Phe	Asp	Arg 320
His	Leu	Arg	Gly	Glu 325	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala 330	Gly	Val	Pro	Lys	Val 335	Arg
Leu	Phe	Val	Met 340	Gly	Ile	Asp	Glu	Trp 345	Arg	Asp	Glu	Thr	Asp 350	Trp	Pro
Leu	Pro	Asp 355	Thr	Ala	Tyr	Thr	Pro 360	Phe	Tyr	Leu	Gly	Gly 365	Ser	Gly	Ala
Ala	Asn 370	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly 375	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr 380	Ser	Ile	Ser	Gly

ES 2 574 088 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de cocaína esterasa (CocE) mutante que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico, la secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, en la que la SEQ ID NO: 2 es un polinucleótido que codifica un polipéptido de la CocE de tipo silvestre; en el que la secuencia de aminoácidos comprende al menos una sustitución, adición o supresión de un resto aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 1 seleccionada del grupo que consiste en T172R, F189A/T172R, T172R/A193D, G173Q, T172R/G173Q, T172R/G173Q-I175-G-G-A186, T172R/G173Q-T176-G-G-D185, L169K y F189K; y el polipéptido de la CocE mutante tiene actividad cocaína esterasa con el aumento de la estabilidad térmica a 37 °C en comparación con la CocE de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
2. El polipéptido de la CocE mutante de la reivindicación 1, en el que están sustituidos al menos dos restos de aminoácidos.
3. El polipéptido de la CocE mutante de la reivindicación 1, en el que están sustituidos al menos tres restos de aminoácidos.
4. El polipéptido de la CocE mutante de la reivindicación 1, en el que están sustituidos al menos cuatro restos de aminoácidos.
5. El polipéptido de la CocE mutante de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25 (T172R); SEQ ID NO: 32 (G173Q); SEQ ID NO: 39 (T172R-G173Q); SEQ ID NO: 40 (L169K) y SEQ ID NO: 44 (F189K), o uno de sus fragmentos funcionales.
6. El polipéptido de la CocE mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la al menos una sustitución, adición o supresión de restos de aminoácidos comprende T172R; G173Q; L169K; o F189K.
7. El polipéptido de la CocE mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polipéptido de la CocE mutante está pegilado.
8. El polipéptido de la CocE mutante de la reivindicación 1, que comprende sustituciones de aminoácidos F189A/T172R; T172R/A193D; T172R/G173Q; T172R/G173Q-I175-G-G-A186; o T172R/G173Q-T176-G-G-D185.
9. El polipéptido de la CocE mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.
10. El polipéptido de la CocE mutante para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la enfermedad inducida por la cocaína se selecciona del grupo que consiste de sobredosis de cocaína, intoxicación por cocaína, adicción a la cocaína y dependencia de la cocaína.
11. Un ácido nucleico
- (a) que codifica el polipéptido de la CocE mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 9, o
- (b) que codifica un polipéptido de la CocE mutante, en el que el ácido nucleico tiene al menos el 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, y en el que el polipéptido de la CocE mutante codificado comprende al menos una sustitución, adición o supresión de un resto aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 1 seleccionada del grupo que consiste en T172R, F189A/T172R, T172R/A193D, G173Q, T172R/G173Q, T172R/G173Q-I175-G-G-A186, T172R/G173Q-T176-G-G-D185, L169K y F189K, y en el que el polipéptido de la CocE mutante codificado tiene actividad cocaína esterasa con el aumento de la estabilidad térmica a 37 °C en comparación con la CocE de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
12. El ácido nucleico de la reivindicación 11, en el que la identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 es de al menos el 90 %.
13. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la CocE mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, que comprende además:
- un sustrato, producto o inhibidor de la cocaína seleccionado del grupo que consiste en cocaína, un derivado de la cocaína, (-)-cocaína, (+)-cocaína, tropococaína, un derivado de tío-cocaína, tiol-1, tiol-2, un derivado de amida-cocaína, un derivado de provitamina-cocaína, cocaína PABA, niacina cocaína, ácido benzoico, acetato de 4-

nitrofenilo (4NPA), 4-nitrofenol (4NP), fosfo-fluorococaína, O-fosfo-cocaína, O-metilfosfococaína, S-metilfosfococaína, ecgonina, un derivado de la ecgonina, un análogo del éster metílico de ecgonina del ácido borónico, ácido fenilborónico, un derivado de ácido benzoico, ácido 4-terc-butil benzoico, ácido 1-naftoico, y éster metílico del ácido 2,3,4-trimetilbenzoico, en el que el sustrato, producto o inhibidor de la cocaína estabilizan la
5 desnaturalización térmica del polipéptido de la CocE mutante.

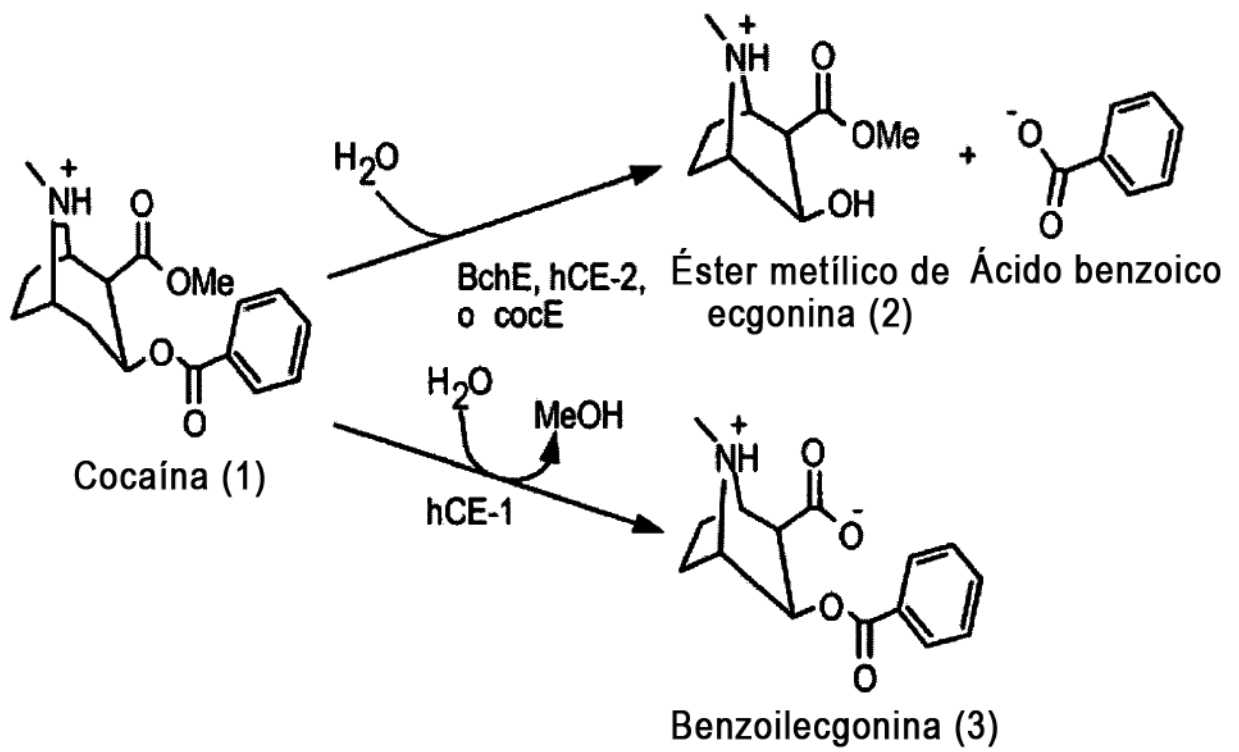


FIG. 1

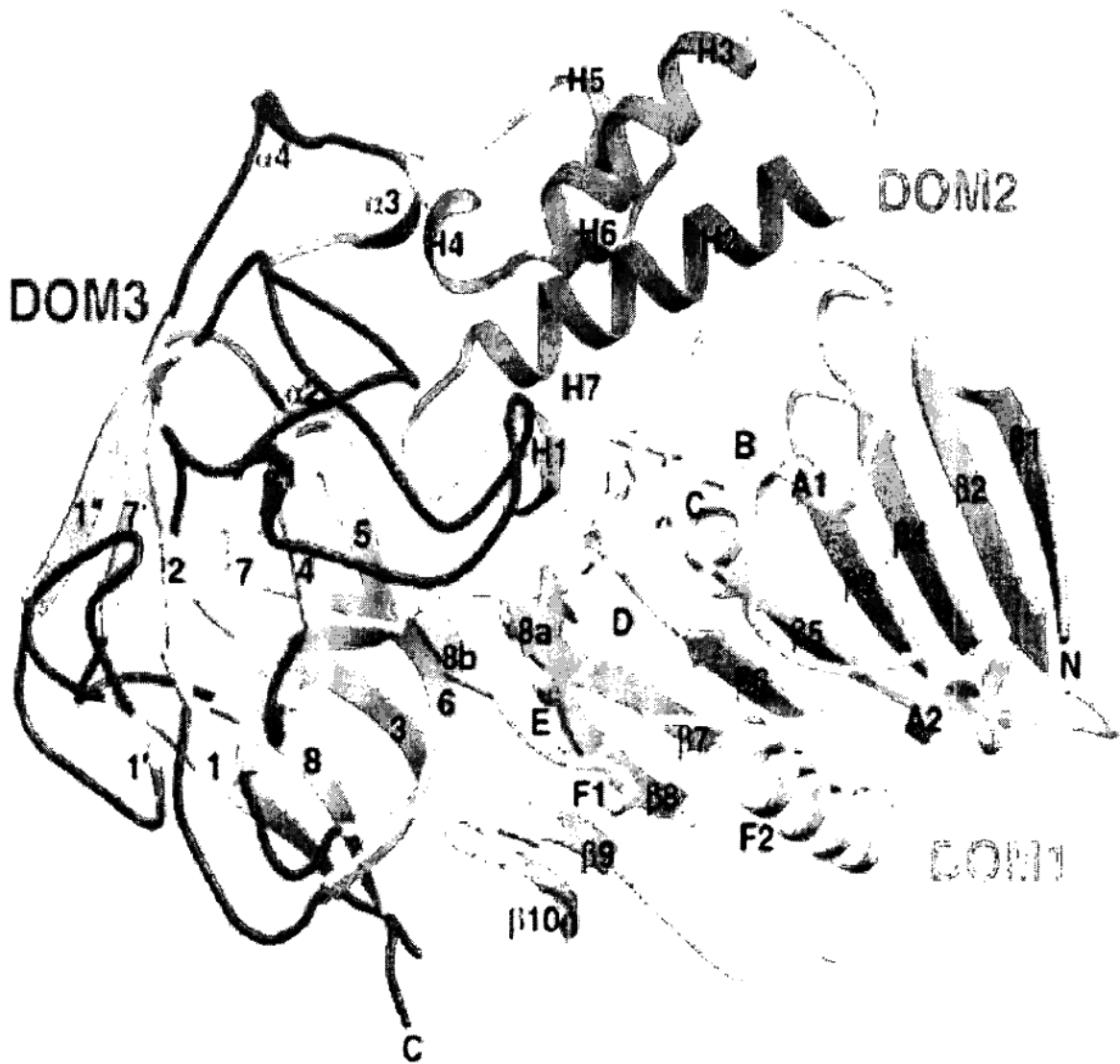


FIG. 2

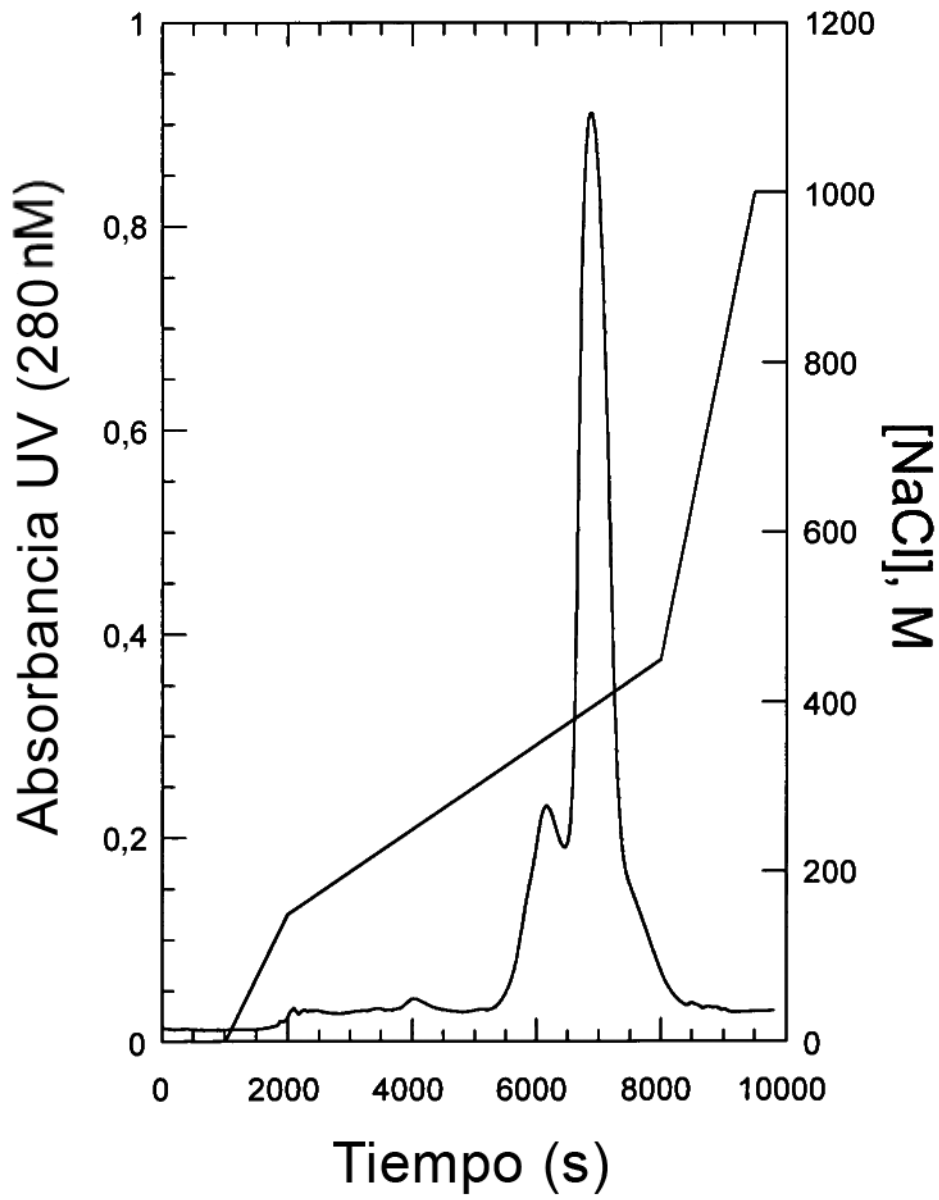


FIG. 3

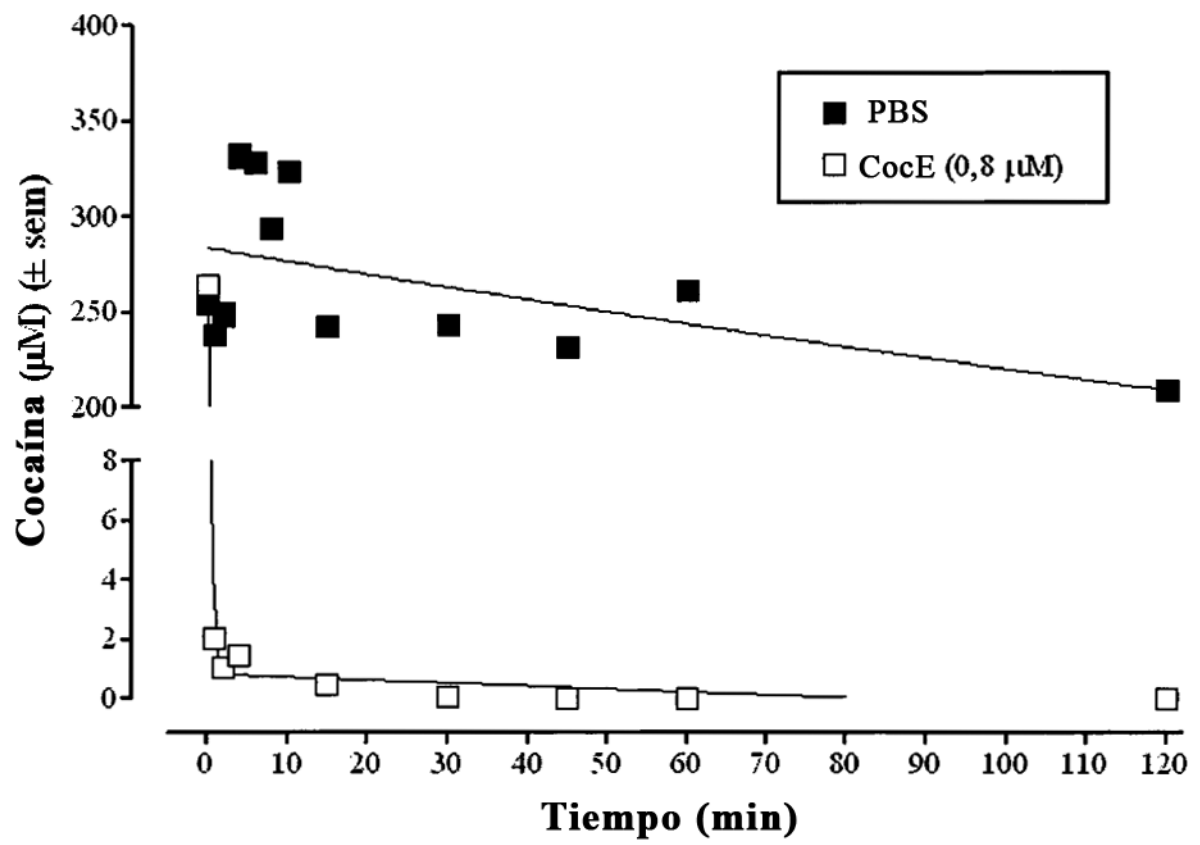


FIG. 4

- T172R
- S159A
- ◆ T172R(40min@37°C)
- wt CocE
- S159A(40min@37°C)
- wtCocE(40min@37°C)

Repetición de mutantes S159A y T172R (3-6-06)

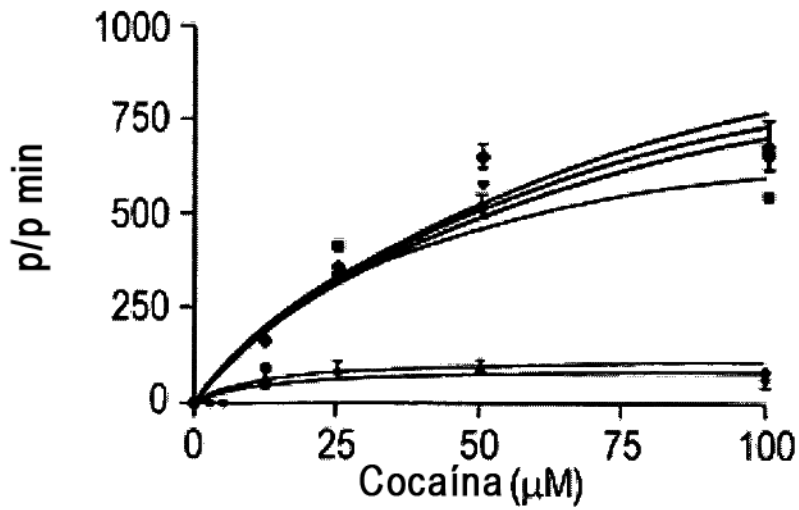


FIG. 5

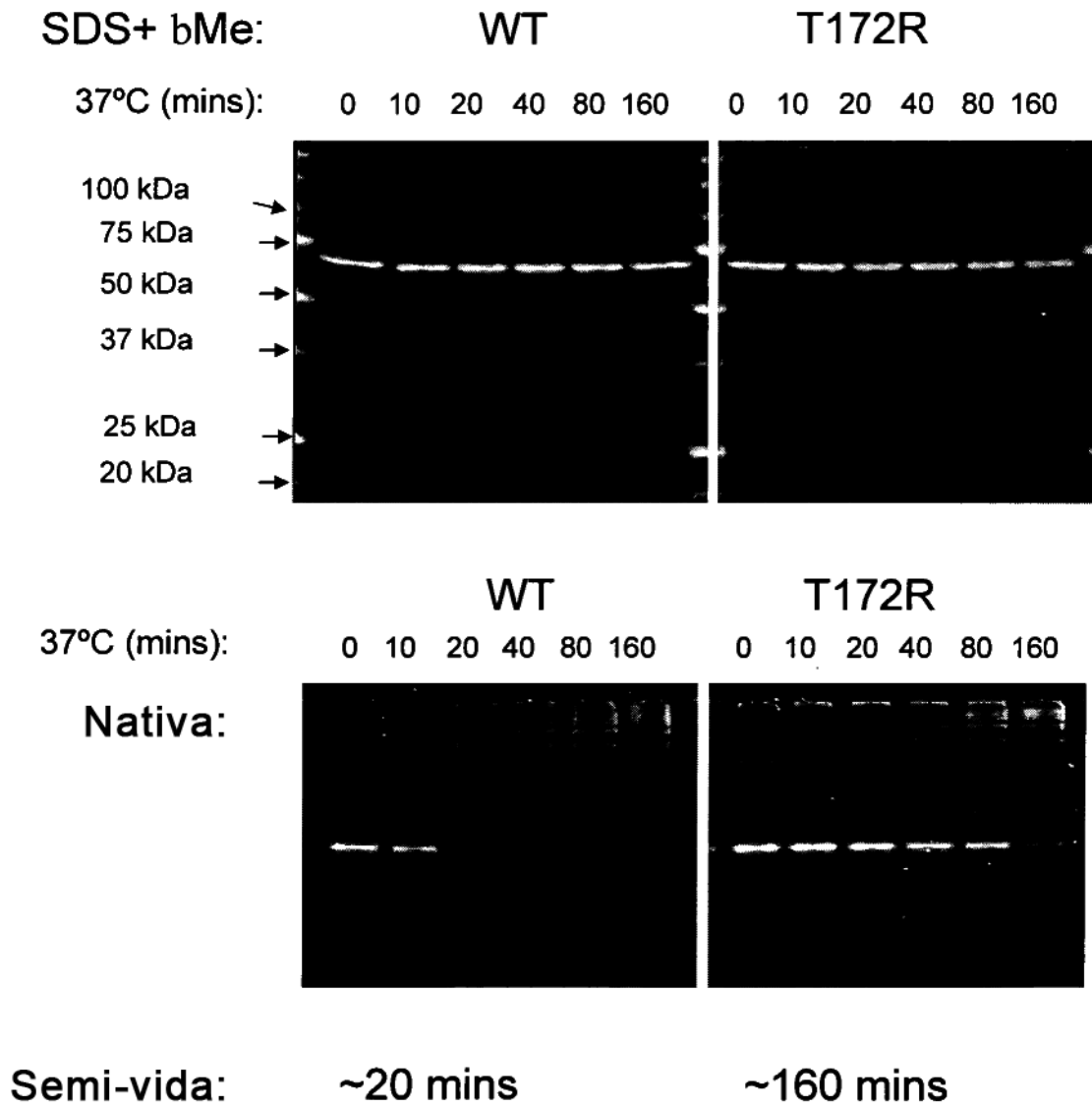


FIG. 6

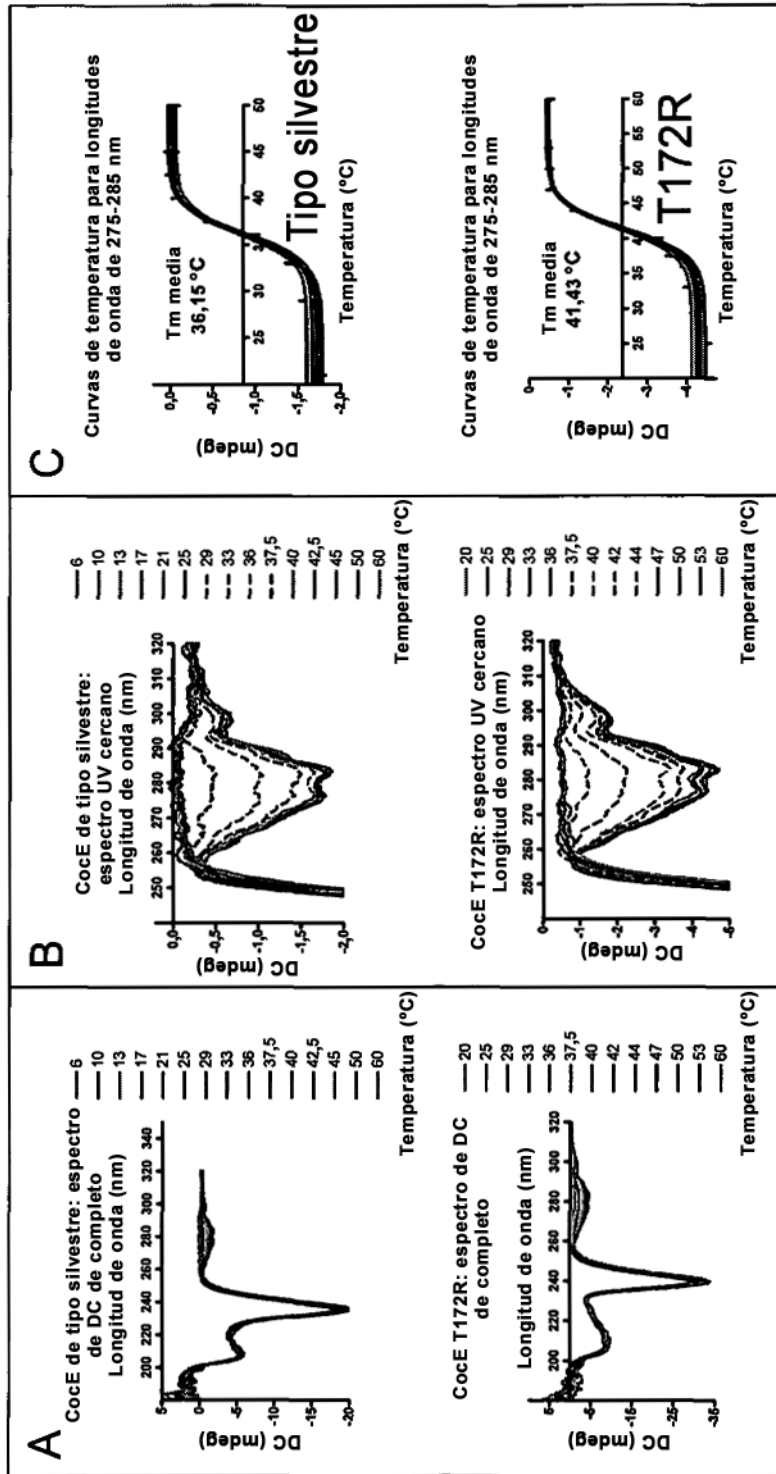


FIG. 7

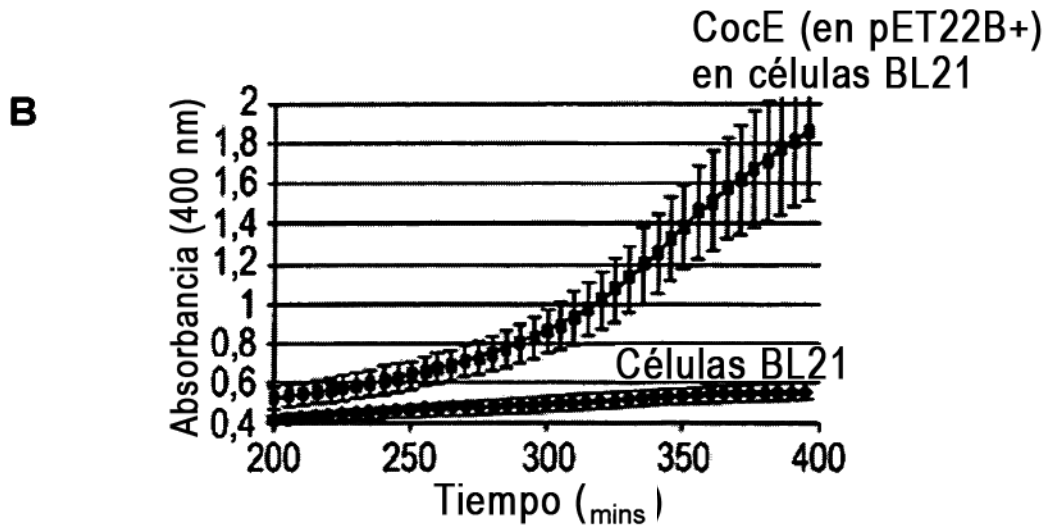
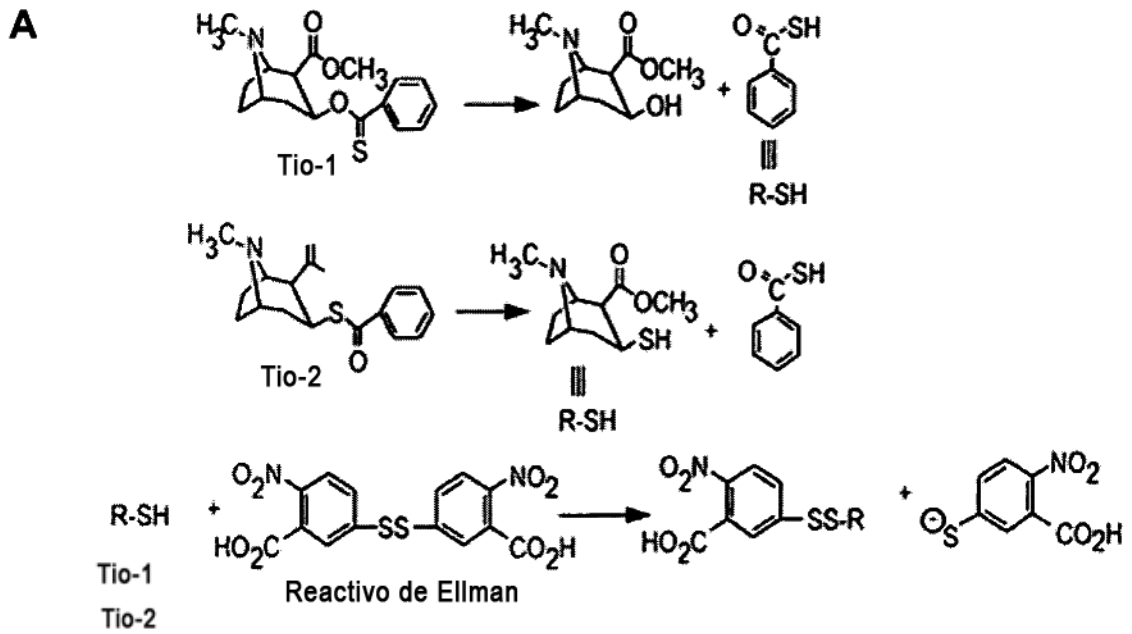


FIG. 8

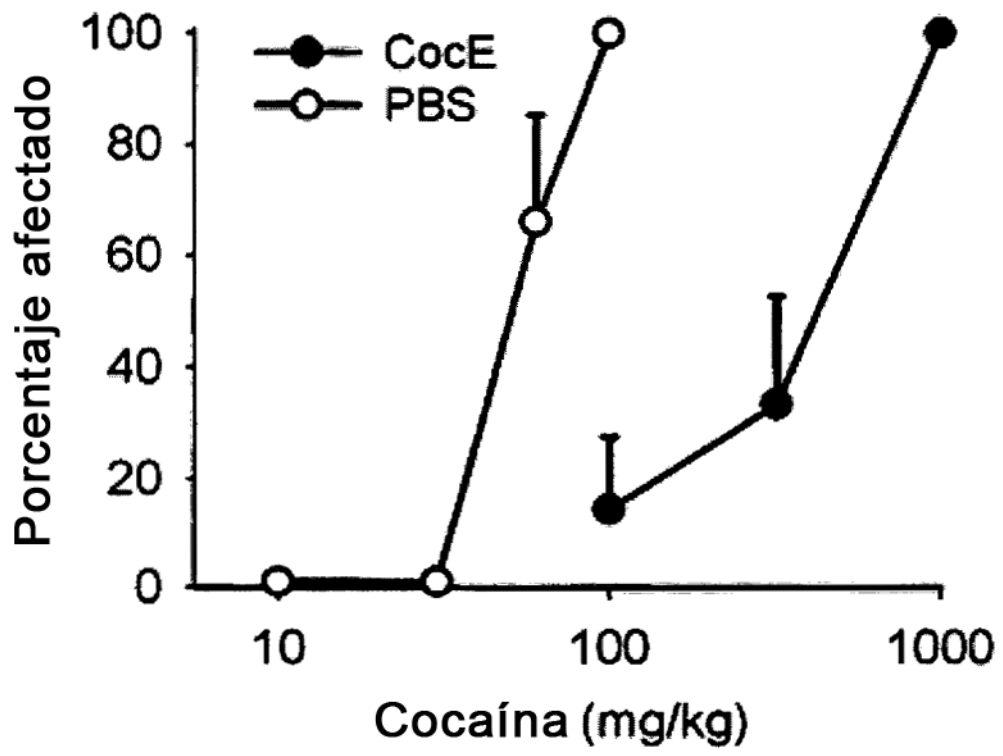


FIG. 9

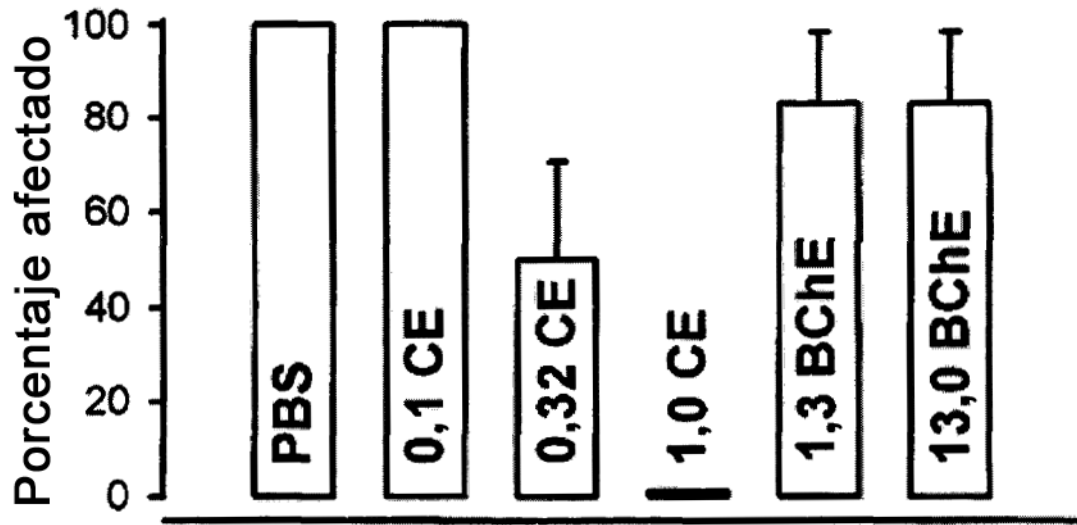


FIG. 10

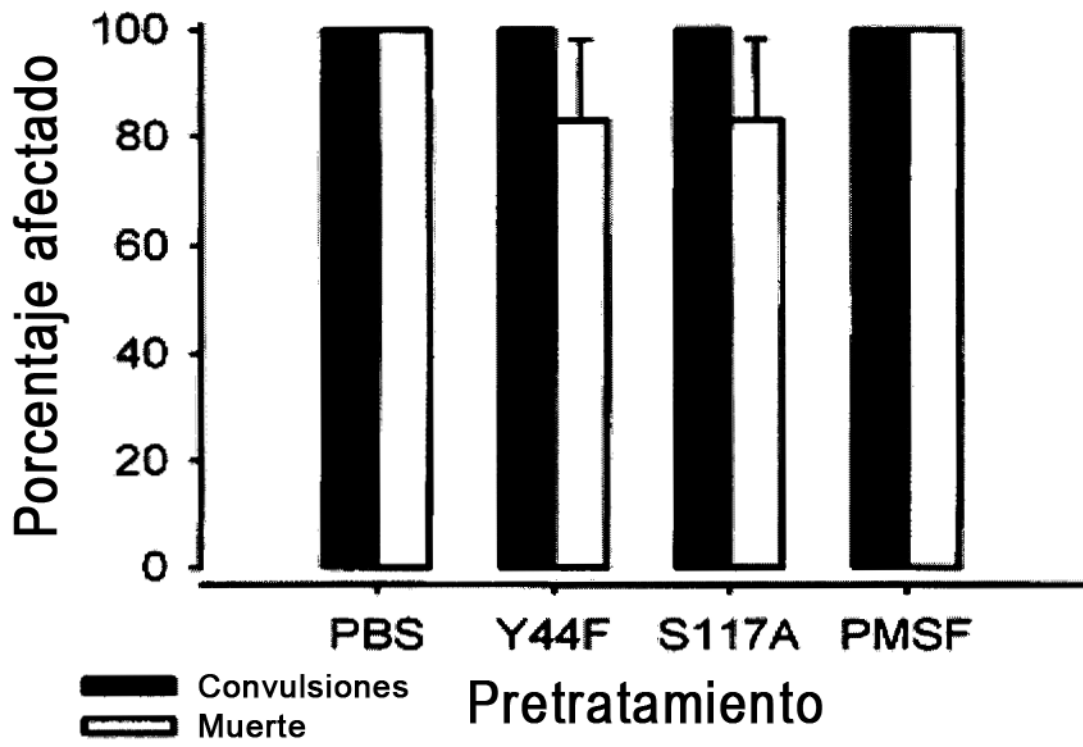


FIG. 11

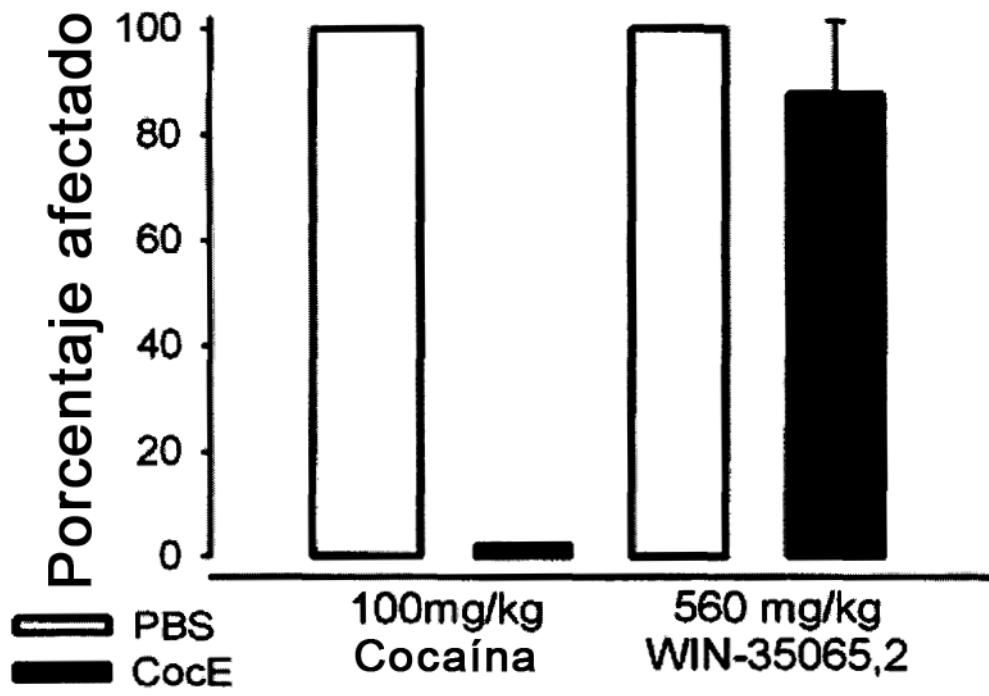


FIG. 12

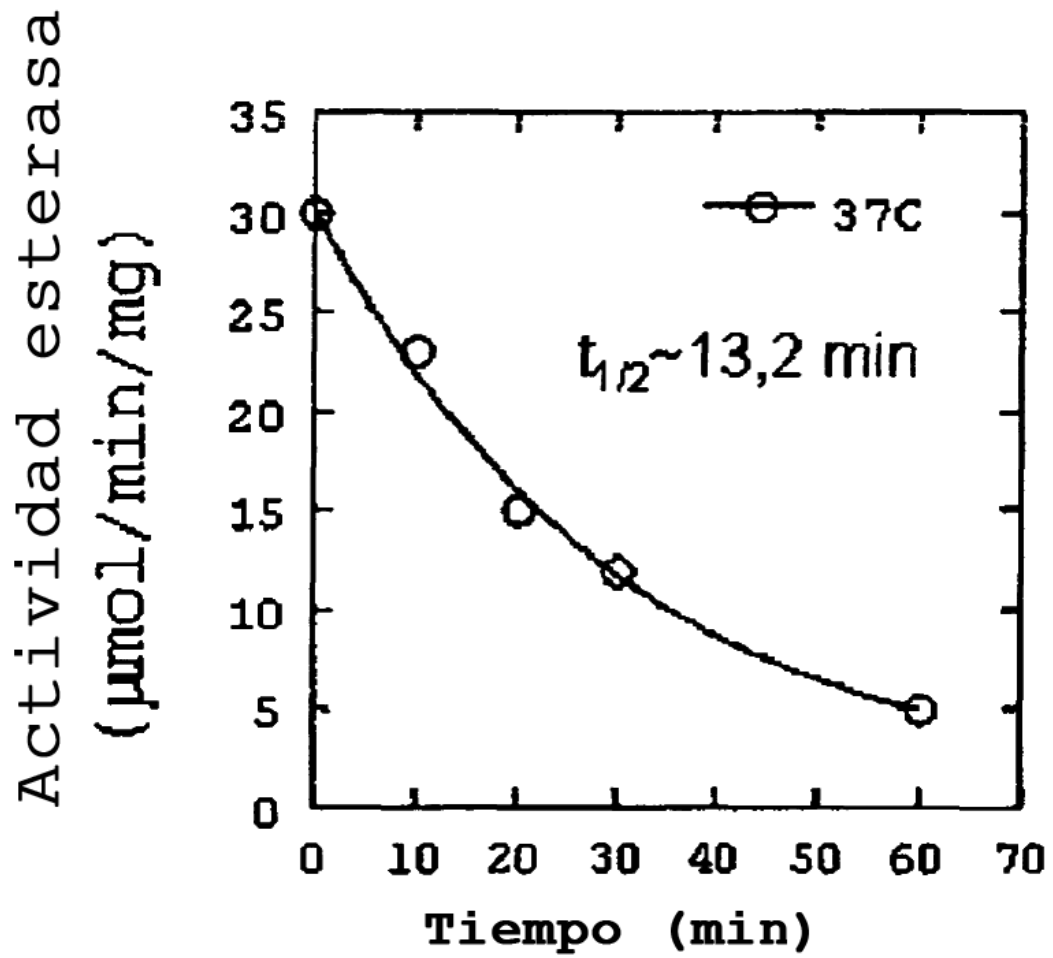


FIG. 13

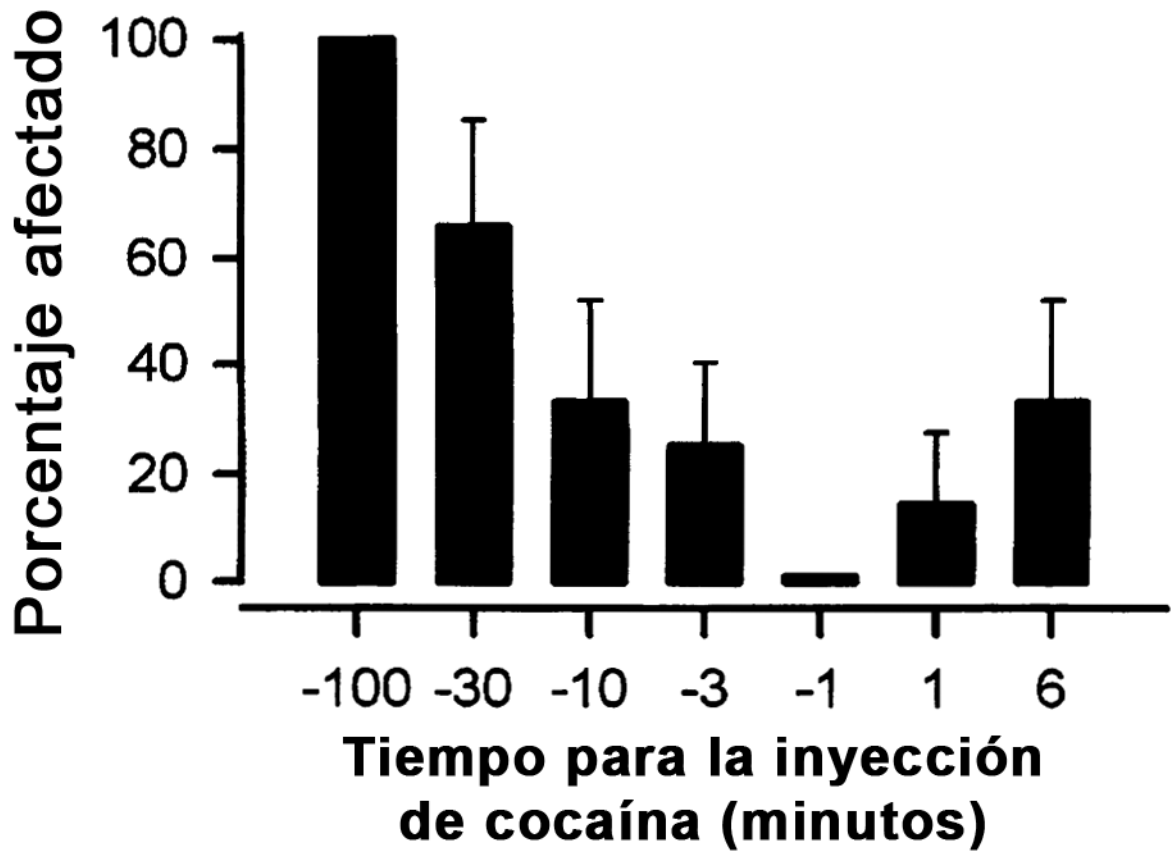


FIG. 14

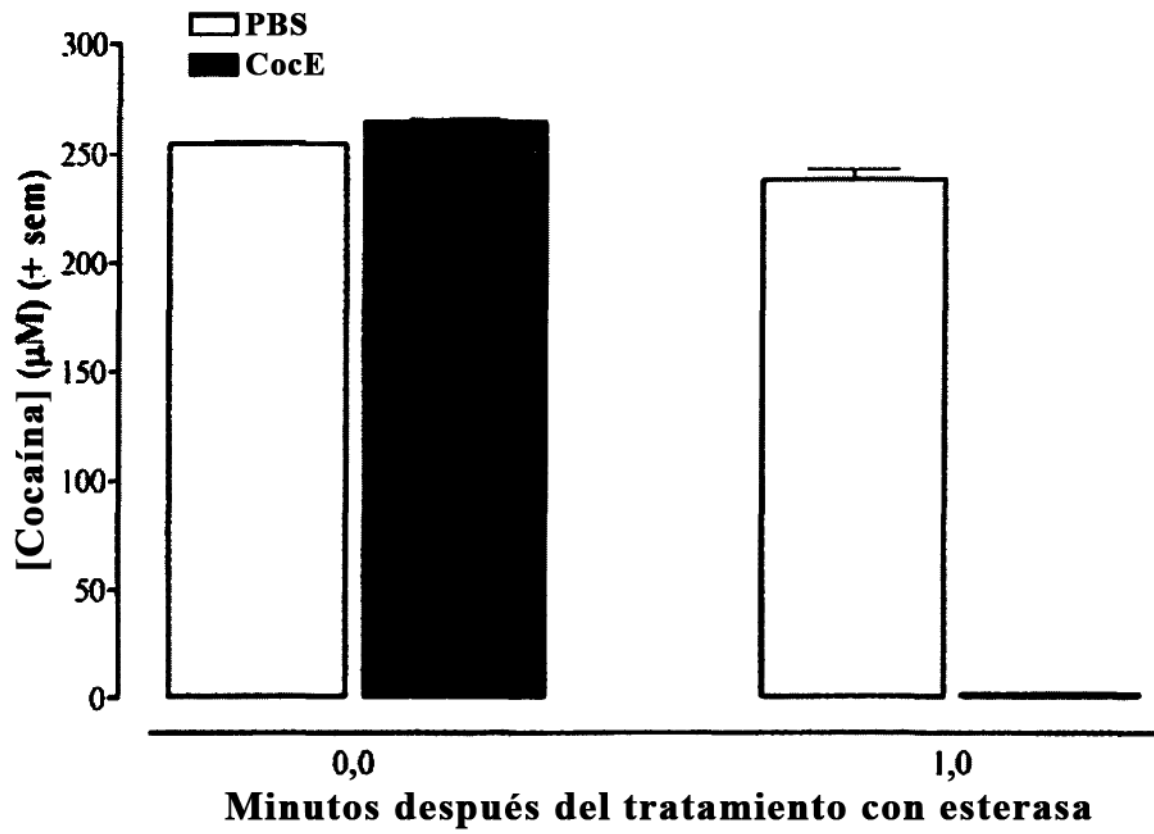


FIG. 15

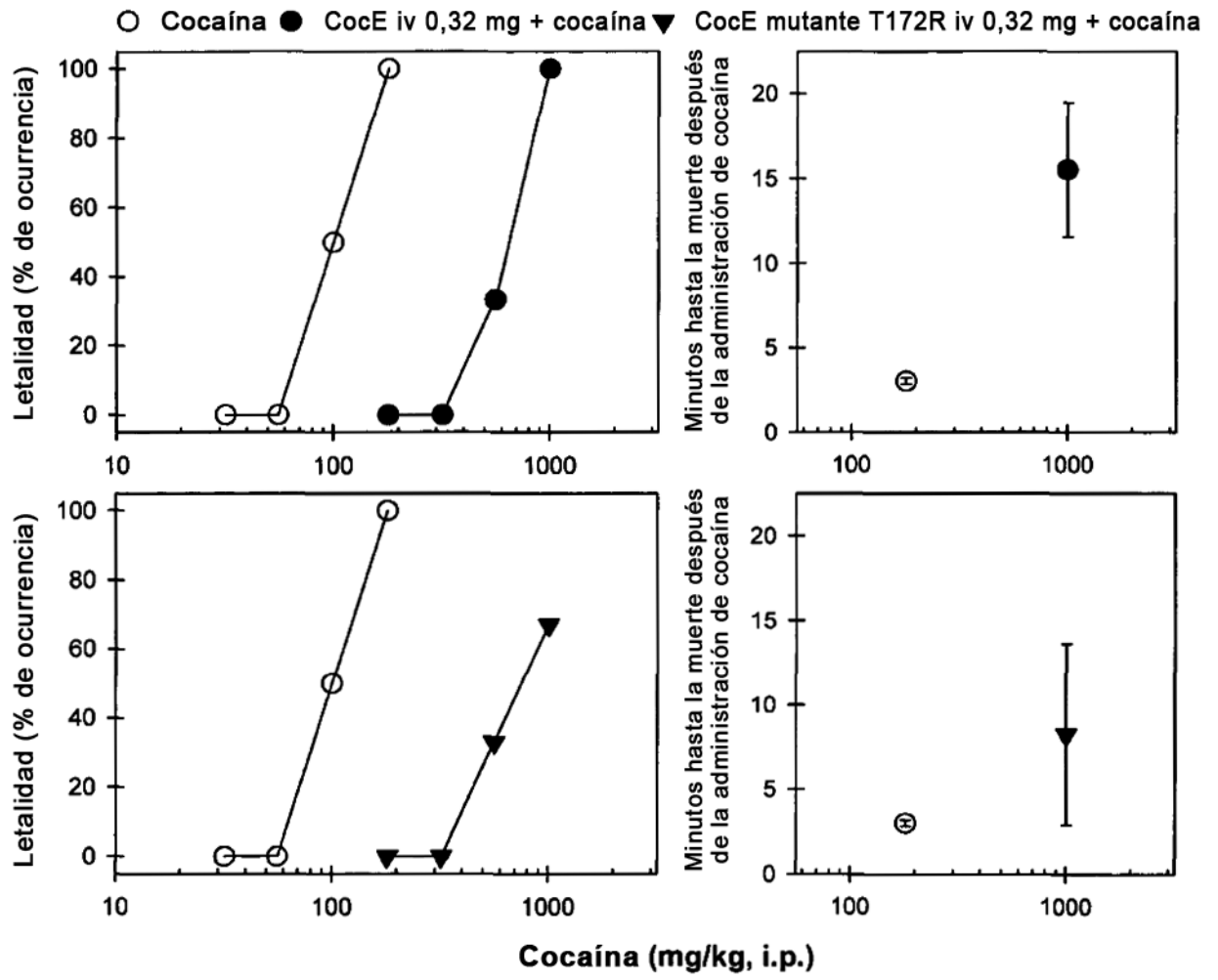


FIG. 16

- CocE iv 0,32 mg + cocaína ip 320 mg/kg (n=6)
- ▲ T172R iv 0,32 mg + cocaína ip 320 mg/kg (n=6)

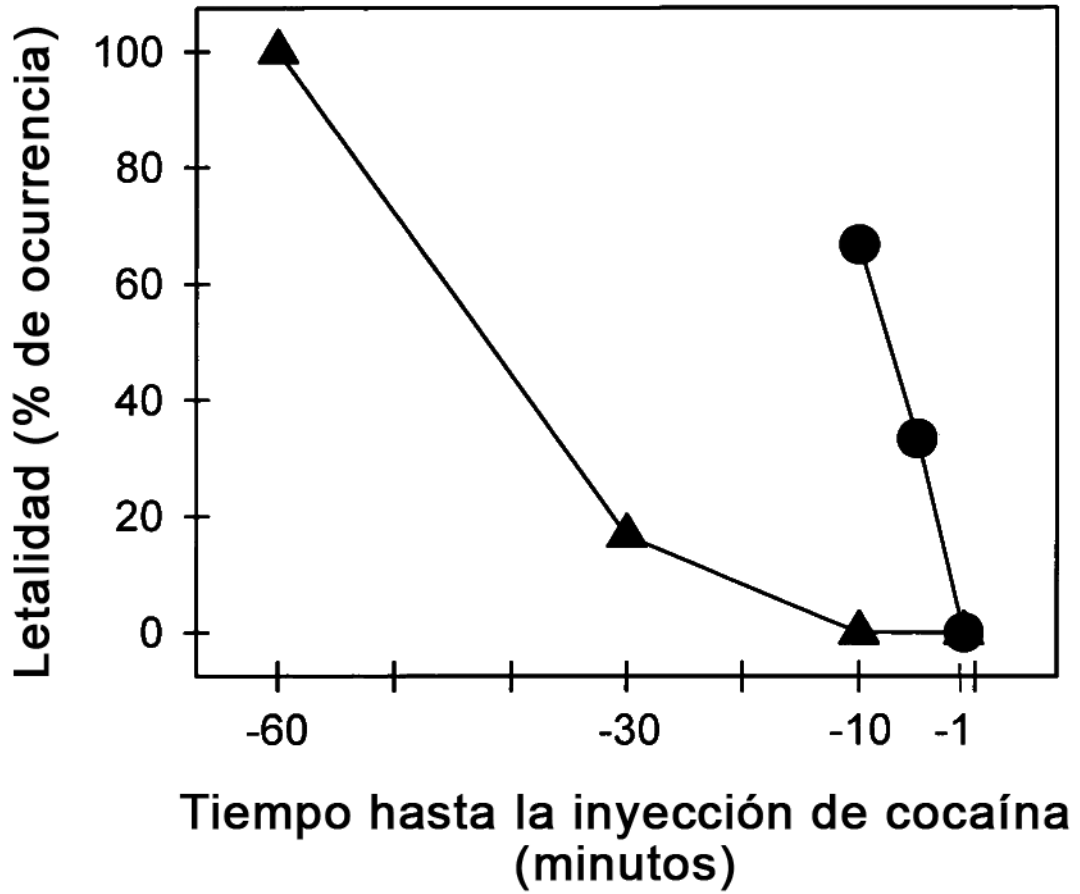


FIG. 17

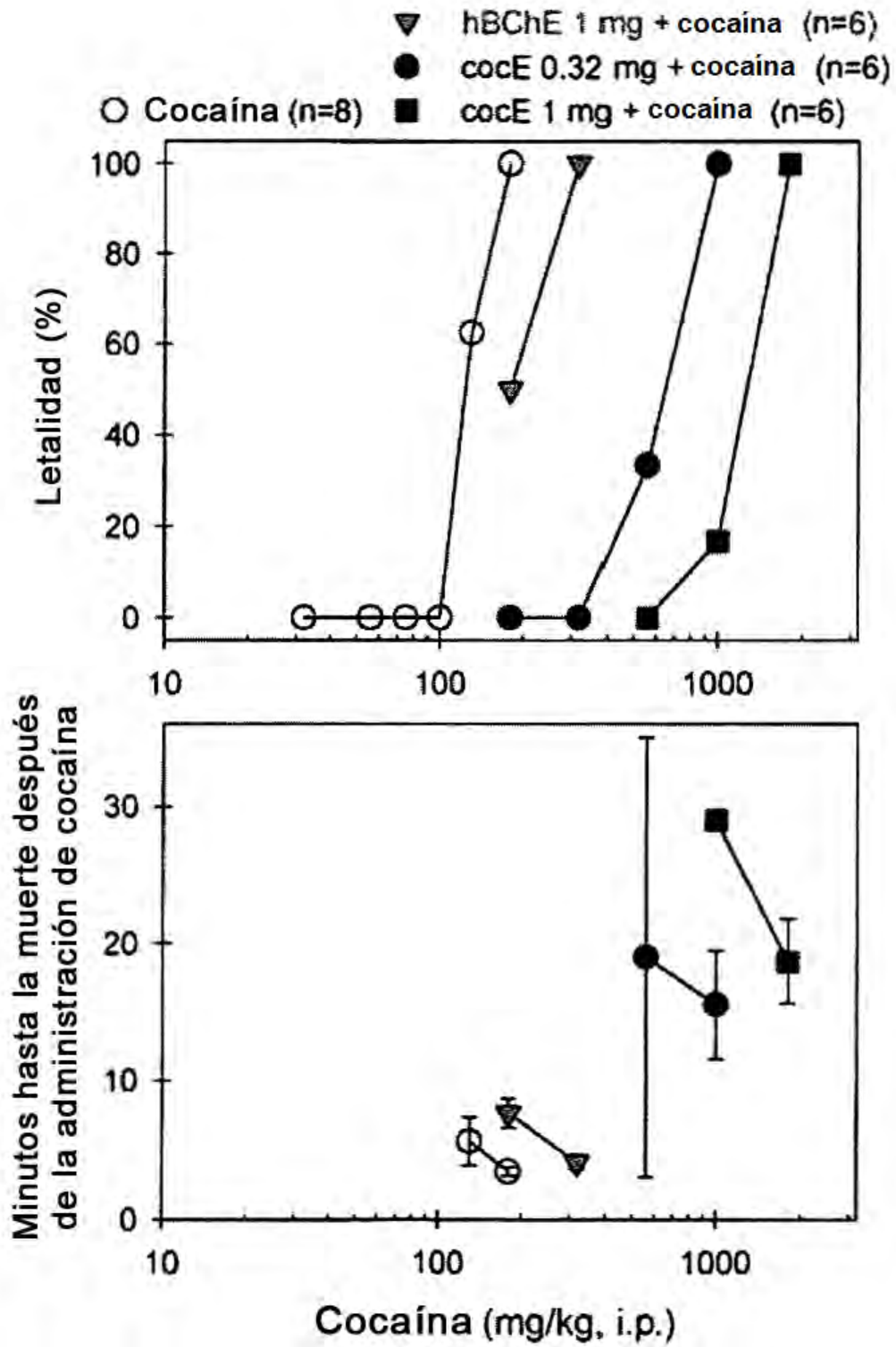


FIG. 18

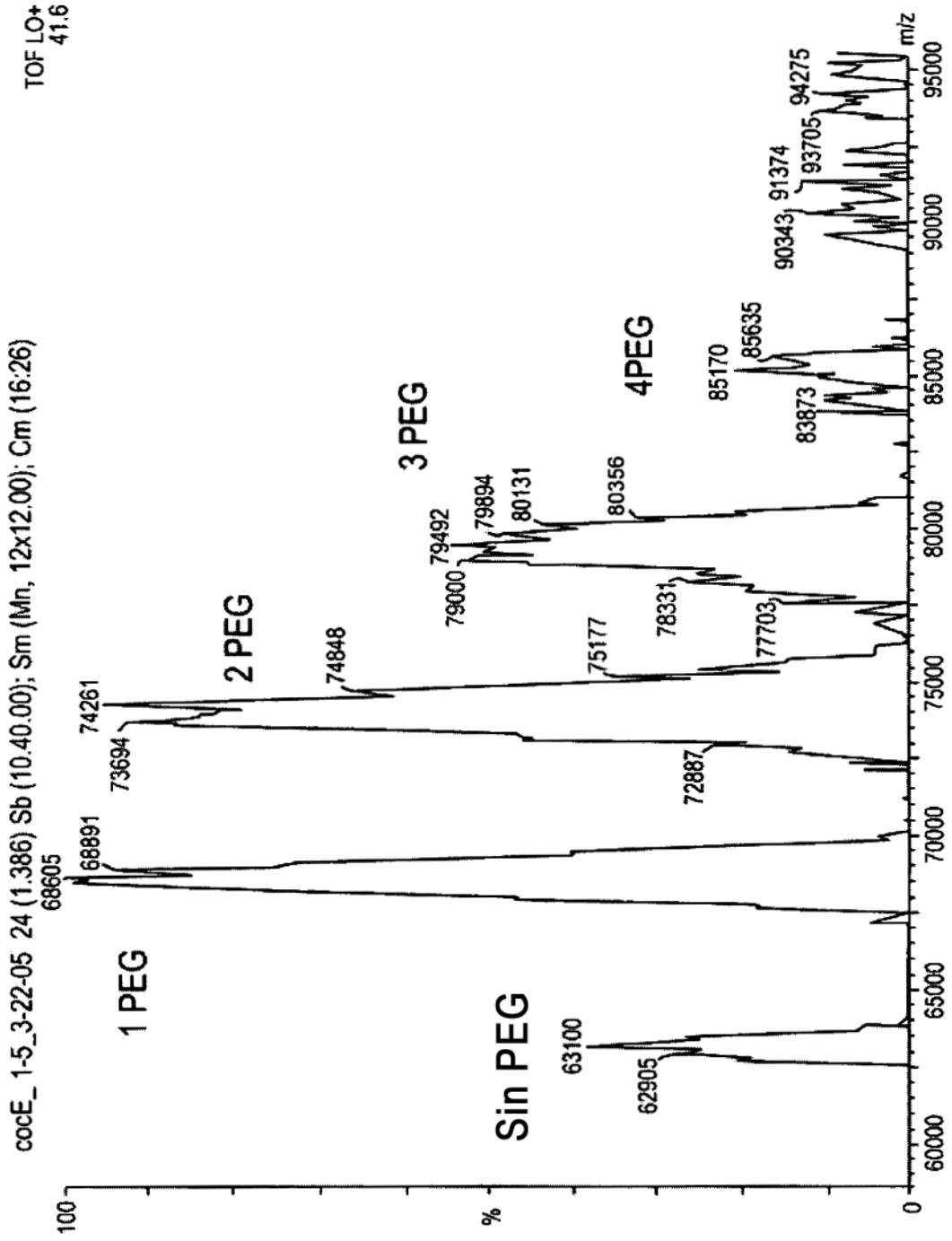


FIG. 19

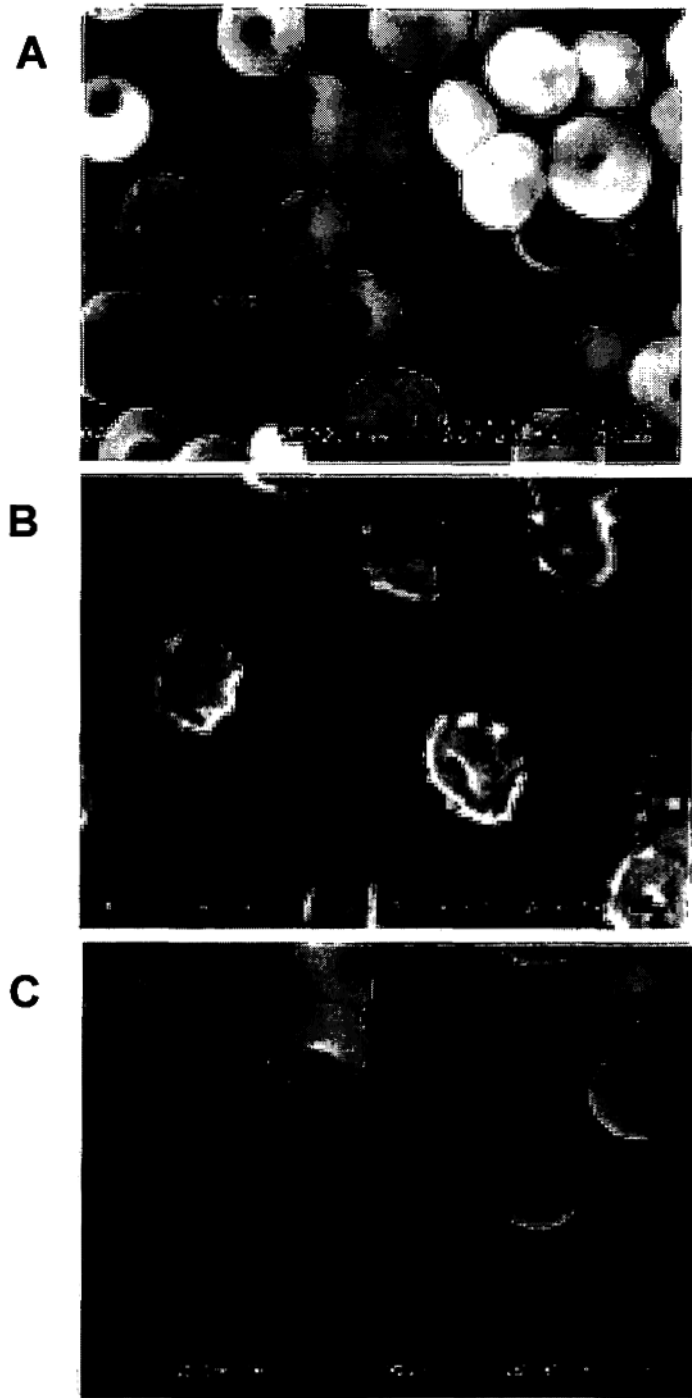


FIG. 20

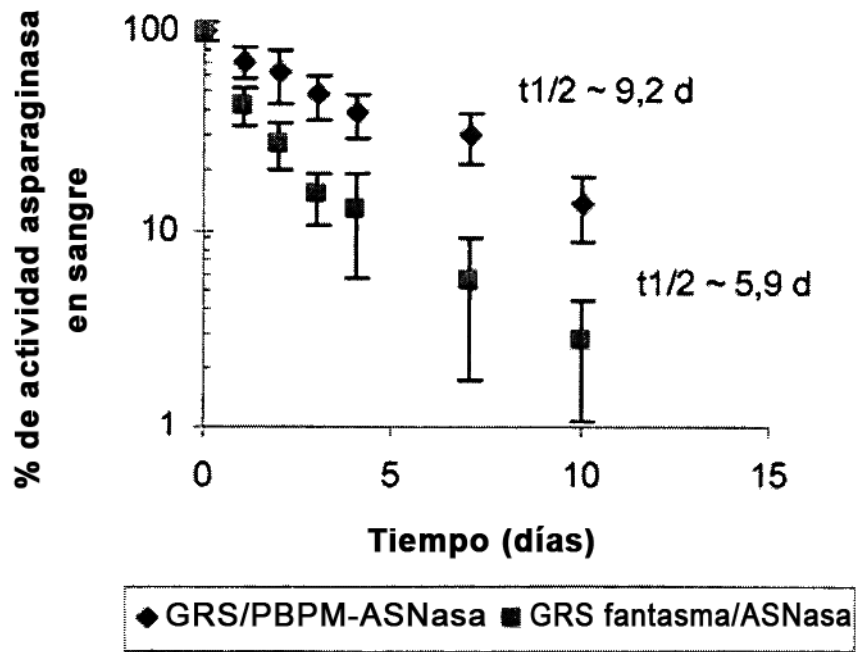


FIG. 21

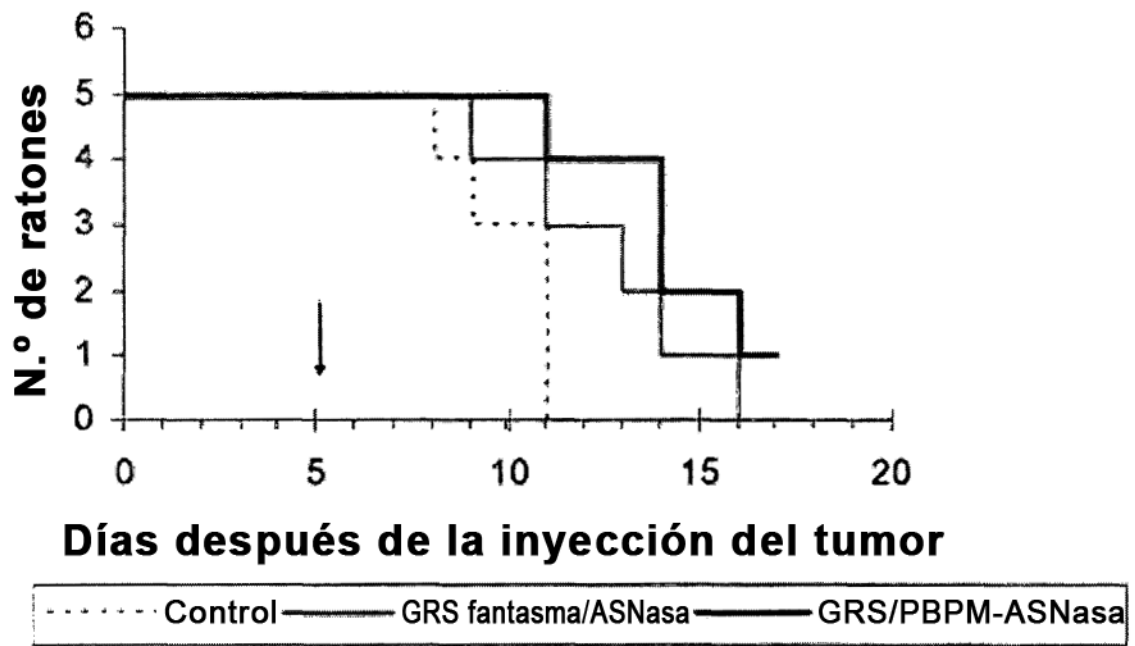


FIG. 22

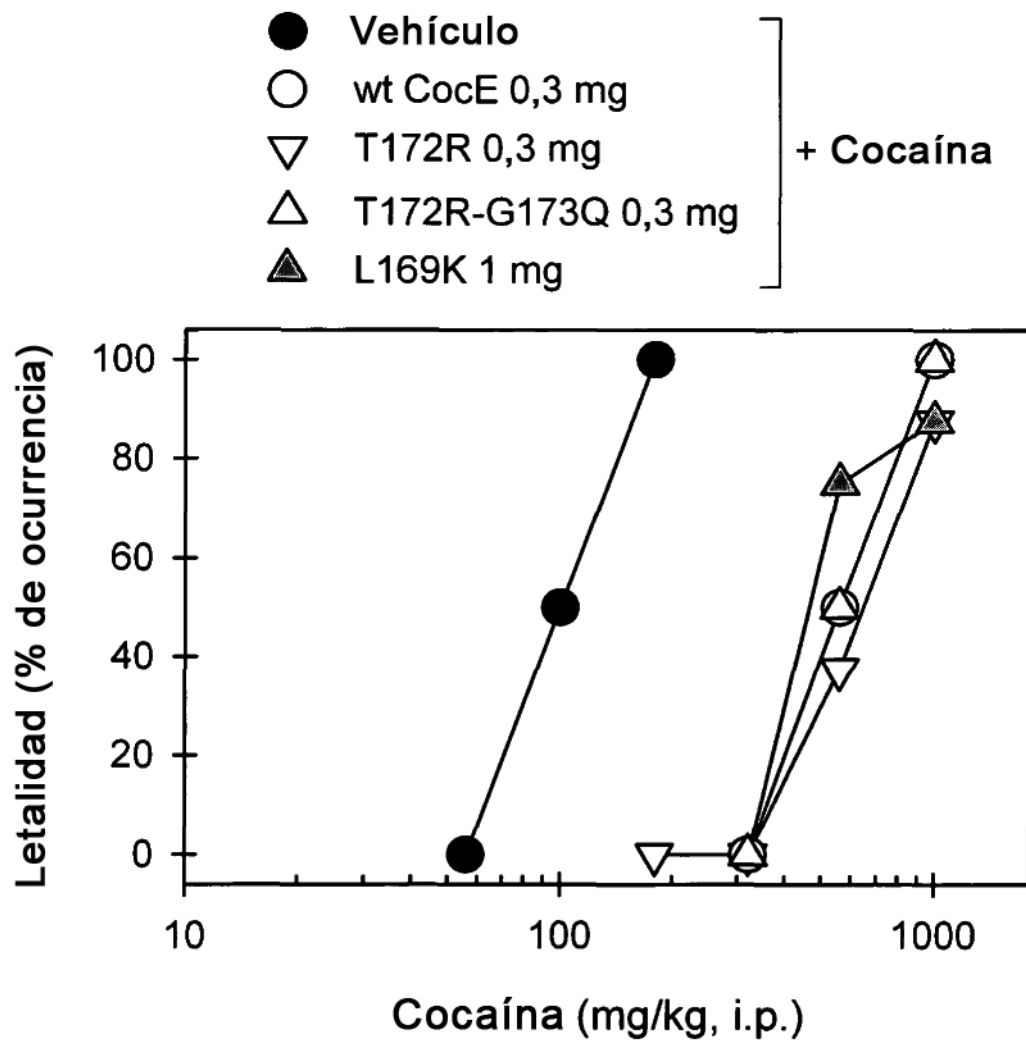


FIG. 23

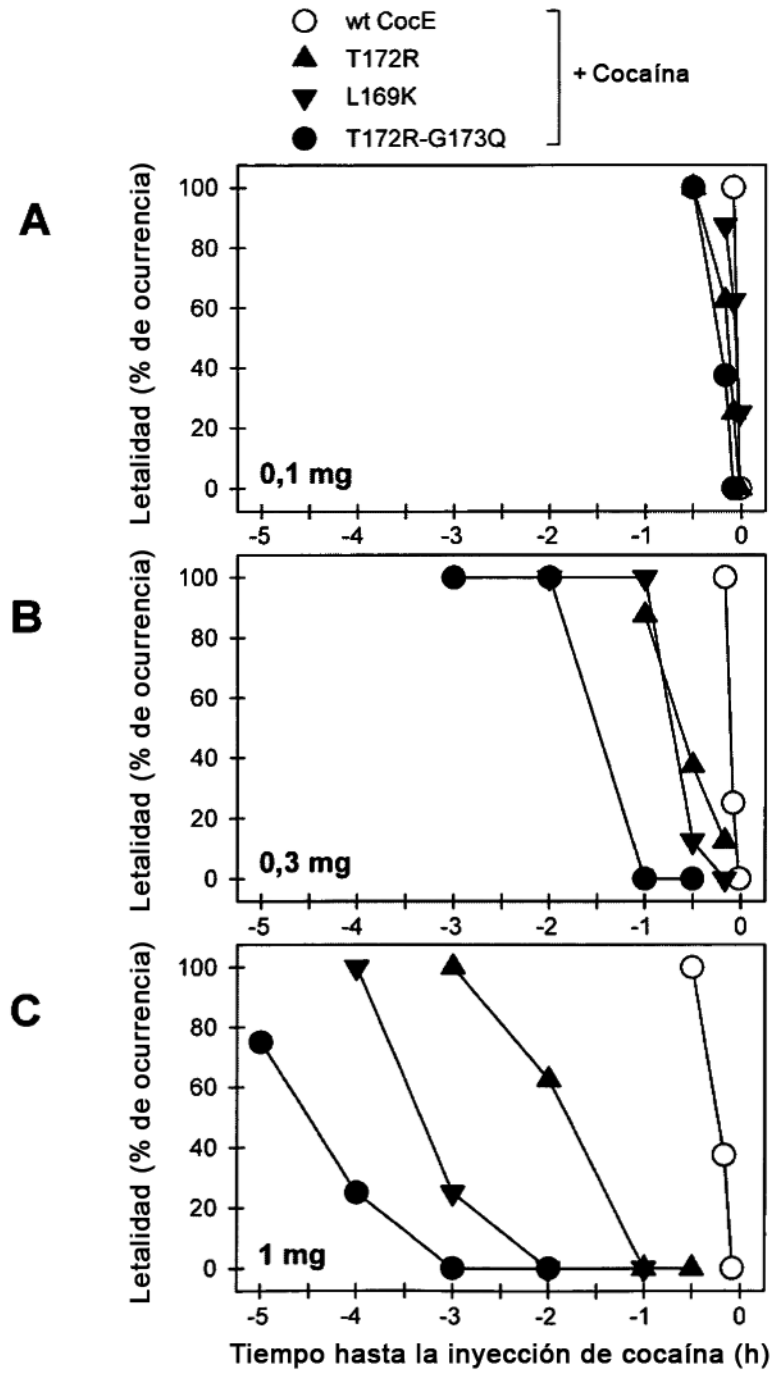


FIG. 24

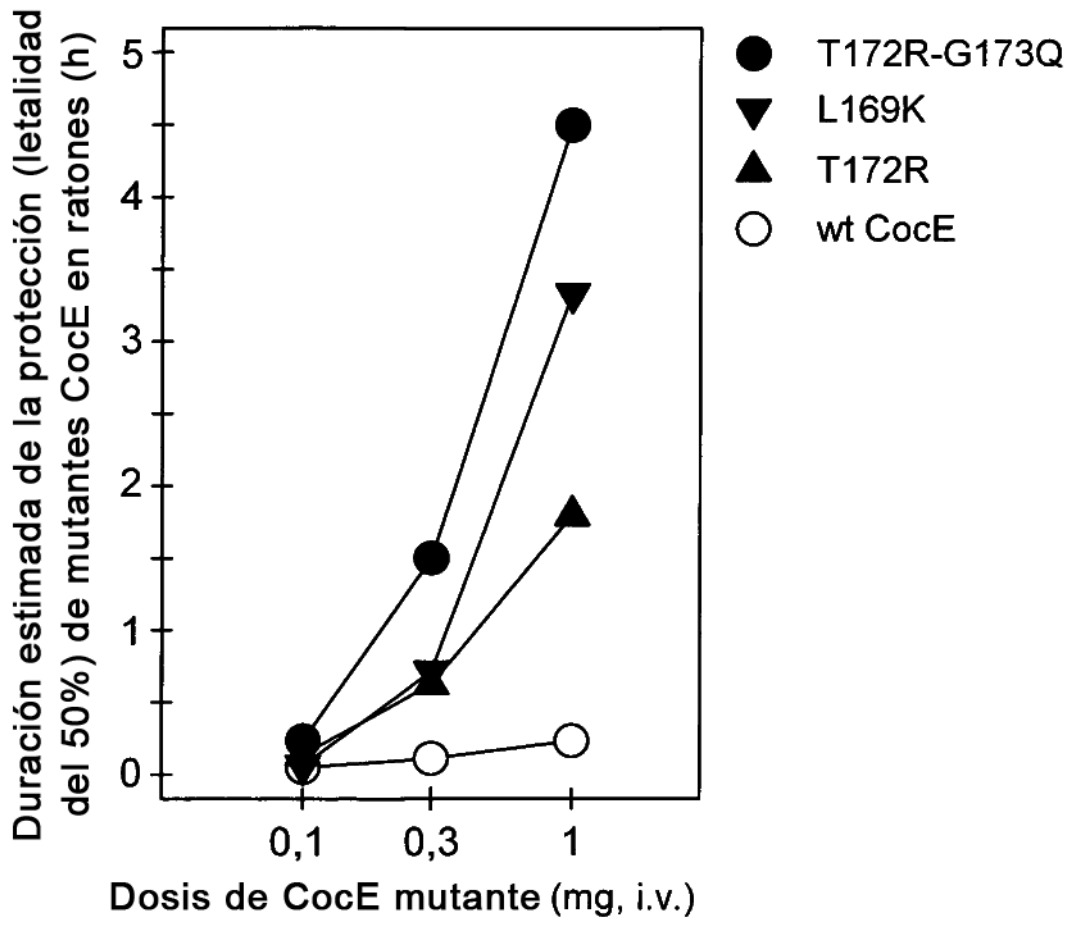


FIG. 25

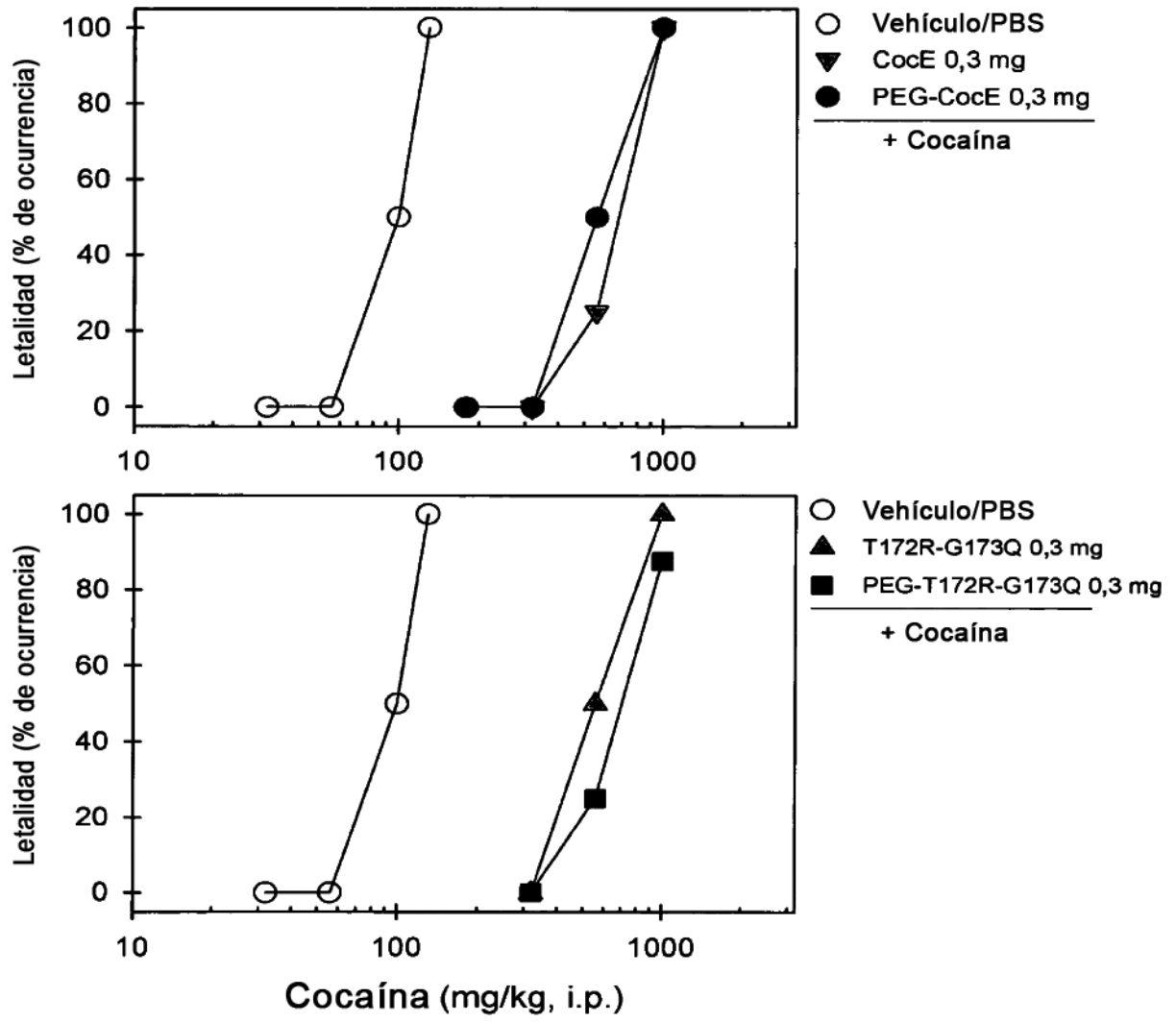


FIG. 26

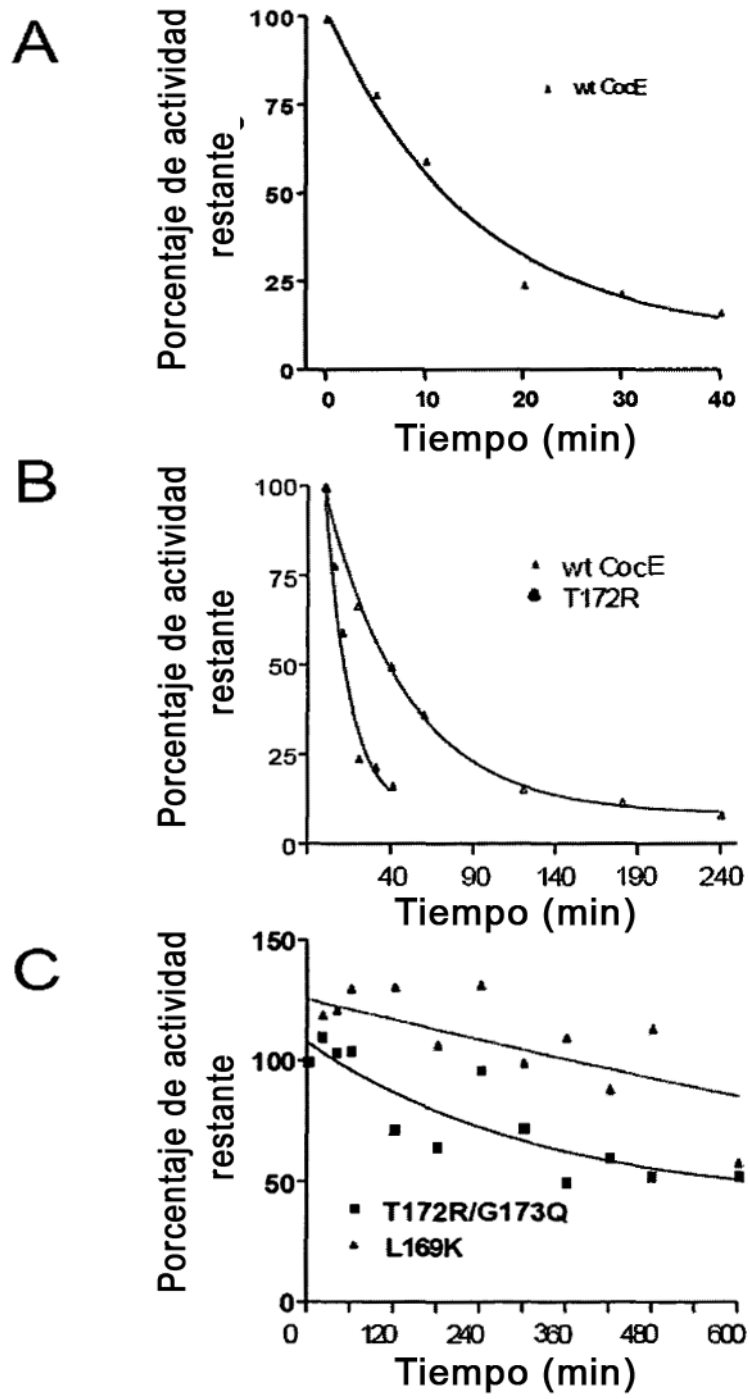


FIG. 27

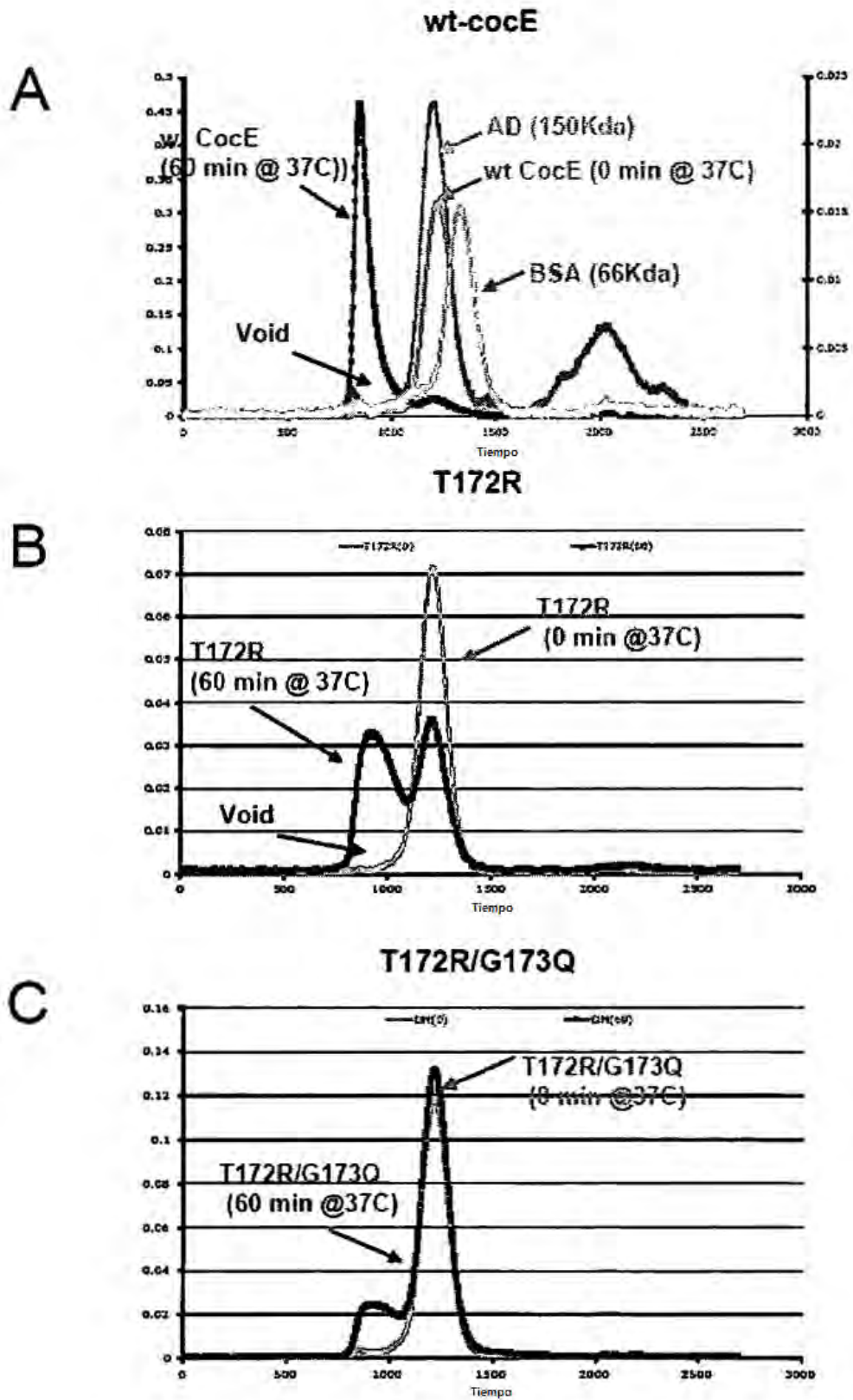


FIG. 28

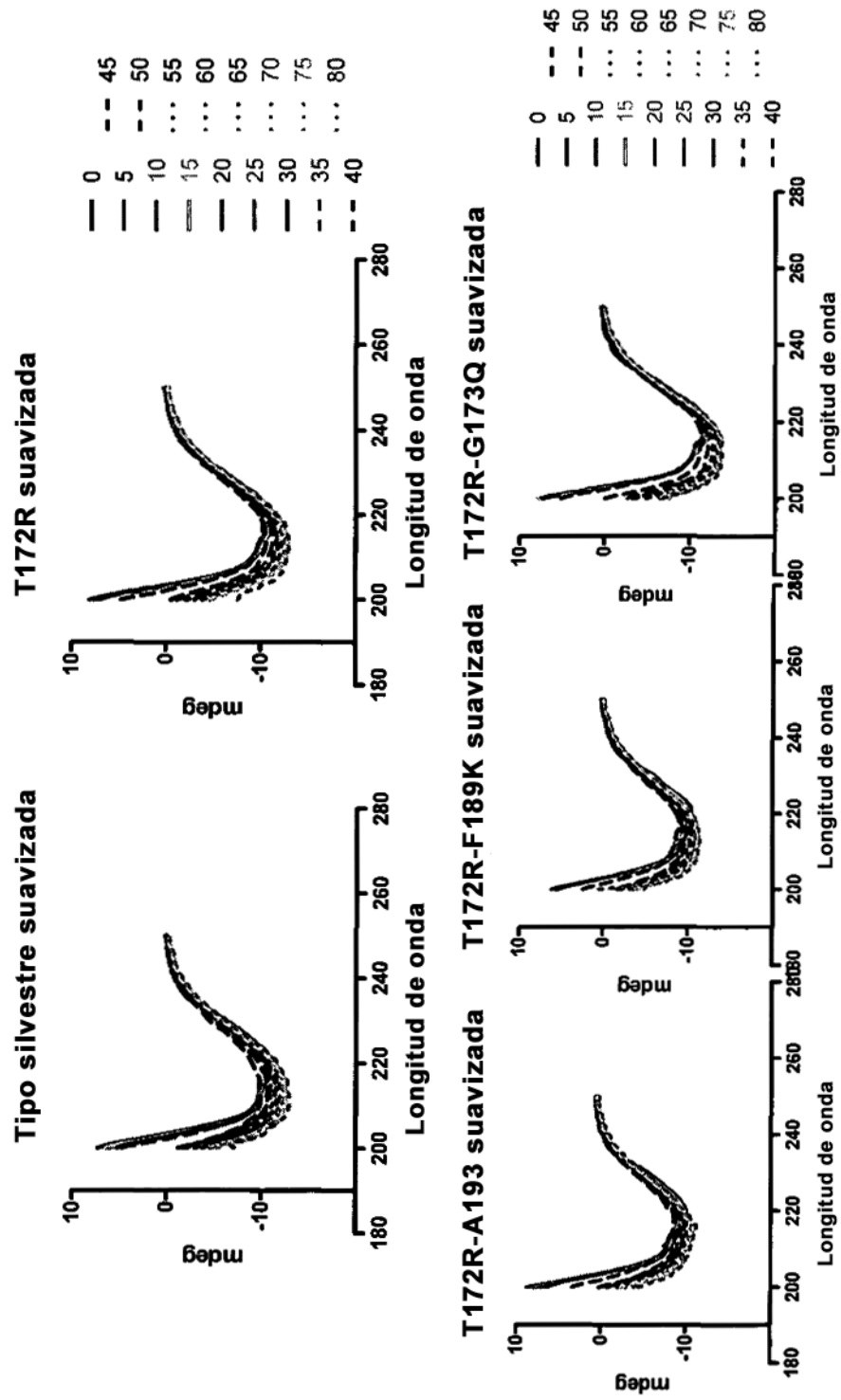


FIG. 29

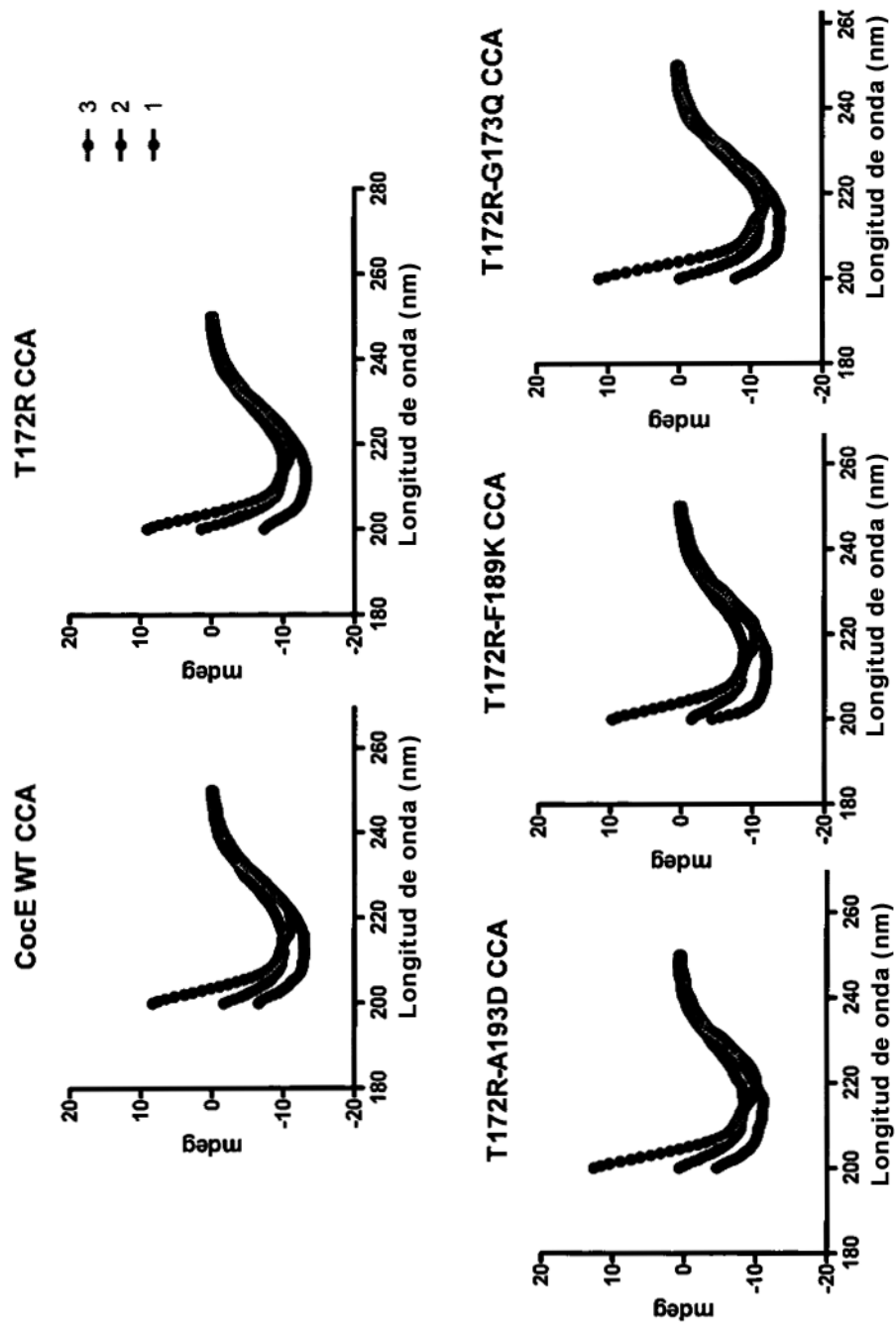


FIG. 30

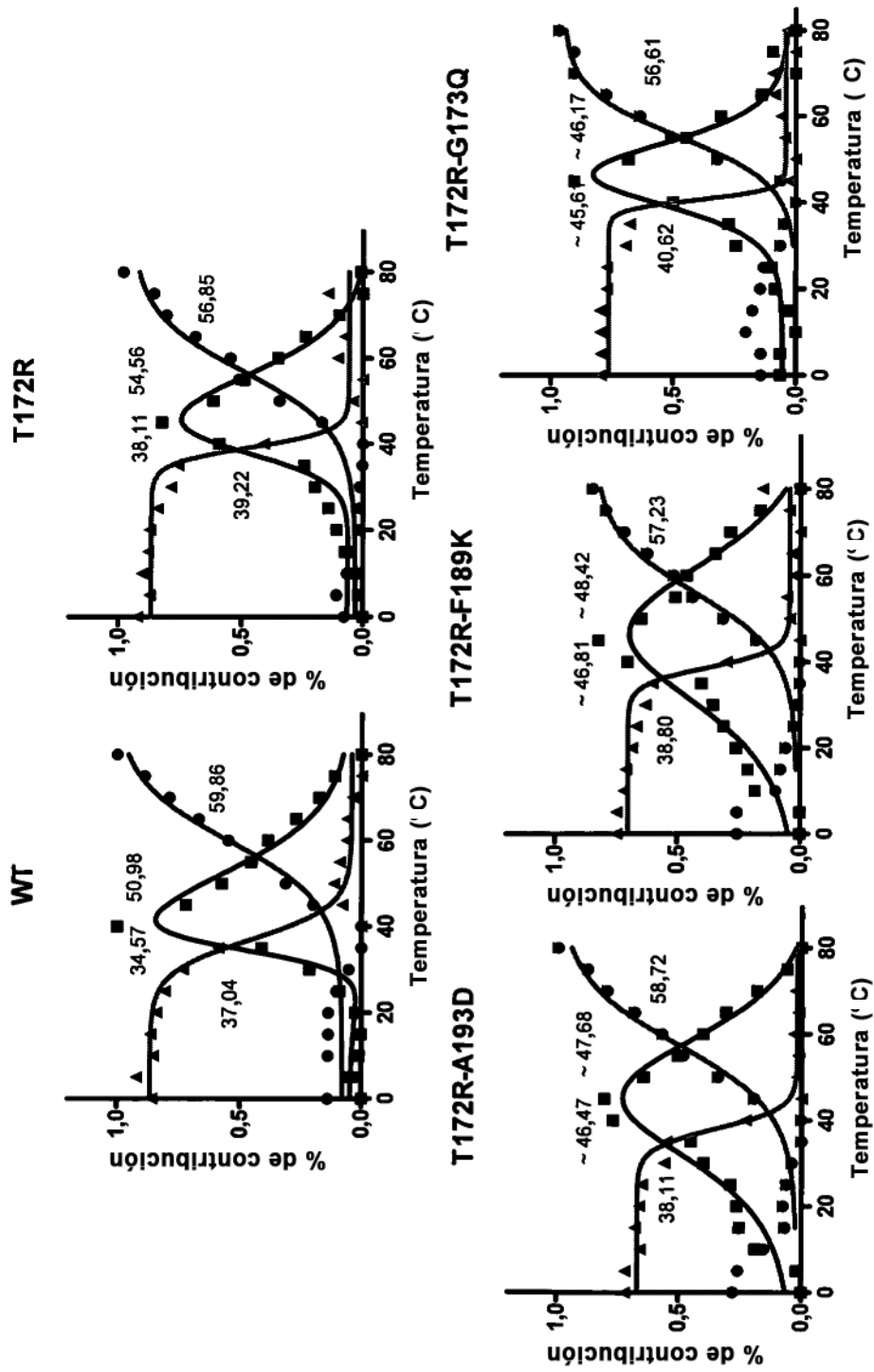


FIG. 31

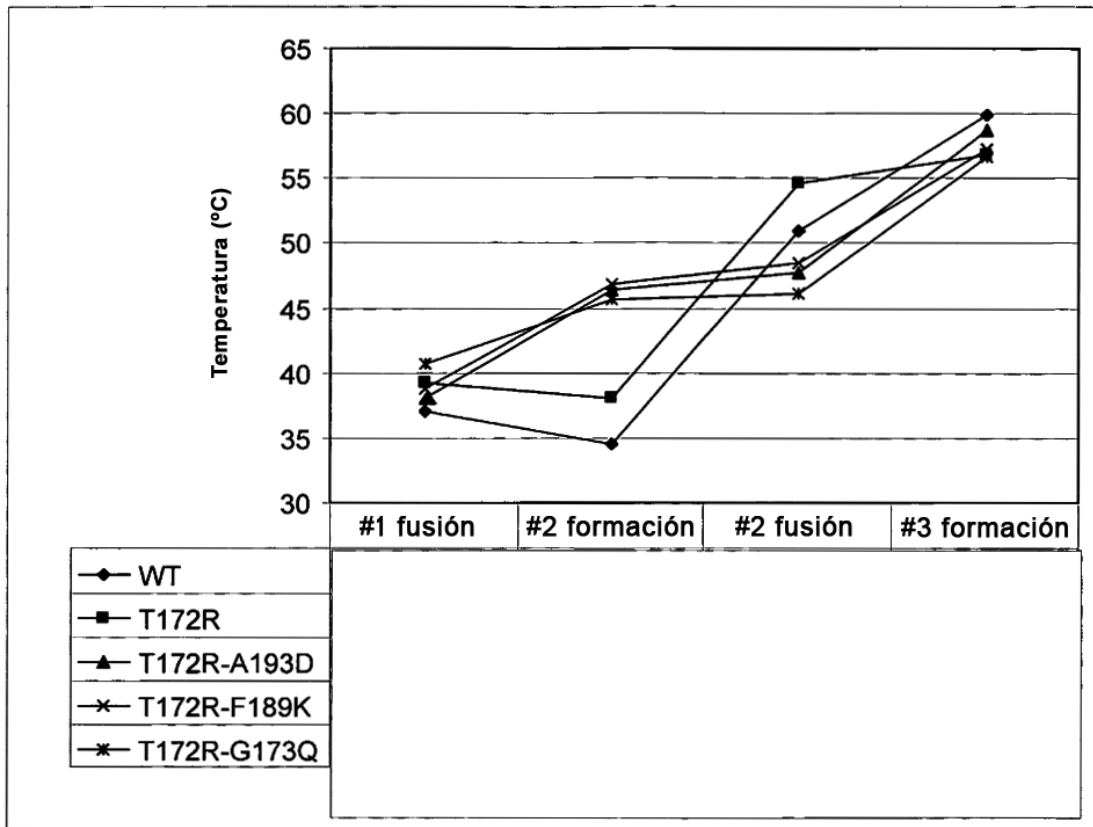


FIG. 32

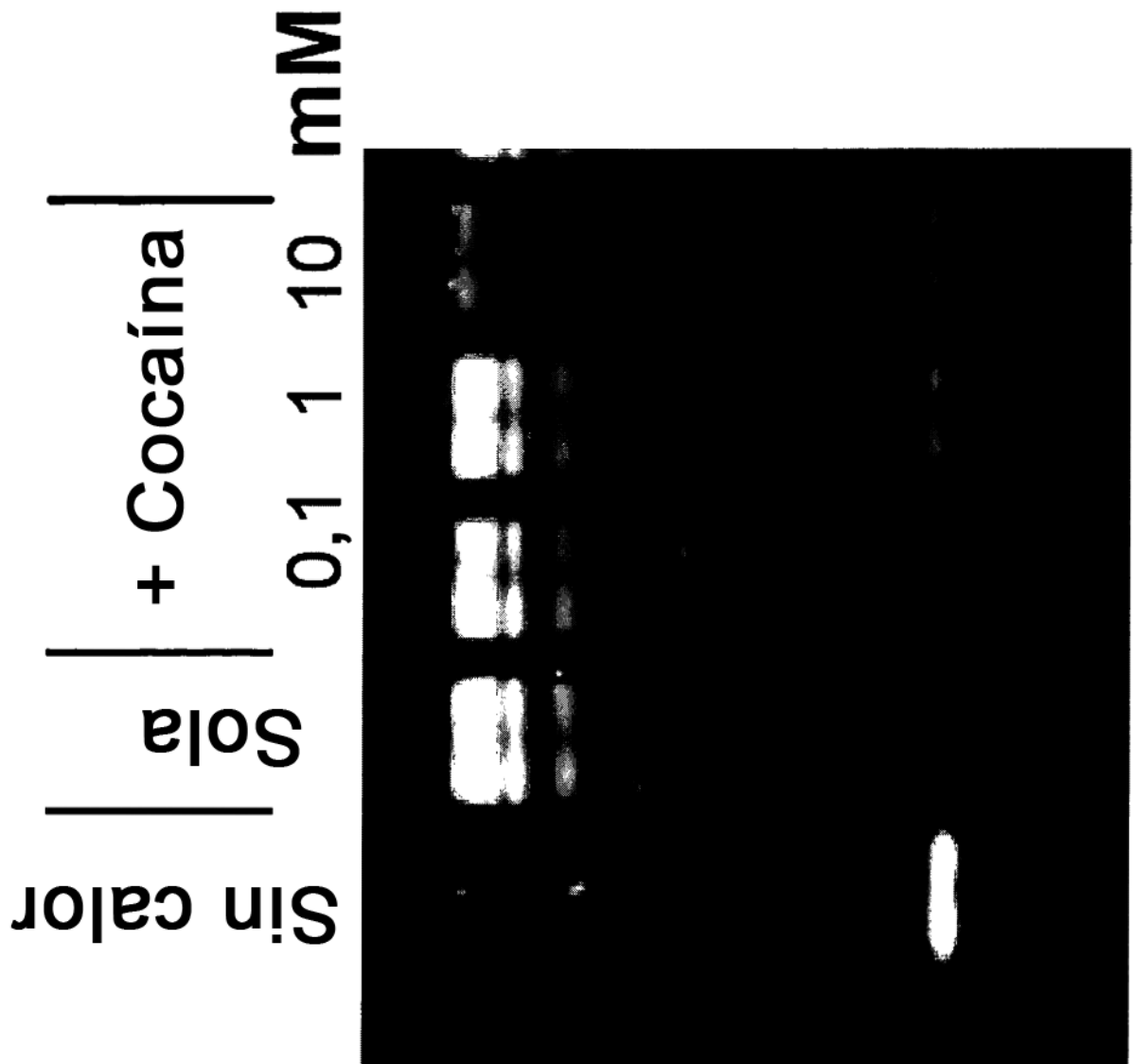


FIG. 33

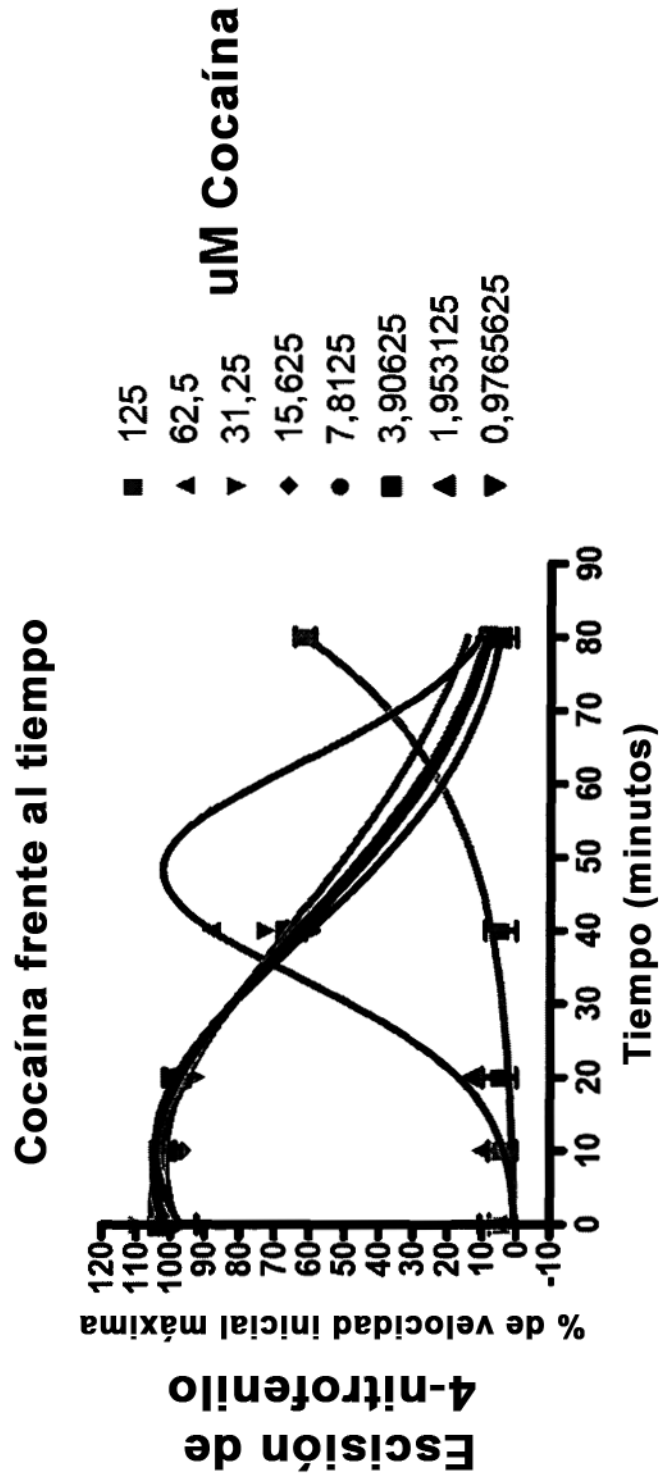


FIG. 34

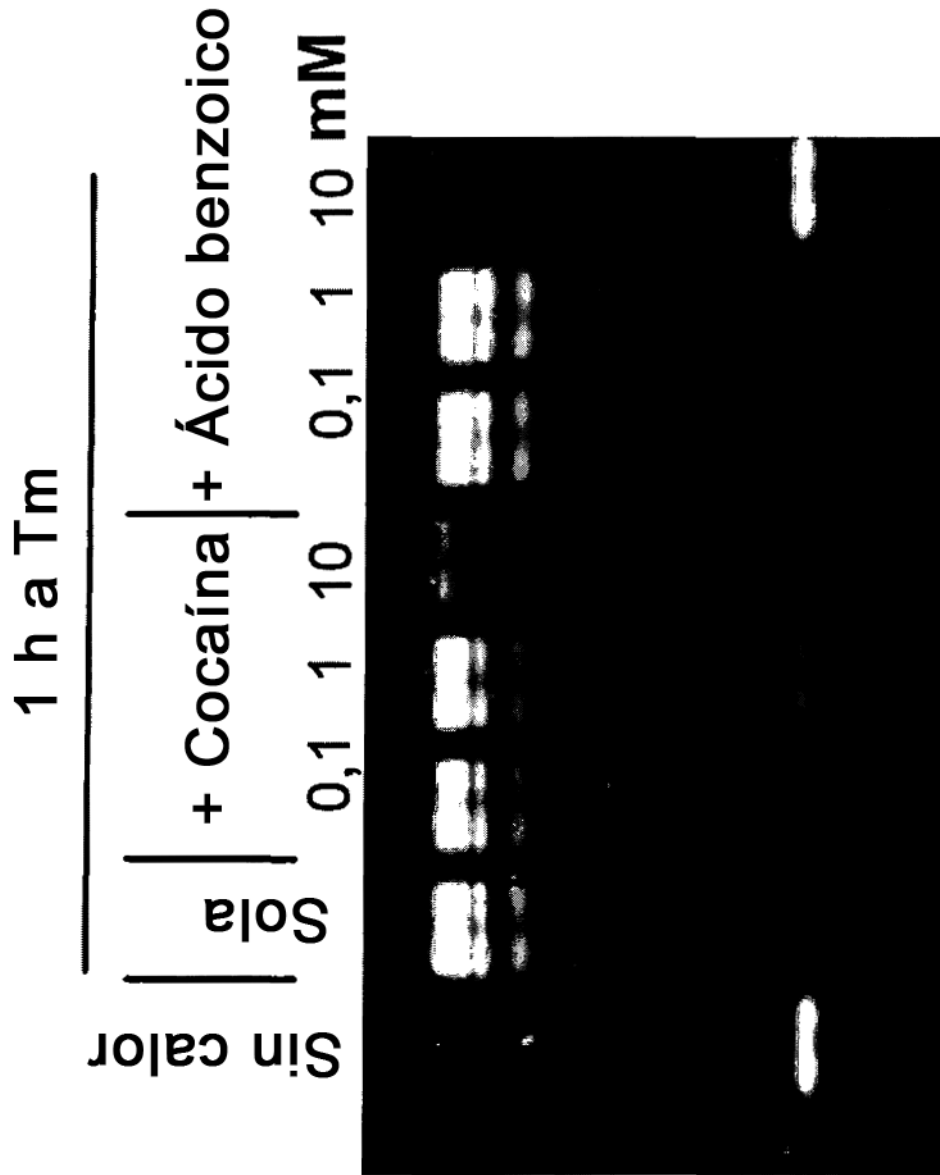
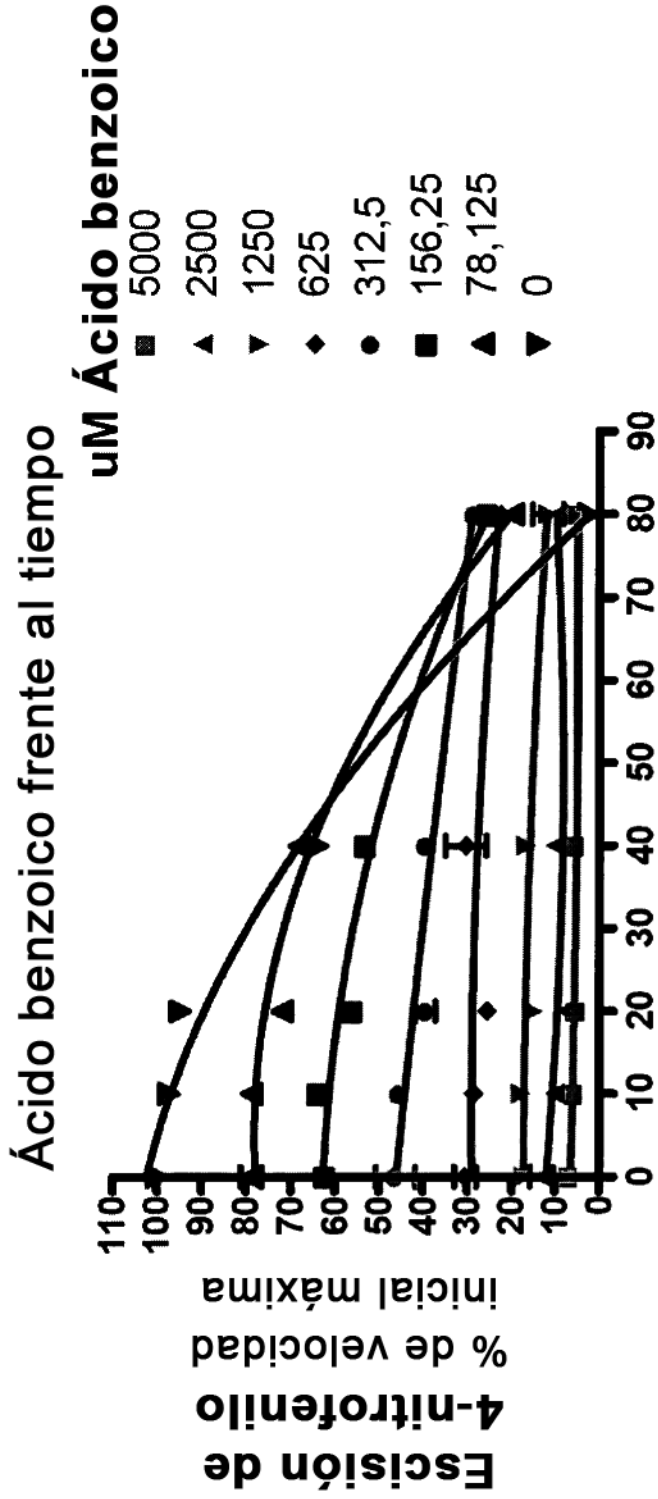


FIG. 35



Tiempo incubado a 37 C
(la actividad de escisión de 4NP
se debe reducir con el tiempo
a menos que esté estabilizado

FIG. 36