



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0055085
(43) 공개일자 2015년05월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/195 (2006.01) A61K 38/46 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01) C12N 9/18 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/195 (2013.01)
A61K 38/46 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7011002 (분할)
- (22) 출원일자(국제) 2007년07월10일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2009-7002743
원출원일자(국제) 2007년07월10일
심사청구일자 2012년07월10일
- (85) 번역문제출일자 2015년04월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2007/015762
- (87) 국제공개번호 WO 2008/008358
국제공개일자 2008년01월17일
- (30) 우선권주장
60/819,569 2006년07월10일 미국(US)
- (71) 출원인
더 트러스티이스 오브 콜롬비아 유니버시티 인 더 시티 오브 뉴욕
미국 뉴욕주 10027 뉴욕 535 웨스트 116쓰 스트리트 메일 코드 4308 로우 라이브러리 412
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 미시간
미국 48109 미시간주 앤 아버 세컨드 플로어 휴론 파크웨이 1600 오피스 오브 테크놀로지 트랜스퍼 유니버시티 오브 켄터키 리서치 파운데이션
미합중국 켄터키 40506-0286 렉싱턴 아스텍 빌딩 룸에이 144
- (72) 발명자
랜드리, 도날드
미국 10027 뉴욕주 뉴욕 아파트먼트 2-사우쓰 클 레어몬트 애비뉴 29
잔, 장-구오
미국 40523 켄터키주 렉싱턴 앨러게이니 웨이 2193
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장수길, 양영준

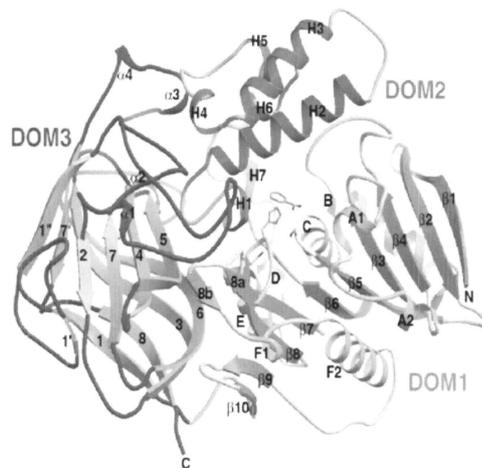
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 항-코카인 조성물 및 치료

(57) 요약

본원에 개시된 본 발명의 실시태양은 일반적으로 항-코카인 치료제에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명의 일부 실시태양은 대상에서 코카인의 독성 및 보강 효과에 대해 보호할 수 있는, 고도로 효율적이고 열 안정성이고 장기 지속성인 코카인 에스테라제(CocE) 돌연변이체에 관한 것이다. 열 안정성 에스테라제 활성을 나타내는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 본원에서 제공한다. 돌연변이체 CocE의 투여를 통해 그를 필요로 하는 대상에서 코카인-유도된 병태를 치료하는 방법, 및 후보 에스테라제 폴리펩티드의 고속 스크리닝을 위한 방법을 또한 제공한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 9/16 (2013.01)

C12N 9/18 (2013.01)

C12Y 301/01084 (2013.01)

G01N 33/573 (2013.01)

(72) 발명자

우즈, 제임스, 에이치.

미국 48109 미시건주 앤 아버 엠에스알비 3 1301
메디칼 스쿨 유니버시티 오브 미시건 디파트먼트
오브 파마콜로지

수나하라, 로저

미국 48104 미시건주 앤 아버 올리비아 애비뉴
1130

나라심한, 디와하, 엘.

미국 48104 미시건주 앤 아버 파인 벨리 볼레바드
#7 1507

맥도날드, 조앤

미국 10032 뉴욕주 뉴욕 아파트먼트 40 더블유.
156쓰 스트리트 605

양, 빅터

미국 48105 미시건주 앤 아버 탱글우드 드라이브
3629

코, 메이-추안, 홀든

미국 48109-0632 미시건주 앤 아버 엠에스알비 3
1301 메디칼 스쿨 유니버시티 오브 미시건 디파트
먼트 오브 파마콜로지

땡, 시-지안

미국 10605 뉴욕주 화이트 플레인스 오드겐 아베뉴
34

테스머, 존, 제이.

미국 48104 미시건주 앤 아버 어테어 로드 2450

리, 티엔-이

미국 48105 미시건주 앤 아버 #204에이 풀러 코트
2222

권, 영, 민

미국 48108 미시건주 앤 아버 #203 랜체로 드라이
브 3660

가오, 다쿠안

미국 40220 켄터키주 루이스빌 스톤리언 드라이브
3929

명세서

청구범위

청구항 1

돌연변이체 코카인 에스테라제 (CocE) 폴리펩티드가 야생형 CocE에 비해 37°C에서 열 안정성이 증가된 에스테라제 활성을 갖도록 적어도 하나의 아미노산 잔기가 치환된, 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 용도.

발명의 설명

기술분야

- [0001] <관련 출원에 대한 교차 참조>
- [0002] 본원은 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된 미국 가출원 60/819,569 (2006년 7월 10일 출원)를 기초로 한 우선권을 주장한다.
- [0003] <연방 정부의 지원을 받은 연구 또는 개발에 관한 언급>
- [0004] 본 발명은 부분적으로 NIDA Grant No. DA021416 하에 미국 정부의 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.
- [0005] <컴팩트 디스크 (COMPACT DISC)로 제출된 자료의 참조에 의한 포함>
- [0006] 본 명세서의 일부인 서열 목록은 컴퓨터 판독가능 형태 및 본 발명의 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열을 포함하는 서면 상의 서열 목록을 포함한다. 컴퓨터 판독가능 형태로 기록된 서열 목록 정보는 서면 상의 서열 목록과 동일하다. 서열 목록의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0007] 본원에 개시된 본 발명은 일반적으로 항-코카인 치료제에 관한 것이다.

배경기술

- [0008] 코카인 남용은 약물 요법을 통한 교정에 저항하는 고치기 어려운 사회 및 의료 문제이다. 코카인은 모노아민, 도파민, 노르에피네프린 및 세로틴의 재흡수를 차단하여, 중추 신경계에서 이들 신경전달물질의 효과를 연장시키고 증대하는 역할을 한다 (Benowitz NL (1993) Pharmacol Toxicol 72, 3-12). 코카인 독성은 신경전달물질계 및 심근 나트륨 채널 차단에 대한 효과 때문에 경련 및 심 기능장애 (예를 들어, 심근 경색, 심 부정맥, 혈압 증가, 뇌졸중 또는 박리 동맥류, 및 심근 산소 요구량 증가) 모두를 특징으로 한다 ([Bauman JL and DiDomenico RJ (2002) J Cardiovasc Pharmacol Ther 7, 195-202]; [Wilson LD and Shelat C (2003) J Toxicol Clin Toxicol 41, 777-788]; [Knuepfer MM (2003) Pharmacol Ther 97, 181-222]). 뇌혈액 장벽을 쉽게 가로지르는 코카인의 능력과 중추 및 말초 신경계에 대한 그의 광범한 효과 때문에, 과용은 돌연사를 일으킬 수 있다 (검토를 위해 [Bauman JL and DiDomenico RJ (2002) J Cardiovasc Pharmacol Ther 7, 195-202] 참조).
- [0009] 코카인의 작용 기전은 잘 알려져 있지만, 상기 정보를 이용하여 남용 및 과용 상황에서 사용할 수 있는 코카인의 효과적인 길항제는 아직까지 개발되지 않았다. 코카인의 급속한 다면발현 효과는 급성 코카인 독성의 치료에 복잡한 문제를 제시한다 (Carroll FI, Howell LL and Kuhar M.J (1999) J Med Chem 42, 2721-2736). 아편 유사제 남용의 치료에 유용가능한 2가지 종류의 요법, 즉 길항작용 (예를 들어, 날트렉손) 및 대체 (예를 들어, 메타돈)는 코카인의 경우와 유사하지는 않지만, 후자에 대한 시도가 고려되고 있다 (예를 들어, [J. Grabowski et al. (2004) Addictive Behaviors 29, 1439-1464] 참조). 하나의 방안은 내인성 에스테라제, 코카인 특이적 항체, 또는 촉매 활성의 항체를 투여함으로써 코카인이 작용 부위에 도달하는 것을 방지하거나 감소시키는 것이다.
- [0010] 자연 발생 코카인은 혈청 부티릴콜린에스테라제 (BChE)에 의해 벤조일 에스테르에서 가수분해되어 비독성 에코고닌 메틸 에스테르 및 벤조산으로 된다. 간에서, 카르복실에스테라제 hCE-2는 메틸 에스테르를 가수분해하여, 벤조일 에코고닌 및 메탄올을 생성한다 (예를 들어, 도 1 참조). 혈액 내의 코카인의 제거 반감기는 0.5 내지

1.5 hr이다 (T. Inaba (1989) Canadian Journal of Physiology & Pharmacology 67, 1154-1157). 코카인 붕괴를 증가시키기 위해 자연 발생 BChE 또는 유전공학으로 처리된 BChE를 사용하는 것이 일부 시도되었다 (예를 들어, 문헌 ([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 and Brimijoin S (2004) Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics 310, 1046-1052]; [Gao et al. (2005) Molecular Pharmacology 67, 204-211]) 참조). 다른 연구자들은 모노클로날 항체인 Mab 15A10을 코카인에 대한 촉매 활성의 항체로서 사용한 한편 (예를 들어, 문헌 ([Landry et al, 1993]; [Mets et al., 1998]; [Baird et al., 2000]; [Larsen et al., 2004] 참조), 다른 연구자들은 코카인 백신의 용도를 연구하고 있다 (예를 들어, 문헌 [Kosten et al. (2002) Vaccine 20, 1196-1204] 참조).

표 1

(-) 코카인에 대한 몇몇 코카인 가수분해 효소의 운동학

효소	Kcat (min ⁻¹)	Km (μM)	효율 (kcat/Km)	참고 문헌
BChE	4.1	4.5	9.1 x 10 ⁶	Sun et al., 2002a
Ala328W/Y332A	154	18	8.5 x 10 ⁶	Sun et al., 2002a
Mab15A10	2.2	220	1 x 10 ⁴	Larsen et al., 2004
AME 359	620	20	3.1 x 10 ⁷	Gao et al., 2005
CocE	468	0.64	7.2 x 10 ⁸	Turner et al., 2002

세균 로도코쿠스 (*Rhodococcus*) 종 MB 1 (코카나무를 둘러싼 토양에 토착성)은 그의 유일한 탄소 및 질소원으로 코카인을 이용하는 능력을 발달시켰다. 상기 세균은 코카인의 벤조일 에스테르를 가수분해하여, 에크고닌 메틸 에스테르 및 벤조산을 생성시키는 BChE와 유사하게 작용하는 코카인 에스테라제 (CocE)를 발현한다 (예를 들어, 도 1 참조) ([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, 17-21]). CocE에 대한 유전자가 단리되어 클로닝되었고 (Bresler et al. (2000) Appl Environ Microbiol 66, 904-908), CocE의 결정 구조가 결정되었다 ([Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307]; [Larsen et al. (2002) Nature Struct Biol 9, 17-21]). CocE의 구조 (예를 들어, 도 2 참조)는 결합하여 코카인 결합 포켓을 형성하는 2개의 다른 도메인에 추가로 고전적인 세린 에스테라제 폴드 (fold)를 보여준다. 활성 부위에서 촉매적 3작용기 (triad) 내의 임의의 3개의 아미노산 (Asp, His 또는 Ser)을 변경시키면 (검토를 위해 문헌 [Dodson G and Wlodawer A (1998) Trends Biochem Sci 23, 347-352] 참조) 코카인에 대한 에스테라제 활성을 불활성화시킨다. 또한, 코카인의 벤조에이트 모이어티와 접촉하도록 된 잔기 (예를 들어, Tyr44)의 돌연변이는 또한 아마도 전이 상태에서 옥시음이온 (oxyanion) 안정화를 손상시킴으로써 코카인 가수분해를 파괴한다 ([Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307]; [Larsen et al. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21]). 정제된 효소 (MW ~65kDa)는 미켈리스-멘텐 (Michaelis-Menten) 운동학 $k_{cat} = 7.2 \text{ s}^{-1}$ 및 $K_m = 640 \text{ nM}$ 으로 코카인을 매우 효율적으로 촉매하고 ([Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307]; [Larsen et al. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21]), 이는 내인성 에스테라제보다 3 크기 단위가 더 크고, 아마도 코카인을 과용한 인간을 해독시키기 위해 충분히 신속하게 작용할 것이다 ([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]). 추가로, 에스테라제는 또한 코카인 및 알코올의 강력한 대사물인 코카에틸렌을, 코카인을 대사하는 것과 거의 동일하게 효율적으로 대사한다 ($k_{cat} = 9.4 \text{ s}^{-1}$ 및 $K_m = 1600 \text{ nM}$) ([Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307]; [Larsen et al. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21]).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 항-코카인 치료제를 위해 안정한 CocE를 제공하는 것이 바람직할 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 한 측면은 적어도 하나의 아미노산 잔기가 치환된 야생형 CocE 아미노산 서열 (예를 들어, 서열 1)의 단리된 돌연변이체 코카인 에스테라제 (CocE) 폴리펩티드를 제공한다. 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 야생형 CocE에 비해 37°C에서 열 안정성이 증가된 에스테라제 활성을 갖는다.

[0015] 다양한 실시태양은 야생형 CocE 아미노산 서열의 적어도 2, 3, 4, 또는 5개 이상의 치환을 갖는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명의 범위 내에서 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 예는 서열 3 (L163V); 서열 7 (V225I); 서열 8 (I218L); 서열 9 (A310D); 서열 10 (A149S); 서열 11 (S159A); 서열 12 (S265A); 서열 13 (S56G); 서열 14 (W220A); 서열 16 (S140A); 서열 17 (F189L); 서열 18 (A193D); 서열 19 (T254R); 서열 20 (N42V); 서열 21 (V262L); 서열 22 (L508G); 서열 23 (Y152H); 서열 24 (V160A); 서열 25 (T172R); 서열 26 (Y532F); 서열 27 (T74S); 서열 28 (W285T); 서열 29 (L146P); 서열 30 (D533S); 서열 31 (A194R); 서열 32 (G173Q); 서열 33 (C477T); 서열 34 (K531A); 서열 35 (R41I); 서열 36 (L119A); 서열 37 (K46A); 서열 38 (F84Y), T172R-G173Q (서열 39); L169K (서열 40); F189A (서열 41), N197K (서열 42), R182K (서열 43), F189K (서열 44), V190K (서열 45), Q191K (서열 46), 및 A194K (서열 47)의 아미노산 서열을 갖는 것, 또는 그의 기능성 단편(들)을 포함한다. 추가의 예시적인 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 F189A/T172R, T172R/A193D, T172R/G173Q-I175-G-G-A186, T172R/G173Q-T176-G-G-D185 등을 포함한다. 명명 규칙 및 본원에 개시된 폴리펩티드 서열을 고려하여, 당업자는 상기 열거한 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 폴리펩티드 서열을 결정할 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 측면은 본 발명의 범위 내의 돌연변이체 CocE 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 그 성분 중에 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 다른 측면은 본원에 기재된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 다양한 실시태양에서, 핵산은 높은 엄격성 조건 하에 야생형 CocE를 코딩하는 핵산 (예를 들어, 서열 2), 또는 그의 상보체에 혼성화하는 서열을 갖는 것을 포함한다. 상기 단리된 핵산은 야생형 CocE에 비해 37°C에서 열 안정성이 증가된 에스테라제 활성을 갖는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 코딩한다. 단리된 핵산 서열의 다양한 실시태양은 야생형 CocE의 핵산 서열 (예를 들어, 서열 2)과 적어도 약 85%의 서열 동일성을 갖는다. 예를 들어, 단리된 핵산 서열은 야생형 CocE (예를 들어, 서열 2)와 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 및 99%의 서열 동일성을 갖는다.

[0018] 다양한 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드 (또는 본 발명의 범위 내의 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드)는 야생형 CocE에 비해 증가된 용점을 갖는다. 다양한 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드 (또는 본 발명의 범위 내의 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드)는 야생형 CocE에 비해 돌연변이체 CocE 폴리펩티드 열 안정성을 적어도 약 2.0 kcal/mol 증가시킨다. 예를 들어, 증가된 열 안정성은 적어도 약 2.1 kcal/mol, 적어도 약 2.2 kcal/mol, 적어도 약 2.3 kcal/mol, 적어도 약 2.4 kcal/mol, 적어도 약 2.5 kcal/mol, 적어도 약 2.6 kcal/mol, 적어도 약 2.7 kcal/mol, 적어도 약 2.8 kcal/mol, 적어도 약 2.9 kcal/mol, 적어도 약 3.0 kcal/mol, 적어도 약 3.1 kcal/mol, 적어도 약 3.2 kcal/mol, 적어도 약 3.3 kcal/mol, 적어도 약 3.4 kcal/mol, 적어도 약 3.5 kcal/mol, 적어도 약 3.6 kcal/mol, 적어도 약 3.7 kcal/mol, 적어도 약 3.8 kcal/mol, 적어도 약 3.9 kcal/mol, 적어도 약 4.0 kcal/mol, 적어도 약 4.1 kcal/mol, 적어도 약 4.2 kcal/mol, 적어도 약 4.3 kcal/mol, 적어도 약 4.4 kcal/mol, 또는 적어도 약 4.5 kcal/mol일 수 있다.

[0019] 다양한 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드 (또는 본 발명의 범위 내의 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드)는 야생형 CocE에 비해 감소된 면역원성을 갖는다.

[0020] 일부 실시태양에서, 열 안정성 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 야생형 CocE보다 더 작은 에스테라제 활성을 갖는다. 예를 들어, 열 안정성 CocE 돌연변이체는 야생형 CocE의 에스테라제 활성의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 99%를 가질 수 있다. 다른 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 야생형 CocE 폴리펩티드와 대략 동일하거나 더 큰 촉매 효율을 갖는다. 예를 들어, 열 안정성 CocE 돌연변이체는 야생형 CocE의 에스테라제 활성의 약 100%, 약 110%, 약 120%, 약 130%, 약 140%, 또는 약 150% 이상을 가질 수 있다.

[0021] 다양한 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 폐길화 (pegylation)된다. 다양한 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 적혈구 내에 봉입 (encapsulation)된다. 예를 들어, 폐길화된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드

티드(들) (또는 폐길화된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드(들)을 포함하는 제약 조성물)은 RBC 내에 봉입될 수 있다.

- [0022] 일부 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 기질, 산물, 및/또는 억제제에 의해 안정화된다.
- [0023] 본 발명의 다른 측면은 코카인-유도된 병태를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법에서, 본 발명의 범위 내의 치료 유효량의 돌연변이체 CocE 폴리펩티드(들) (또는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드(들)을 포함하는 제약 조성물)은 그를 필요로 하는 대상에게 투여된다. 다양한 실시태양에서, 코카인-유도된 병태는 코카인 과용, 코카인 독성, 코카인 중독, 코카인 의존, 및/또는 그의 일부 조합을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 또다른 측면은 열 안정성 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 확인을 위한 고속 (high throughput) 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 스크리닝 방법에서, 세포는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드 후보를 코딩하는 핵산으로 안정적으로 형질전환된다. 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 세포에서 발현된다. 발현된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 단리되거나 나타난다. 단리된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 열 안정성을 결정하기 위해서 단리된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 에스테라제 활성을 하나 이상의 온도에서 측정한다. 상기 온도(들)은 약 30°C 내지 약 50°C일 수 있다. 소정의 온도(들)에서 에스테라제 활성을 갖는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 선택한다.
- [0025] 스크리닝 방법의 일부 실시태양에서, 단리된 돌연변이체 폴리펩티드의 에스테라제 활성의 측정은 단리된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 (i) 코카인 및 pH 인디케이터 또는 (ii) 코카인의 티오-유도체 및 티올 인디케이터와 접촉시켜 수행할 수 있다. 이어서, pH 인디케이터 또는 티올 인디케이터에서의 임의의 변화가 검출된다. 상기 변화는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드에 의한 코카인 또는 코카인 유도체의 가수분해를 통한 벤조산의 형성과 상호관련된다.
- [0026] 스크리닝 방법의 일부 실시태양은 에스테라제 활성을 측정하기 위한 증가하는 온도에서 스크리닝 절차의 사이클을 복수회 수행하는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 제1 사이클에서는 약 30°C의 에스테라제 활성을 측정하기 위한 온도를 사용할 수 있는 반면에, 후속 사이클에서는 약 45°C의 에스테라제 활성을 측정하기 위한 온도를 사용할 수 있다.
- [0027] 스크리닝 방법의 일부 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 발현은 야생형 CocE가 촉매 활성을 실질적으로 보유하는 온도에서 일어난다. 스크리닝 방법의 다른 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 발현은 야생형 CocE 폴리펩티드가 실질적으로 봉입체 (inclusion body) 내로 분배되는 온도에서 일어난다. 예를 들어, 발현 온도는 적어도 약 35°C, 적어도 약 36°C, 적어도 약 37°C, 적어도 약 38°C, 적어도 약 39°C, 또는 적어도 약 40°C일 수 있다.
- [0028] 다른 목적 및 특징은 부분적으로 자명할 것이고, 부분적으로 아래에서 제시될 것이다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명자들은 대상에서 코카인의 독성 및 강화 (reinforcing) 효과에 대해 보호할 수 있는, 고도로 효율적이고 열 안정성이며 장기 지속성인 코카인 에스테라제 돌연변이체를 발견하는데 성공하였다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 당업자는 아래에 설명되는 도면이 단지 예시를 위한 것임을 이해할 것이다. 도면은 본 발명의 범위를 어떠한 방식으로든 제한하고자 하는 것이 아니다.

도 1은 다양한 효소 반응에 의한 코카인의 대사를 설명하는 도면이다.

도 2는 CocE 구조를 설명하는 리본도 (ribbon)이다. 도메인 1 (DOM1), 도메인 2 (DOM2) 및 도메인 3 (DOM3)이 3개의 도메인의 교점에 위치하는 활성 부위와 함께 표시된다. 벤조산 분자가 활성 부위에서 보인다.

도 3은 FPLC (Q-Sepharose)에 의한 CocE에 대한 용출 프로파일을 도시하는 선 플롯 (line plot)이고, 여기서 UV 흡광도 및 염화나트륨 농도가 시간 경과에 따라 도시된다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 1을 참조한다.

도 4는 인간 혈장에서 CocE의 존재 하에 코카인의 시험관내 분해를 보여주는 선 및 산점 (scatter) 플롯이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 2를 참조한다.

도 5는 30°C 및 37°C에서 수행된 반응에 대한 야생형 CocE, T172R 돌연변이체 CocE (서열 26), 및 S159A 돌연

변이체 CocE (서열 11)에 대한 미켈리스-멘텐 효소 운동학 플롯이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 4를 참조한다.

도 6은 다양한 시점 동안 37C에서 인큐베이션 후 변성 (SDS+βMe) 또는 비-변성 (천연) 조건을 사용하는 야생형 및 T172R 돌연변이체 CocE의 PAGE 분리 후 총 단백질 염색의 사진 세트이다. 보다 많은 정보에 대해서는 실시예 4를 참조한다.

도 7은 야생형 및 T172R CocE의 용점을 결정하는 원 편광2색성 (circular dichroism)을 도시하는 선 플롯이다. 전체 스펙트럼을 A에 도시하고, 근-UV 스펙트럼을 B에 도시하고, 각각의 돌연변이체에 대한 추정된 용점을 C에 도시한다. 보다 많은 정보에 대해서는 실시예 4를 참조한다.

도 8은 (A) 코카인 (티오-1) 및 데스-카르보메톡시 코카인 (티오-2)의 벤조일티오에스테르 유도체의 가수분해에 이어, 방출된 티올 (R-SH)과 엘만 (Ellman) 시약과의 반응의 도면; 및 (B) 벤조일티오에스테르 유도체 (티오-1) 및 엘만 시약과 함께 인큐베이션한 대조 BL21 세포 및 CocE를 함유하는 BL21 세포의 비색 반응을 보여주는 선 플롯을 포함한다. 보다 많은 정보에 대해서는 실시예 15를 참조한다.

도 9는 증가 용량의 코카인의 1분 후에 투여될 때 (n = 6-7) 코카인-유도 치사율에 대한 1.0 mg CocE (단한 원) 또는 PBS (비히클, 열린 원)의 효과를 보여주는 선 및 산점 플롯이다. 제시된 데이터는 % 및 그의 표준 오차로서 표현된다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 5를 참조한다.

도 10은 180 mg/kg 코카인의 1분 전에 투여될 때 (n = 6-7) 코카인-유도 치사율에 대한 증가 용량의 CocE (CE) 또는 인간 BChE (BChE), 또는 PBS의 효과를 보여주는 막대 그래프이다. 제시된 데이터는 % 및 그의 표준 오차로서 표현된다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 5를 참조한다.

도 11은 180 mg/kg 코카인의 1분 전에 투여될 때 (n = 5-6) 코카인-유도된 경련 및 치사율에 대한 CocE 돌연변이체 S117A 및 Y44F, 또는 PMSF 처리된 CocE의 효과를 보여주는 막대 그래프이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 5를 참조한다.

도 12는 화합물의 결정된 LD100인 560 mg/kg WIN-35065-2의 1분 후 투여된 (n = 6-8) 1.0 mg CocE 또는 PBS의 효과를 보여주는 막대 그래프이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 5를 참조한다.

도 13은 시험관 내에서 CocE (125 ng/ml)의 시간-의존 불활성화를 보여주는 선 및 산점 플롯이다. 지수 붕괴 (Exponential decay) $t_{1/2}$ 은 13.2로서 계산되었다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 6을 참조한다.

도 14는 100 mg/kg 코카인의 전후의 다양한 시간에 투여될 때 (n = 6-8) 1 mg CocE의 시간-의존 보호 효과를 보여주는 막대 그래프이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 6을 참조한다.

도 15는 에스테라제 투여의 0 및 1분 후에 0.8 μM 코카인 에스테라제 또는 에스테라제 비히클로 처리한 인간 혈장 내의 코카인 농도를 보여주는 막대 그래프이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 6을 참조한다.

도 16은 증가하는 용량의 코카인의 1분 후에 투여될 때 코카인-유도 치사율에 대한 0.32 mg CocE (단한 원), 0.32 mg의 T172R 돌연변이체 CocE (단한 삼각형), 또는 PBS (비히클, 열린 원)의 효과 (좌측 패널), 및 코카인 투여 후 사망까지의 분 (우측 패널)을 보여주는 일련의 선 및 산점 플롯이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 7을 참조한다.

도 17은 320 mg/kg 코카인의 투여 1, 10, 30, 및 60분 전에 투여될 때 (n=6) 코카인-유도 치사율에 대한 0.32 mg/kg의 CocE (단한 원) 또는 T172R 돌연변이체 CocE (단한 삼각형)의 효과를 보여주는 선 및 산점 플롯이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 7을 참조한다.

도 18은 코카인-유도 치사율에 대한 1 mg의 hBChE (단한 삼각형), 0.32 mg CocE (단한 원), 또는 1 mg의 CocE (단한 사각형)의 효과를 보여주는 일련의 선 및 산점 플롯이다. 도 18A는 치사율을 코카인 농도의 함수로서 도시한 것이다. 도 18B는 코카인 투여 후 사망까지의 분을 코카인 농도의 함수로서 도시한 것이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 8을 참조한다.

도 19는 폐결화된 CocE의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼의 흔적 (trace)이다. 피크들 사이의 질량 차이는 ~5500 Da에 대응하고; 단일 PEG 사슬의 분자량과 동등하다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 11을 참조한다.

도 20은 글루타르알데히드 고정된 적혈구의 SEM 영상이다. 도 20A는 처리하지 않은 정상 RBC이다. 도 20B는 L-ASNase를 로딩한 삼투압 파열-재밀봉 RBC이다. 도 20C는 LMWP-ASNase를 로딩한 RBC이다. 추가의 방법 정보

에 대해서는 실시예 12를 참조한다.

도 21은 RBC/LMP-ASNase 또는 RBC 고스트 (ghost)/ASNase에 대한 혈액 내의 아스파라기나제 활성 %를 시간 (일)의 함수로서 보여주는 산점 플롯이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 12를 참조한다.

도 22는 L5178Y 림프종 세포를 보유하는 DBA/2 마우스의 생존을 보여주는 선 플롯이다. 효소 또는 염수를 제5일에 제공하고, 이때 증상이 나타났다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 12를 참조한다.

도 23은 코카인-유도 독성에 대한 CocE 및 그의 돌연변이체의 보호 효과를 입증하는 선 및 산점 플롯이다. 도면은 야생형 CocE (0.3 mg), T172R (0.3 mg), T172R-G173Q (0.3 mg), 또는 L169K (1 mg)를 투여한 마우스에서 코카인-유도 치사율을 주사된 코카인 농도의 함수로서 나타내는 마우스 치사율의 비율을 보여준다. CocE 또는 돌연변이체 (mg)를 코카인 투여 (mg/kg, i.p.) 1분 전에 정맥내 투여하였다. 상이한 기호는 CocE 또는 돌연변이체의 부재 또는 존재 하에 코카인-유도 치사율의 용량-반응 곡선을 나타낸다. 각각의 데이터 점은 코카인-유도 치사율을 나타내는 마우스 (각각의 투여 조건에 대해 n=8)의 비율을 나타낸다.

도 24는 코카인 독성에 대한 CocE의 보호 효과의 시간 경로를 보여주는 일련의 선 및 산점 플롯이다. CocE 또는 돌연변이체 (0.1, 0.3 및 1 mg, i.v.)를 코카인 180 mg/kg의 i.p. 투여 전에 상이한 시점에 투여하였다. 도 24A는 코카인 180 mg/kg의 i.p. 투여 전에 야생형 CocE (0.1 mg), T172R (0.1 mg), L169K (0.1 mg), 또는 T172R-G173Q (0.1 mg)의 투여 시간의 함수로서 코카인-유도 치사율을 나타내는 마우스의 비율을 도시한 것이다. 도 24B는 코카인 180 mg/kg의 i.p. 투여 전에 야생형 CocE (0.3 mg), T172R (0.3 mg), L169K (0.3 mg), 또는 T172R-G173Q (0.1 mg)의 투여 시간의 함수로서 코카인-유도 치사율을 나타내는 마우스의 비율을 도시한 것이다. 도 24C는 코카인 180 mg/kg의 i.p. 투여 전에 야생형 CocE (1 mg), T172R (1 mg), L169K (1 mg), 또는 T172R-G173Q (1 mg)의 투여 시간의 함수로서 코카인-유도 치사율을 나타내는 마우스의 비율을 도시한 것이다. 각각의 데이터 점은 코카인-유도 치사율을 나타내는 마우스 (각각의 투여 조건에 대해 n=8)의 비율을 나타낸다.

도 25는 50% 치사를 위한 추정된 보호 지속시간을 보여주는 선 및 산점 플롯이다. 도면은 마우스에서 CocE 돌연변이체의 추정된 보호 (50% 치사율) 지속시간 (시간)을 T172R-G173Q, L169K, T172R, 및 야생형 CocE의 투여량 (mg, i.v.)의 함수로서 도시한 것이다. 50% 치사율에 도달하기 위해 필요한 시간은 도 24로부터 결정하였다.

도 26은 코카인-유도 독성에 대한 CocE, T172R-G173Q, 및 그들의 폐길화된 형태의 보호 효과를 입증하는 일련의 선 및 산점 플롯이다. 각각의 효소 (0.3 mg)를 코카인 투여 (mg/kg, i.p.) 1분 전에 정맥내 투여하였다. 상이한 기호는 효소의 부재 또는 존재 하에 코카인-유도 치사율의 용량-반응 곡선을 나타낸다. 각각의 데이터 점은 코카인-유도 치사율을 나타내는 마우스 (각각의 투여 조건에 대해 n=8)의 비율을 나타낸다. 도 26A는 치사 발생%를 비히클/PBS, CocE 야생형 (0.3 mg), 및 PEG-CocE 야생형 (0.3 mg)에 대한 코카인 투여량 (mg/kg, i.p.)의 함수로서 도시한 것이다. 도 26B는 치사 발생%를 비히클/PBS, T172R-G173Q (0.3 mg), 및 PEG-T172R-G173Q (0.3 mg)에 대한 코카인 투여량 (mg/kg, i.p.)의 함수로서 도시한 것이다.

도 27은 코카인 에스테라제 및 돌연변이체, 즉 (A) 야생형 CocE, (B) T172R, (C) T272R/G173Q 및 L169K의 열안정성을 보여주는 일련의 선 및 산점 플롯이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 17을 참조한다.

도 28은 37°C에서 0분 또는 60분 동안 예비인큐베이션하고, 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분리한 효소를 보여주는 일련의 크로마토그램이다. (A) 야생형 CocE, (B) T172R, (C) T172R/G173Q. 분자량 표준품인 BSA (66 kDa) 및 AD (150 kDa)를 A에 포함시켰다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 18을 참조한다.

도 29는 200 내지 250 nm에서 관찰된 온도의 의존 용융을 보여주는 야생형 CocE 및 4개의 돌연변이체의 일련의 평탄화된 (smoothed) CD 스펙트럼이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 19를 참조한다.

도 30은 CCA 알고리즘을 통해 3개의 곡선으로 디컨볼루션된 (deconvoluted) 야생형 CocE 및 4개의 돌연변이체에 대한 일련의 스펙트럼이고, 이는 CocE의 용융이 원래의 곡선 (곡선 1)으로부터 중간 언폴딩 (unfolding) 단계 (곡선 2)에서 완전 변성된 단백질 (곡선 3)로 이동하는 적어도 2-단계 과정을 제안한다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 19를 참조한다.

도 31은 도 30에 도시된 3개의 디컨볼루션된 CCA 곡선을 설명하는데 있어서 각각의 온도의 기여%를 보여주는 일련의 선 및 산점 플롯이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 19를 참조한다.

도 32는 (1) 초기 스펙트럼 용융, (2) 중간 상태의 형성 및 용융, 및 (3) 완전 용융된 단백질의 축적에 대한 용

용 및 형성 온도를 보여주는 선 및 산점 플롯이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 19를 참조한다.

도 33은 코카인 (mM 범위)이 고분자량 CocE 응집물 (0.1 mg/ml 효소 농도)의 37°C-유도된 형성을 방지하였음을 보여주는 겔의 사진이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 20을 참조한다.

도 34는 코카인 (μM 양)이 37°C-유도된 활성 손실을 안정화시킨 것을 보여주는 선 및 산점 플롯이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 20을 참조한다.

도 35는 벤조산 (mM 범위)이 고분자량 CocE 응집물 (0.1 mg/ml 효소 농도)의 37°C-유도된 형성을 방지한 것을 보여주는 겔의 사진이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 20을 참조한다.

도 36은 코카인 (μM 양)이 37°C-유도된 활성 손실을 안정화시킨 것을 보여주는 선 및 산점 플롯이다. 추가의 방법 정보에 대해서는 실시예 20을 참조한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본원에 개시된 본 발명의 실시태양은 항-코카인 치료제 개발을 위한 촉매에 의한 분해 방안을 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본원에 기재된 기술은 부분적으로는 대상에서 코카인의 독성 및 강화 효과에 대해 보호할 수 있는, 고도로 효율적이고 열 안정성이고 장기 지속성인 코카인 에스테라제 돌연변이체의 발견을 기초로 한다. 상기 돌연변이체는 코카인-유도된 병태, 예를 들어 코카인 과용 및 코카인 중독에 대한 치료 선택권을 제공한다.

[0032] 돌연변이체 CocE 폴리펩티드

[0033] 코카인 대사에 있어서 야생형 CocE (예를 들어, 서열 1, 기탁 번호 AF173165 참조)의 효능에도 불구하고 (예를 들어, 실시예 2; 실시예 4; 실시예 5 참조), 코카인 과용의 치료에서 야생형 CocE의 치료제로서의 적용은 생리학적 온도에서의 그의 낮은 열 안정성 때문에 제한될 수 있다 (예를 들어, 실시예 4; 실시예 6 참조). 열-불안정성은 야생형 CocE의 짧은 혈장 반감기에 기여한다. CocE 활성의 유의한 감소 (>50%)는 37°C에서 혈장 중에서 효소의 인큐베이션 후에, 또는 마우스 내로의 그의 정맥내 투여 후에 관찰되었다. 37°C에서 CocE의 $t_{1/2}$ 는 대략 15분인 반면에, 4°C에서 $t_{1/2}$ 는 6개월을 초과한다. 래트에서의 예비 연구는 CocE에 대해 30분에 불과한 항-코카인 효과의 비교적 짧은 지속시간을 보였다.

[0034] 따라서, 본 발명의 한 측면은 야생형 CocE에 비해 증가된 열 안정성 및 혈장 반감기를 보이는 정제된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명의 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 코카인을 효율적으로 가수분해하면서, 동시에 증가된 열 안정성 및/또는 혈장 반감기를 보이는 이들의 능력 때문에 임상적으로 유의한 가치를 갖는다.

[0035] 본 발명은 야생형 CocE의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 치환된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 돌연변이체 CocE는 비교적 높은 촉매 효율을 보유하면서 증가된 열 안정성을 갖는다. 일부 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 실질적으로 야생형 CocE 폴리펩티드의 기능적 에스테라제 활성 (즉, 코카인의 가수분해)을 유지한다. 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 하나 이상의 아미노산이 천연 CocE 폴리펩티드와 상이한 펩티드 서열을 갖는다. 상기 돌연변이체의 펩티드 서열은 천연 CocE 폴리펩티드의 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실, 또는 부가를 특징으로 한다. 아미노산 삽입은 바람직하게는 약 1, 2, 3, 및 4 내지 5개의 인접하는 아미노산의 삽입이고, 결실은 바람직하게는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 및 9 내지 10개의 인접하는 아미노산의 결실이다. 다양한 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 적어도 1, 2, 3, 또는 4개 이상의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 포함할 수 있고, 여기서 생성되는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 증가된 열 안정성을 갖는다.

[0036] 본원에서 사용되는 용어 아미노산은 자연 발생 아미노산뿐만 아니라 아미노산 유사체 및 유도체를 포함하는 비-자연 발생 아미노산을 포함하는 의미이다. 유사체 등은 아미노산 모이어티 (moiety)를 포함하는 분자를 포함한다. 당업자는 본원에서 아미노산에 대한 언급이 예를 들어 자연 발생 단백질원성 (proteogenic) L-아미노산; D-아미노산; 화학적으로 변형된 아미노산, 예를 들어 아미노산 유사체 및 유도체; 자연 발생 비-단백질원성 아미노산, 및 아미노산에 특징적인 당업계에 공지된 특성을 갖는 화학적으로 합성된 화합물을 포함함을 인식할 것이다. 본원에 개시된 모든 아미노산 서열에 대해, 동등한 뉴클레오티드 및 아미노산이 서열의 기능에 영향을 주지 않으면서 서열 내로 치환될 수 있음이 이해된다. 상기 치환은 당업자의 능력 범위 내에서 수행할 수 있는 것이다.

- [0037] 본 발명은 또한 다음 치환을 갖는 정제된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 제공한다: L163V (서열 3); V121D (서열 4); S167A (서열 5); Q123E (서열 6); V225I (서열 7); I218L (서열 8); A310D (서열 9); A149S (서열 10); S159A (서열 11); S265A (서열 12); S56G (서열 13); W220A (서열 14); T122A (서열 15); S140A (서열 16); F189L (서열 17); A193D (서열 18); T254R (서열 19); N42V (서열 20); V262L (서열 21); L508G (서열 22); Y152H (서열 23); V160A (서열 24); T172R (서열 25); Y532F (서열 26); T74S (서열 27); W285T (서열 28); L146P (서열 29); D533S (서열 30); A194R (서열 31); G173Q (서열 32); C477T (서열 33); K531A (서열 34); R41I (서열 35); L119A (서열 36); K46A (서열 37); F84Y (서열 38), T172R-G173Q (서열 39); L169K (서열 40); F189A (서열 41), N197K (서열 42), R182K (서열 43), F189K (서열 44), V190K (서열 45), Q191K (서열 46), 및 A194K (서열 47). 예를 들어, T172R 돌연변이체 CocE 폴리펩티드 (서열 25)는 야생형 CocE에 비해 증가된 열 안정성, 37°C에서 증가된 V_{max} 및 K_m , 증가된 용점 (T_m), 증가된 혈장 반감기, 코카인 독성에 의한 치사율의 보다 큰 감소, 및 보다 장기간 지속되는 항-코카인 효과를 갖는다 (예를 들어, 실시예 4, 실시예 7 참조).
- [0038] 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 생성되는 열 안정성 증가는 적어도 약 2 kcal/mol이다. 제시된 폴리펩티드의 열 안정성은 예를 들어 원 편광2색성 (CD) 분광법 또는 시차 주사 열량계를 포함하여 당업계에서 공지된 다양한 방법에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 생성되는 열 안정성 증가는 적어도 약 2.1, 적어도 약 2.2, 적어도 약 2.3, 적어도 약 2.4, 적어도 약 2.5, 적어도 약 2.6, 적어도 약 2.7, 적어도 약 2.8, 적어도 약 2.9, 적어도 약 3.0, 적어도 약 3.1, 적어도 약 3.2, 적어도 약 3.3, 적어도 약 3.4, 적어도 약 3.5, 적어도 약 3.6, 적어도 약 3.7, 적어도 약 3.8, 적어도 약 3.9, 적어도 약 4.0, 적어도 약 4.1, 적어도 약 4.2, 적어도 약 4.3, 적어도 약 4.4, 또는 적어도 약 4.5 kcal/mol일 수 있다. 훨씬 더 큰 열 안정성 증가가 고려된다. 에너지를 약 2.1 내지 약 4.5 kcal/mol 감소시키면 실온에서 단백질의 반감기를 약 30 내지 약 1000배 더 길게 연장시킬 수 있을 것으로 생각된다.
- [0039] 일반적으로, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 야생형 CocE에 비해 열 안정성이 증가된 에스테라제 활성을 갖는다. 일부 실시태양에서, 열 안정성 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 야생형 CocE보다 작은 에스테라제 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, 열 안정성 CocE 돌연변이체는 야생형 CocE의 에스테라제 활성의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 99%를 가질 수 있다. 다른 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 야생형 CocE 폴리펩티드와 대략 동일하거나 더 큰 촉매 효율을 갖는다. 예를 들어, 열 안정성 CocE 돌연변이체는 야생형 CocE의 에스테라제 활성의 약 100%, 약 110%, 약 120%, 약 130%, 약 140%, 또는 약 150% 이상을 가질 수 있다.
- [0040] 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 변이체, 예를 들어 단편, 유사체 및 유도체도 본 발명에 포함된다. 하나 이상의 특정 모티프 및/또는 도메인에 또는 임의의 크기, 예를 들어, 적어도 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 및 1200개 아미노산의 길이에 대응하는 CocE 폴리펩티드 단편이 본원에 개시된 본 발명의 범위 내에 포함된다. CocE 폴리펩티드의 단리된 펩티드 부분은 상기 펩티드를 코딩하는 핵산의 대응하는 단편으로부터 생산된 펩티드 재조합체를 스크리닝함으로써 얻을 수 있다. 또한, 단편은 당업계에 공지된 기술, 예를 들어 통상적인 Merrifield 고상 f-Moc 또는 t-Boc 화학을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같은 CocE 폴리펩티드는 중첩되지 않는 목적하는 길이의 단편으로, 또는 바람직하게는 목적하는 길이의 중첩되는 단편으로 임의로 나눌 수 있다.
- [0041] 본원에 개시된 본 발명의 다른 측면은 CocE 폴리펩티드의 재조합 형태에 관한 것이다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 상기한 CocE 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 다른 실시태양에서, 본원에 개시된 본 발명의 재조합 폴리펩티드는 서열 2의 핵산 서열과 적어도 85%의 서열 동일성 (예를 들어, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 및 99%)을 갖는 핵산에 의해 코딩되고, 여기서 발현된 재조합 CocE 폴리펩티드는 야생형 CocE 폴리펩티드와 실질적으로 동일하거나 더 큰 촉매 효율을 보유하고 야생형 CocE에 비해 증가된 열 안정성을 갖는다.
- [0042] 엄격한 조건 하에 서열 2의 핵산 또는 서열 2의 상보체에 혼성화하는 핵산도 본 발명에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 낮은 엄격성 조건, 중등도 엄격성 조건, 또는 높은 엄격성 조건 하에서 서열 2 또는 서열 2의 상보체에 혼성화하고 또한 야생형 CocE에 비해 열 안정성이 증가된 에스테라제 활성을 갖는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 코딩하는 상기 핵산이 본 발명에 포함된다. 바람직한 핵산은 서열 2의 전부 또는 일부의 상보체인 뉴클레오티드 서열을 갖는 것이다. 본 발명의 범위 내에 포함되는 천연 CocE 유전자의 다른 변이체는 서열 2 또는 서

열 2의 상보체에 적어도 65% (예를 들어, 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%, 및 99%)의 서열 동일성을 공유하는 폴리뉴클레오티드이다. 엄격한 조건 하에 서열 2 또는 서열 2의 상보체에 혼성화하거나 또는 서열 2 또는 서열 2의 상보체와 적어도 65%의 서열 동일성을 공유하는 핵산은 당업계에 공지된 기술에 의해, 예를 들어 천연 CocE 유전자에 돌연변이를 생성시키거나, 또는 상기 핵산을 발현하는 유기체로부터의 단리에 의해 (예를 들어, 대립유전자 변이체) 얻을 수 있다.

[0043] 돌연변이체 CocE 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자도 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상기 핵산은 적합한 숙주 내로 도입될 때 돌연변이체 CocE 융합 단백질을 발현하는 구성체 (예를 들어, 발현 벡터)를 제조함으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, 상기 구성체는 적합한 발현 시스템에서 구성체의 발현이 융합 단백질을 생성시키도록, 다른 단백질을 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드와 인 프레임(in frame)으로 융합된 돌연변이체 CocE 단백질을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드를 라이게이션시킴으로써 제조할 수 있다.

[0044] 본 발명의 핵산 분자는 예를 들어 분자의 안정성, 혼성화 등을 개선시키기 위해서 염기 모이어티, 당 모이어티, 또는 포스페이트 백본에서 변형될 수 있다. 본원에 개시된 본 발명의 실시태양에서 사용되는 핵산 분자는 RNA 형태 또는 DNA 형태 (예를 들어, cDNA, 게놈 DNA, 및 합성 DNA)일 수 있다. DNA는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있고, 단일 가닥일 경우, 코딩 (센스) 가닥 또는 비-코딩 (안티-센스) 가닥일 수 있다. 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 코딩하는 코딩 서열은 특히 청구된 뉴클레오티드 서열과 동일할 수 있거나, 또는 유전자 코드의 중복성 (redundancy) 또는 다의성 (degeneracy)의 결과로서 서열 3-37의 폴리뉴클레오티드와 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 상이한 코딩 서열일 수도 있다.

[0045] **돌연변이체 CocE의 설계**

[0046] CocE 열안정화 돌연변이는 ΔG (언폴딩된->폴딩된)의 저하를 통해 폴리펩티드의 열역학적 안정성을 증가시키거나 또는 언폴딩 과정의 활성화 자유 에너지 증가를 통해 언폴딩 속도를 감소시키도록 설계될 수 있다. ΔG (언폴딩된->폴딩된)는 언폴딩된 상태와 폴딩된 상태의 자유 에너지 차이이다. 열역학적으로 안정한 폴리펩티드를 위해, ΔG (언폴딩된->폴딩된)은 음의 값이어야 한다. 일반적으로, ΔG (언폴딩된->폴딩된) 값이 낮을수록, 폴딩된 상태가 보다 안정하다. 언폴딩 과정의 활성화 자유 에너지는 폴딩된 상태와 언폴딩 전이 상태의 자유 에너지 차이이다 (Steipe, 1999).

[0047] 증가된 열 안정성을 갖는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 예를 들어 합리적 디자인 (rational design), 유도된 진화 (directed evolution) (예를 들어, 무작위 돌연변이 유발, CocE 숙주 유기체의 돌연변이 유발), 또는 이들의 조합을 포함하여 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 설계되고 생성될 수 있다. 유도된 진화는 돌연변이 및 재조합, 이어서 목적하는 특징에 대한 스크리닝 또는 목적하는 특징을 달성하기 위한 선택 압력의 인가를 통해 달성할 수 있다 (예를 들어, [Lehmann and Wyss, 2001] 참조). 돌연변이 유발은 공학적으로 처리된 특성이 목적하는 단백질에 부여되도록 목적하는 특이적 유전자에 대해 또는 돌연변이 유발 및 숙주 유기체의 선택을 통해 수행될 수 있다. 바람직하게는, CocE 돌연변이체의 열 안정성은 (i) 계산-유도된 (computation-guided) 부위-지정 돌연변이 유발의 합리적 디자인 (예를 들어, 실시예 3; 실시예 4 참조), (ii) CocE 유전자의 무작위 돌연변이 유발 및 고속 스크리닝 (예를 들어, 실시예 4; 실시예 15 참조); 및 (iii) CocE 숙주 유기체의 돌연변이 유발 및 유전자 선택 (예를 들어, 실시예 14 참조)의 3갈래 접근 (three-prong) 방안을 통해 공학적으로 처리된다.

[0048] ΔG (언폴딩된->폴딩된)의 저하 및/또는 언폴딩 과정의 활성화 자유 에너지의 증가를 달성하기 위한 상이한 합리적 디자인 개념은 당업자에게 공지되어 있다 (예를 들어, [Lehmann, 2001] 참조). 예를 들어, 추가의 디설피드 다리 도입에 의해 또는 X->Pro 돌연변이에 의해 언폴딩된 상태의 엔트로피를 감소시키고; Gly->Ala 치환에 의해 또는 α -나선 거대 이중극자 (macro-dipole)의 안정화에 의해 α -나선 경향 (propensity)을 증가시키고; 추가의 염 다리 또는 심지어 염-다리 네트워크의 도입에 의해, 또는 정전기 전위의 계산을 기초로 한 열안정화 돌연변이에 의해 대전된 표면 잔기 사이의 정전기 상호작용을 개선시킬 수 있다.

[0049] 적절한 분자 동역학 (MD) 시뮬레이션 (simulation)에 기초한 분자 모델링은 증가된 열 안정성을 갖는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 설계하기 위해 부위-지정 돌연변이 유발을 합리적으로 유도할 수 있다. 전통적인 MD 시뮬레이션은 많은 작은 연속적인 시간 단계를 결합된 상호작용 (결합, 각, 및 2면각), 비-결합된 판 데어 발스 상호작용, 및 정전기적 상호작용 기반 또는 순 원자 전하 (net atomic charge)를 포함하는 파라미터화된 (parameterized) 상호작용 기능 (역장 (force field))의 세트에 의해 결정된 원자력 하에 취함으로써 큰 시스템의 시간 진화의 연구를 가능하게 한다. 단순한 역장 형태 때문에, MD 시뮬레이션은 심지어 십만 개 이상의 원

자를 수반하는 매우 큰 시스템에 대해 의미있는 앙상블 평균 (ensemble-averaged) 특성을 제공하기 위해 충분한 시뮬레이션 시간 동안 수행할 수 있다. 따라서, CocE 및 각각의 제안된 돌연변이체에 대해, MD 시뮬레이션은 물 중에서 시뮬레이션된 폴리펩티드의 합리적인, 역학적으로 평균화된 3D 구조를 생성시킬 수 있다.

[0050]

본원에서 성공적으로 사용되는 하나의 방안은 폴리펩티드의 ΔG (언폴딩된->폴딩된) 값을 저하시키는 열안정화 돌연변이의 합리적 디자인에 초점을 맞춘다 (예를 들어, 실시예 3 참조). 상기 방안은 언폴딩의 전이 상태의 구조 및 에너지학에 대한 보다 시간-소모적인 계산을 수행하지 않으면서 ΔG (언폴딩된->폴딩된)의 계산만을 필요로 한다. 따라서, 폐길화 전에 폴리펩티드의 열 안정성을 증가시키기 위해서, 제시된 폴드에 대한 특정 서열의 적합성을 평가하기 위해 에너지 함수를, 서열 공간 샘플링을 위해 Monte Carlo 검색 알고리즘을 사용하는 합리적 디자인 프로그램 (예를 들어, RosettaDesign)으로 실행되는 방법을 사용할 수 있다. 상기 방안은 촉매 효율이 감소하지 않으면서 다른 효소의 증가된 열 안정성을 생성시키는 것으로 알려져 있다 (예를 들어, [Korkegian, 2005] 참조). 예를 들어, 계산에서 사용되는 폴드는 이용가능한 CocE X-선 결정 구조의 폴드에 대응할 수 있다.

[0051]

합리적 디자인 프로그램을 통해, 보다 낮은 에너지 (예를 들어, ΔG (언폴딩된->폴딩된) 값)를 갖고, 이에 따라 보다 높은 열 안정성을 갖는 변형된 아미노산 서열의 세트를 예측할 수 있다. 따라서, 촉매 효율을 상실하지 않으면서 폴리펩티드의 열 안정화를 유도할 수 있는 CocE 폴리펩티드 코어에서의 돌연변이를 예측하기 위해 본원에 설명된 본원에 설명된 컴퓨터 디자인을 사용할 수 있다. 상기 방안은 실험을 통한 시험 시간을 최소화하고, 실험 결과의 성공을 크게 증가시킨다. 예측된 열안정화 돌연변이는 부위-지정 돌연변이 유발에 의해 개별적으로 시험한 후, 함께 조합하여 반복 과정으로 시험할 수 있다 (예를 들어 실시예 15 참조).

[0052]

또한, 유도된 진화는 열 안정성 CocE 돌연변이체를 생성시키기 위해 사용될 수 있다. 유도된 진화는 돌연변이 및 재조합을 통한 가속화된 다양성 및 적응성 (adaptation)을 생성시킨 후, 목적하는 특징에 대해 스크리닝하거나 또는 목적하는 특징을 얻기 위해 선택적인 압력을 인가하는 일련의 실험 기술을 포함한다 (Lehmann & Wyss (2001) Current Opinion in Biotechnology 12, 371-375). 따라서, 유도된 진화는 다양성을 생성시키는 과정과 목적하는 특징의 검출 또는 풍부화를 위한 효율적인 스크리닝 또는 선택 방법을 모두 수반한다. 유도된 진화는 이미 열 안정성 단백질의 생산에 대해 성공적으로 적용된 바 있고, 다양성은 예를 들어 오류 유발 (error prone) PCR, 포화 돌연변이 유발, DNA 셔플링 (shuffling), 화학적 돌연변이 유발, 및 이들의 조합을 통해 생성되었다. 오류 유발 PCR은 단일 염기쌍 돌연변이를 무작위로 생성하도록 설계된 스트레스가 많은 조건 및 비-프루프리딩 (proofreading) 중합효소를 사용하여 목적하는 유전자를 증폭한다. 각각의 라운드 후에, 최적의 돌연변이체를 선택하고, 다음 라운드의 돌연변이 유발에서 모 서열로서 사용한다. 상기 기술은 프로필 엔도펩티다제 (Uchiyama ma., et al. 2000), 베타글루쿠로니다제 (Flores, H. and A. D. Ellington (2002) Journal of Molecular Biology 315, 325-337) 및 패밀리 10 자일라나제 (Andrews et al. (2004) J Biol Chem 279, 54369-79)를 포함하여 많은 열 안정성 단백질 변이체를 생성시키기 위해 사용되었다. 또한, 포화 돌연변이 유발도 목적하는 유전자를 증폭하지만, 보편적인 염기를 증폭 동안 도입시켜 훨씬 더 많은 돌연변이를 생성시킨다. 상기 기술은 친한성 (psychrophilic) 효소에서 열 안정성을 생성시키기 위해 사용되었다 (Miyazaki et al. (2000) Journal of Molecular Biology 297, 1015-1026). DNA 셔플링은 제시된 효소의 개선된 변이체를 얻기 위해 상동성 서열 세트 사이의 1회 이상의 재조합 사이클을 수반한다. 상기 기술은 또한 오류 유발 PCR과 함께 사용될 수 있고, 여기서 오류 유발 PCR에 의해 얻은 최적 돌연변이체는 DNA 셔플링과 조합되어 새로운 세트의 돌연변이체를 생성시킨다. DNA 셔플링은 베타-글루쿠로니다제의 열 안정성 변이체를 생성시키기 위해서 실시되었다 (Flores, H. and A.D. Ellington (2002) Journal of Molecular Biology 315, 325-337). 화학적 돌연변이 유발은 점 돌연변이를 서열 내에 도입하는 화학물질, 예를 들어 히드록실아민, 니트로사민 또는 디메틸 술페이트로 플라스미드 DNA를 처리하는 것을 수반한다. 히드록실아민을 사용한 플라스미드 처리는 바실러스 폴리믹사 (*Bacillus polymyxa*) 베타-글루코시다제 A (Lopez-Camacho et al. (1996) Biochemistry Journal 314, 833-838) 및 개뿔벌레 루시퍼라제 (White et al. (1996) Biochemistry Journal 319 (Pt 2), 343-350)의 열 안정성 돌연변이체를 생성시키기 위해 사용되었다.

[0053]

또한, CocE 숙주 유기체의 돌연변이 유발은 열 안정성 CocE 돌연변이체를 생성시키기 위해 사용될 수 있다. 열 안정성 CocE 변이체 생산을 위한 간단하고 빠른 방법은 그의 숙주 유기체에서 유일한 탄소원으로서의 코카인을 대사시키는 효소의 능력을 이용함으로써 달성할 수 있다. CocE 유전자는, 코카인을 대사시키지만 코카인 에스테라제 부산물인 에크고닌 메틸 에스테르 및 벤조에이트 상에서 성장할 수 있는 세균인 로도코커스 에리트르폴리스 (*Rhodococcus erythropolis*) CW25 내로 유전자 단편을 서브클로닝함으로써 로도코커스 MB1로부터 처음으로 서열결정되었다 (Bresler et al. (2000) Applied & Environmental Microbiology 66, 904-908). 코카인 부산물

을 대사시키는 것으로 이전에 밝혀진 다른 유기체는 에스테라제를 통해 코카인을 대사시킬 수 있는 다른 세균인 코마모나스 엑시도보란스 (*Comamonas acidovorans*) (MBLF)와 공생 관계로 성장할 수 있는 슈도모나스 플루오레센스 (*Pseudomonas fluorescens*) (MBER)이다.

[0054] 플라즈미드를 사용하여 높은 효율로 형질전환시키는 것이 어렵지만, 상기 세균 균주는 적절한 셔틀 (shuttle) 벡터 내로 클로닝된 천연 CocE 유전자로 비교적 쉽게 형질전환된 후, 전통적인 세균 돌연변이 유발을 수행할 수 있다 (예를 들어, 실시예 14 참조). 상기 세균은 정상적으로는 단지 25-30°C에서 코카인 가수분해 산물 상에서 성장하기 때문에, 코카인을 37°C에서 효율적으로 대사시킬 수 있는 돌연변이체의 선택은 37°C에서 안정한, 높은 활성을 갖는 CocE 돌연변이체를 선택할 것으로 예상된다.

[0055] 새로운 표현형을 보유하는 돌연변이체 생산을 위해 세균을 방사선 또는 화학제에 노출시키는 것은 당업계에 잘 공지되어 있다 (예를 들어, [Maron, D. M. and Ames, BN (1983) *Mutation Research* 113, 173-215] 참조). 방사선 조사에 의한 돌연변이 유발은 이온화 및 비-이온화 방사선을 포함할 수 있지만; 비-이온화 방사선이 널리 사용되고, 260 nm의 UV 방사선이 치사제로서 가장 효과적이다. 돌연변이 유발은 피리미딘 이량체의 유도에 의해 이루어지고, 이것은 복제 동안 미스매치의 도입 가능성을 증가시킨다. 세포에 90-95%의 세포 집단을 치사시키는 소정의 용량의 UV 방사선에 노출시키고, 이어서 돌연변이체를 생존 세포에서 찾는다. 화학적 돌연변이 유발은 복제 동안 카피 오류를 증가시키는 염기 유사체, 예를 들어 5-브로모우라실 및 2-아미노퓨린의 사용, 또는 DNA와 직접 반응하는 물질, 예를 들어 염기 유사체보다 높은 빈도로 돌연변이를 유발하는 히드록실아민 또는 니트로소구아니딘의 사용을 포함한다.

[0056] **돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 생성**

[0057] 본 발명의 실시태양은 추가로 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 생산 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 발현을 지시하는 핵산 벡터로 형질감염된 숙주 세포를 펩티드 발현을 허용하는 적절한 조건 하에서 배양할 수 있다. 세포를 수거하고, 용해시키고, 단백질을 단리할 수 있다. 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 환외여과, 전기영동, 및 단백질에 특이적인 항체를 사용한 면역친화도 정제를 포함하여 단백질을 정제하기 위해 당업계에 공지된 기술을 사용하여 숙주 세포로부터 단리될 수 있다 (예를 들어, 실시예 1 참조).

[0058] 예를 들어, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 세포에서 발현된 후에, 임의의 면역-친화도 크로마토그래피를 사용하여 단리할 수 있다. 보다 구체적으로, 항-CocE 항체는 칼럼 크로마토그래피 매트릭스에 고정되고, 매트릭스는 표준 방법에 의해 세포 용해물로부터 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 정제하기 위해 면역-친화도 크로마토그래피에 사용될 수 있다 (예를 들어, [Sambrook and Russel (2006) *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0879697717] 참조). 면역-친화도 크로마토그래피 후, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 다른 표준 기술, 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 또다른 실시태양에서, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 그의 정제를 용이하게 하는 친화도 태그 (예를 들어, Hisx6)를 포함하는 융합 단백질로서 발현된다 (예를 들어 실시예 1 참조).

[0059] **돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 폐길화**

[0060] 돌연변이체 CocE는 작용 지속시간 및 열 안정성을 증가시키고 면역원성을 감소시키기 위해서 폐길화될 수 있다. 폐길화는 본 발명의 돌연변이체 CocE의 열 안정성을 보다 향상시킬 수 있고, 신장 제거, 단백질 분해, 대식세포 섭취, 및 면역학적 반응을 감소시킴으로써 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다.

[0061] 폐길화는 폴리펩티드의 면역원성 및 그의 신장 제거 속도를 저하시키기 위해서 에틸렌 글리콜의 반복 단위 (즉, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 PEG)를 폴리펩티드에 부착시키는 과정이다 (일반적으로 폐길화 기술을 검토한 문헌 ([Veronese, FM and Harris, JM (2002b) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 457-606], [Veronese, FM and Harris, JM (2002c) *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 1259-1345]) 참조). 각각의 에틸렌 글리콜 단위는 효과적으로 펩티드의 크기를 증가시키는 2 또는 3개의 물 분자에 결합할 수 있고, 펩티드를 면역 반응, 효소적 분해, 및/또는 급속한 신장 제거로부터 보호할 수 있다. 또한, 폴리에틸렌 글리콜은 온도 및 pH의 변화에 대해 펩티드를 안정화시킬 수 있다. 이의 최종적인 결과는 치료 폴리펩티드가 혈액 내에 보다 오래 유지될 수 있고, 보다 완화된 면역 반응을 유도한다는 것이다 (Harris, JM and Chess, RB (2003) *Nature Reviews. Drug Discovery* 2, 214-221). PEG는 독성, 항원성, 및 면역원성의 부재, 신장 제거의 질량-의존적 감소, 및 높은 가요성 및 수용해도를 포함하는 특유의 특성을 갖는다. 이것은 자신이 결합하는 단백질에 상기 특성을 부여한다 (Veronese, FM and Harris, JM (2002b) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 457-606).

- [0062] PEG 중합체는 먼저 단백질의 아미노산에 대한 공유 결합을 촉진시키는 관능기로 활성화될 수 있다. PEG의 말단 히드록실기는 활성 카르보네이트, 활성 에스테르, 알데히드 또는 트레실레이트 유도체에 의해 변형될 수 있다. PEG는 라이신에 또는 돌연변이체 CocE의 도입된 시스테인 잔기에 부착될 수 있다. 에틸렌 옥사이드의 반복 단위는 분지쇄가 존재하거나 존재하지 않는, 다양한 분자량으로 상이한 길이를 갖는 많은 입체형태로 제조될 수 있다. 도입 수단은 부위-지정 돌연변이 발생 또는 트랜스글루타미나제의 말레이미드 유도체를 포함할 수 있다.
- [0063] PEG는 주사가능, 국소, 직장 및 코 제형을 포함하는 의약에 비히클 또는 염기로 사용하기 위해 FDA에서 승인된 것이다 (Harris and Chess, 2003). 그리고, 폐길화된 약물은 임상 사용에 대해 승인되었다 (예를 들어, PEG-인터페론 알파-2a (Hamidi, M and Tazerzadeh, H (2003) Drug Delivery 10, 9-20); PEG-인터페론 알파-2b (Reddy et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 571-586) 참조).
- [0064] PEG의 비평행한 공간적 동역학적 이동 때문에, PEG 중합체에 의한 돌연변이체 CocE의 표면의 변형은 코팅된 효소를 단백질 분해 효소에 의한 작용 및 면역계에 의한 인식으로부터 보호하고; 이에 의해 폐길화된 돌연변이체 CocE의 면역원성을 감소시키고 순환 반감기를 연장시킬 수 있다. 폐길화 전략의 성공은 PEG-변형된 리포솜 (즉, 스텝스 리포솜 (이것은 면역 검출 및 신장 제거를 피하여 유의하게 연장된 순환 시간을 생성시키는 이들의 능력 때문에 붙여진 명칭임)) (Lasic, DD (1997) Journal of Controlled Release 48, 203-222), 및 그의 생체 내 반감기가 유리 아스파라기나제에서 관찰된 26시간으로부터 15일로 크게 개선된 폐길화된 아스파라기나제 (Avramis et al. (2002) Blood 99, 1986-1994)를 포함한다. 또한, 폐길화가 효소의 열 안정성을 유의하게 향상시킬 수 있고 ([Kazan, D. and Erarslan, A. (1997) Applied Biochemistry & Biotechnology 62, 1-13]; [Efremova et al. (1998) Biochemistry (Moscow) 63, 441-447]), 보체계의 활성화를 감소시킬 수 있다고 당업계에 알려져 있다 (Chang et al. (2005) Bioconjugate Chemistry 16, 147-155). 따라서, 폐길화 기술은 본 발명의 돌연변이체 CocE의 약리적 및 제약적 효과를 개선시키는데 매우 적합하다 (예를 들어, 실시예 11 참조). 또한, 돌연변이체 CocE의 폐길화도 RBC 봉입과 함께 사용될 수 있다.
- [0065] **돌연변이체 CocE의 RBC 내 봉입**
- [0066] 돌연변이체 CocE는 작용 기간 및 열 안정성을 증가시키고 면역원성을 감소시키기 위해서 적혈구 (RBC) 내로 봉입될 수 있다. 코카인은 혈액-뇌 장벽을 급속하게 통과하는 것처럼, RBC 혈장 막을 급속하게 통과하고, 이러한 흡수는 인간의 정맥내 코카인 투여 연구에서 입증되었다 (Javaid et al. (1978) Journal of Chromatography 15, 105-113). 또한, RBC 내의 코카인 농도는 혈장 내의 농도를 초과한다 (Javaid et al. (1978) Journal of Chromatography 15, 105-113). 따라서, RBC 봉입은 CocE의 열 안정성 형태를 제거로부터 보호하기 위해 이용될 수 있다.
- [0067] 적혈구는 약물 담체로서 그의 가능성 있는 용도에 대해 심도있게 조사되었다 (Wang et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). 인체의 가장 풍부한 세포이기 때문에, RBC는 약물 담체로서 기능하는 큰 잇점을 제공한다. 먼저, 적혈구는 특히 자가 세포가 약물 로딩 (loading)을 위해 사용될 때 완전히 생체적 합성이고 생분해성이다. 또한, 적혈구의 양면이 오목한 디스크 형태는 약물 봉입을 위해 사용될 수 있는 가장 높은 표면 대 부피 비율 (1.9×10^4 cm/g)을 제공한다 (Guyton, AG & Hall, JE (1996) Textbook of Medical Physiology, 425-433). 또한, RBC 내의 봉입은 로딩된 약물을 내인성 인자에 의한 불활성화로부터 보호하고, 또한 유기체를 봉입된 약물의 독성 효과로부터 보호한다 (Wang et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). 또한, RBC 봉입은 외래 물질에 의해 촉발될 수 있는 바람직하지 않은 면역 반응 (즉, 항원성 및 면역원성)을 방지할 수 있다 (Wang et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). 또한, 적혈구는 다른 합성 담체에 비해 보다 긴 순환 반감기를 갖는다. 예를 들어, 전신 순환에서 적혈구의 정상적인 수명은 약 120일인 것으로 보고되었다 (Guyton, AG & Hall, JE (1996) Textbook of Medical Physiology, 425-433).
- [0068] 돌연변이체 CocE의 적혈구 내 봉입은 전기천공, 약물 (예를 들어, 프리마퀸)-유도된 세포내 이입 (endocytosis), 및 삼투를 포함하여 당업계에 공지된 몇몇 기술에 따라 수행될 수 있다 (예를 들어, [Green, R. and Widder, KJ (1987) Methods In Enzymology, Vol. 149] 참조). 상기 방법은 세포막 팽창 및 붕괴, 주로 헤모글로빈 및 세포 골격을 포함하는 내부 내용물의 방출, 약물 포획, 및 막의 재밀봉에 의한 겹 형태의 둥근 분홍색 또는 백색 RBC (일반적으로 "RBC-고스트"로 칭함)의 생성을 포함할 수 있다.
- [0069] 별법으로, 막 투과성 펩티드가 돌연변이체 CocE를 적혈구 내에 봉입시키기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, 실시예 12 참조). 막 투과성 펩티드, 또는 단백질 도입 도메인 (PTD) 펩티드는 TAT, LMWP, 및 다른 아르기닌-풍

부 양이온성 펩티드를 포함하는 작은 (통상 10-15개의 아미노산 잔기로 구성됨) 펩티드의 패밀리이다 (일반적으로, [Dietz, GPH and Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131] 참조). 단백질 (MW>150 kDa; 60개 초과)의 상이한 단백질이 이미 시험됨 (Dietz, GPH and Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131)) 및 나노-담체 (예를 들어 리포솜)를 포함하여 거의 모든 종류의 분자 중에 PTD를 공유 연결시킴으로써 PTD가 너를 포함하는 모든 장기 종류의 세포막을 통과하여 부착된 중을 수송할 수 있음이 당업계에 공지되어 있다 (Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572). PTD는 독성도 면역원성도 아니고 (Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572), PTD-매개된 세포 내재화는 적혈구 세포막의 변동 또는 변형을 유도하지 않는다 (Suzuki et al. (202) Journal of Biological Chemistry 25, 2437-2443). PTO는 단백질 로딩 RBC에 성공적으로 사용되었고, 변경되지 않은 물리적 및 화학적 특성을 갖는 적혈구를 생성시킨다 (예를 들어, [Li et al. (2003) American Pharmaceutical Review 6, 22-26] 참조). 따라서, 돌연변이체 CocE에 대한 PTD 펩티드 컨쥬게이션은 RBC 봉입을 용이하게 할 수 있다. 또한, RBC 봉입은 폐기화된 돌연변이체 CocE를 사용하여 수행할 수 있다.

[0070] 돌연변이체 CocE의 안정화

[0071] 본 발명의 다른 측면은 기질, 산물, 및/또는 코카인의 억제제를 사용하여 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 안정화시키는 것에 관한 것이다. 본원에 개시된 실시태양에 유용한 기질 및 산물은 예를 들어 코카인; 코카인 유도체, 예를 들어 (-)-코카인, (+)-코카인, 트로포코카인 등; 티오-코카인 유도체, 예를 들어, 티올-1, 티올-2 등; 아미드-코카인 유도체; 프로비타민-코카인 유도체, 예를 들어 PABA 코카인, 니아신 (Niacin) 코카인 등; 벤조산; 4-니트로페닐 아세테이트 (4NPA); 4-니트로페놀 (4NP) 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 예시적인 억제제는 기질 유사체, 예를 들어, 포스포-플루오로코카인, 0-포스포-코카인, 0-메틸포스포코카인, S-메틸포스포코카인 등; 산물 유사체, 예를 들어, 에크고닌 및 에크고닌 유도체, 예를 들어, 보론산 에크고닌 메틸에스테르 유사체; 페닐보론산; 벤조산 유도체, 예를 들어, 4-tert-부틸 벤조산, 1-나프토산, 2,3,4-트리메틸-벤조산 메틸 에스테르 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 추가의 화학물질은 예를 들어 SDS, 글리세롤, PEG 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0072] 바람직하게는, 기질, 산물, 및/또는 억제제는 본원에 개시된 폴리펩티드의 열 변성을 안정화시킨다. 일부 실시태양에서, 기질, 산물 및/또는 억제제는 또한 겔 전기영동에서 열-유도된 응집을 방지한다. 일반적으로, 기질, 산물, 및/또는 억제제를 사용하면 안정성 및/또는 억제가 각각 적어도 약 10% 증가한다. 예를 들어, 증가는 약 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 120%, 150%, 200%, 300% 또는 심지어 500% 이상일 수 있다. 따라서, 기질, 산물, 및/또는 억제제는 본원에 개시된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 안정화에 매우 적합하다 (예를 들어, 실시예 20 참조).

[0073] 한 실시태양에서, 작은 분자가 본원에 개시된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 열안정화시키기 위해 사용된다. 바람직한 실시태양에서, 상기 분자는 폴리펩티드의 활성 부위에 존재하지 않는다.

[0074] 일부 실시태양에서, 본원에 개시된 폴리펩티드는 안정화 분자와 함께 동시에 주입될 수 있다. 다른 실시태양에서, 안정화 분자는 제조 동안 폴리펩티드를 안정화시키기 위해 사용될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 안정화 분자는 사용을 위해 준비할 때까지 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 안정화시키기 위해 사용될 수 있다.

[0075] 치료 방법

[0076] 본 발명의 다른 측면은 항-코카인 치료제 개발을 위한 측매에 의한 분해 방안에 관한 것이다. 그를 필요로 하는 대상에게 열 안정성, 에스테라제 활성의 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 투여를 통한 코카인-유도된 병태의 예방 및 치료 모두를 위한 처치가 제공된다. 본 발명의 코카인 에스테라제 변이체는 공지의 자연 발생 CocE보다 증가된 열 안정성 및 보다 긴 혈장 반감기 때문에 유의한 임상적 가치를 갖는다. 코카인 독성의 치명적인 증상에 대한 훨씬 더 급속한 반응을 가능하게 하는 것은 바로 이와 같은 열 안정성 및 혈장 반감기의 증가이고, 본 발명의 CocE 변이체는 이러한 점에서 다른 치료 방법과 구분된다.

[0077] 치료 필요성의 결정은 일반적으로 코카인-유도된 병태에 대한 병력 및 물리적 조사에 의해 평가될 것이다. 코카인-유도된 병태는 코카인 과용, 코카인 독성, 및 코카인 의존 및/또는 중독을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 코카인 독성의 진단은 경련, 대발작, 심장정지, 심근 경색, 심 부정맥, 혈압 증가, 뇌졸중, 약물-유도된 정신병, 박리 동맥류, 및 심근 산소 요구량 증가를 포함할 수 있다. 다른 예로서, 코카인 의존 및/또는 중독의 경우에, 금단 증상은 가벼운 내지 심한 불쾌감, 우울증, 불안, 또는 과민성이라는 주관적인 느낌을 포함한다. 치료가 필요한 것으로 확인된 대상은 진단된 코카인-유도된 병태, 코카인-유도된 병태의 징후를 갖

는 대상, 및 코카인-유도된 병태가 치료된 적이 있거나, 치료되고 있는 중이거나 치료할 예정인 대상을 포함한다. 대상은 바람직하게는 포유동물, 파충류, 및 조류, 보다 바람직하게는 말, 소, 개, 고양이, 양, 돼지 및 닭, 가장 바람직하게는 인간을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0078] 본원에 설명된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 유효량은 일반적으로 코카인-독성 또는 코카인-유도된 병태의 심도를 저하시킬 수 있는 양이다. 심도의 감소는 예를 들어 증상, 생리학적 인디케이터, 생화학적 마커, 또는 대사 인디케이터의 정지 또는 감소를 포함한다. 본 발명의 방법에서 사용될 때, 치료 유효량의 본원에 설명된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 순수한 형태로 또는 상기 형태가 존재할 경우 제약상 허용되는 염 형태로 제약상 허용되는 부형제와 함께 또는 부형제 없이 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 대상의 혈액 및/또는 조직 중의 코카인 농도를 실질적으로 감소시키기에 충분한 양으로 임의의 의료 처치에 적용가능한 합리적인 이익/위험비로 투여될 수 있다.

[0079] 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 독성 및 치료 효능은 LD₅₀ (집단의 50%를 치사시키는 용량) 및 ED₅₀ (집단의 50%에서 치료상 효과적인 용량)를 결정하기 위한 표준 제약 절차에 의해 세포 배양액 및/또는 실험 동물에서 결정할 수 있다. 독성 및 치료 효과 사이의 용량비는 비 LD₅₀/ED₅₀으로서 표현될 수 있는 치료 지수이고, 큰 치료 지수가 바람직하다.

[0080] 단일 투여형을 제조하기 위해 제약상 허용되는 담체와 조합될 수 있는 돌연변이된 CocE 폴리펩티드의 양은 치료되는 대상 및 특정 투여 방식에 따라 상이할 것이다. 필요한 치료 유효량은 많은 개별적인 용량의 투여에 의해 달성될 수 있기 때문에, 각각의 투여형의 개별적인 용량에 함유되는 물질의 단위 함량이 그 자체로 치료 유효량을 구성할 필요가 없음을 당업자는 이해할 것이다. 물질 투여는 단일 사건으로서 또는 치료 시간 경로에 걸쳐서 시행될 수 있다. 예를 들어, 물질은 매일, 매주, 격주 또는 매월 투여될 수 있다. 일부 병태의 경우, 치료는 몇 주 내지 몇 개월 또는 심지어 1년 이상 연장될 수 있다.

[0081] 임의의 특정 대상에 대한 치료상 효과적인 특정 용량 수준은 치료되는 코카인-유도된 병태 및 코카인-유도된 병태의 심도; 사용된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 활성; 사용된 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 전반적인 건강 상태, 성별 및 식이; 투여 시간; 투여 경로; 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 혈장 반감기; 사용된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 배출 속도; 치료 지속 기간; 사용된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드와 조합하여 또는 동시에 사용되는 약물; 및 의료 분야에 공지된 기타 요인을 포함하여 다양한 요인에 의해 결정될 것이다 (예를 들어, [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] 참조). 본원에 개시된 본 발명의 실시태양에 사용하기 위한 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 총 1일 사용량은 사려깊은 의료 판단의 범위 내에서 치료 의사에 의해 결정될 것임을 숙련되는 이해할 것이다.

[0082] 본원에 설명된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 또한 다른 치료 방식과 조합될 수 있다. 따라서, 본원에 설명된 치료제 이외에, 특정 코카인-유도된 병태에 효능이 있는 것으로 알려진 다른 치료제를 대상에게 제공할 수 있다.

[0083] 본원에 설명된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 및/또는 부형제를 사용하여 임의의 통상적인 방식에 의해 제제화될 수 있다 (예를 들어, [Gennaro (2005) Remington the Science and Practice of Pharmacy 21st ed. Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781746736] 참조). 상기 제형은 대상에게 적절한 투여를 위한 형태를 제공하기 위해서 적합한 양의 담체와 함께, 바람직하게는 정제된 형태의 치료 유효량의 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 함유할 것이다. 제형은 투여 방식에 적합하여야 한다. 본 발명에 사용되는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 비경구, 폐, 경구, 국소, 피내, 근내, 복강내, 정맥내, 피하, 비내, 경막 외, 안내, 구강 및 직장을 포함하고 이로 제한되지 않는 몇몇 경로를 통해 대상에게 투여하기 위해 공지된 방법에 의해 제제화될 수 있다. 또한, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 본원에 개시된 하나 이상의 추가의 물질과 조합하여 및/또는 다른 생물학상 활성 또는 생물학상 불활성 물질과 함께 투여될 수 있다. 상기 생물학상 활성 또는 불활성 물질은 물질(들)과 유체 또는 기계적으로 연결되어 있거나 또는 이온, 공유, 판 테어 발스, 소수성, 친수성 또는 다른 물리적인 힘에 의해 물질(들)에 부착될 수 있다.

[0084] 본원에 설명된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 정맥내, 근내, 피하, 및 복강내 주사를 포함하여 비경구로 투여될 수 있다. 작은 약물 분자의 비경구 전달에 통상적으로 사용되는 부형제, 예를 들어 용해도 향상제, 삼투압

생체, 버퍼, 및 보존제도 생물분자 제형에 포함될 수 있다. 생물분자의 제제화 및 전달시에 항응집 및 항흡착제, 예를 들어 계면활성제 및 알부민을 포함시키면, 안정성을 증가시키고, 활성 생물분자가 계면과 상호작용할 위험 (언폴딩, 응집, 및/또는 침전을 야기할 수 있음)을 감소시킬 수 있다. 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 보관 동안 안정성을 위해 동결건조되고, 비경구 투여 전에 재처리될 수 있다.

[0085] 바람직하게는, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 폐경화되어, 증가된 안정성 및 감소된 면역원성을 제공한다 (상기 참조).

[0086] 돌연변이체 CocE 폴리펩티드와 같은 거대분자의 폐 전달은 전신 분배를 위해 순환계에 대한 비교적 용이한 비침습적 투여를 제공한다 (예를 들어, 폐 전달 기술에 대해서는 [Cryan (2004) AAPS J. 7(1) article 4, E20-41] 참조). 폐 전달의 잇점은 비침습성, 흡수를 위한 큰 표면적 (~75 m²), 급속한 흡수를 허용하는 얇은 (~0.1 내지 0.5 μm) 폐포 상피, 초회 통과 대사의 부재, 감소된 단백질 분해 활성, 급속한 작용 개시, 및 높은 생체이용율을 포함한다. 본원에 설명된 생물분자를 전달하기 위해 사용될 수 있는 다양한 흡입 전달 장치, 예를 들어 계량 투여 흡입기, 네블라이저, 및 건조-분말 흡입기는 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, AERx (아라다임 (Aradigm, 미국 캘리포니아주)); Respimat (뵈링거 (Boehringer, 독일)); AeroDose (에어로젠 인크. (Aerogen Inc., 미국 캘리포니아주)). 건조 분말 흡입기는 단백질계 물질의 폐 전달에 특히 바람직하다 (예를 들어, Spinhaler (피존스 파마슈티칼스 (Fisons Pharmaceuticals, 미국 뉴욕주)); Rotohaler (지에스케이 (GSK, 미국 노스캐롤라이나주)); Diskhaler (지에스케이); Spiros (듀라 파마슈티칼스 (Dura Pharmaceuticals, 미국 캘리포니아주)); Nektar (넥타 파마슈티칼스 (Nektar Pharmaceuticals, 미국 캘리포니아주)).

[0087] 조절 방출 (또는 서방형) 제제는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 활성을 연장시키고 투여 횟수를 감소시키기 위해 제제화될 수 있다. 조절 방출 제제는 또한 작용 개시 시간 또는 다른 특성, 예를 들어 물질의 혈액 수준에 영향을 주고, 이에 따라 부작용 발생에 영향을 주기 위해 사용될 수 있다. 조절 방출 제제는 초기에 목적하는 치료 효과를 일으키는 양의 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 방출하고, 연장된 시간에 걸쳐 치료 효과의 수준을 유지하기 위해 다른 양을 점진적으로 및 계속적으로 방출하도록 설계될 수 있다. 체내에서 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 수준을 거의 일정하게 유지하기 위해서, 폴리펩티드는 대사되고/되거나 신체로부터 배출되는 물질의 양을 대체하는 속도로 투여형으로부터 방출될 수 있다. 물질의 조절 방출은 다양한 유도제, 예를 들어, pH의 변화, 온도의 변화, 효소, 물, 또는 다른 생리학적 상태 또는 분자에 의해 자극될 수 있다.

[0088] 조절 방출 시스템은 예를 들어 인슐린 또는 화학치료제를 특정 장기 또는 종양으로 전달하기 위해 사용되는 것과 유사한 방식으로 물질을 투여하기 위해 사용될 수 있는 주입 펌프를 포함할 수 있다. 본 발명의 물질은 상이한 비율로 목적하는 방출 프로필을 제공하기 위해, 예를 들어 히드로프로필메틸 셀룰로스, 다른 중합체 매트릭스, 겔, 투과성 막, 삼투압 시스템, 데포 (depot), 다층 코팅, 미세입자, 리포솜, 미세구 등, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하여 당업자에게 공지된 다른 조절 방출 수단 또는 전달 장치에 의해 투여될 수 있다. 물질의 조절 방출 전달을 위한 다른 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 이는 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0089] 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 봉입되고, 다양한 담체 전달 시스템으로 투여될 수 있다. 생물분자 물질 전달을 위한 담체-기반 시스템은 세포내 전달을 제공하고; 생물분자/물질 방출 속도를 적합하게 만들고; 그의 작용 부위에 도달하는 생물분자의 비율을 증가시키고; 약물의 그의 작용 부위로의 수송을 개선시키고; 다른 물질 또는 부형제와의 동시 침착 (colocalized deposition)을 허용하고; 생체 내에서 물질의 안정성을 개선시키고; 제거 감소에 의해 작용 부위에서 물질의 체류 시간을 연장시키고; 물질의 비표적 조직에 대한 비특이적인 전달을 감소시키고; 물질에 의해 유발되는 자극을 감소시키고; 물질의 높은 초기 용량에 의한 독성을 감소시키고; 물질의 면역원성을 변경하고; 투여 횟수를 감소시키고, 산물의 맛을 개선시키고/시키거나 산물의 보관 수명을 증가시킬 수 있다.

[0090] 본원에 설명된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 담체 전달 시스템의 예는 미세구 (예를 들어, [Varde & Pack (2004) Expert Opin. Biol. 4(1) 35-51] 참조), 히드로겔 (일반적으로, [Sakiyama et al. (2001) FASEB J. 15, 1300-1302] 참조), 중합체 이식편 (일반적으로, [Teng et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 3024-3029] 참조), 스마트 (smart) 중합체 담체 (일반적으로, [Stayton et al. (2005) Orthod Craniofacial Res 8, 219-225]; [Wu et al. (2005) Nature Biotech (2005) 23(9), 1137-1146] 참조), 및 리포솜 (예를 들어, [Galovic et al. (2002) Eur. J. Pharm. Sci. 15, 441-448]; [Wagner et al. (2002) J. Liposome Res. 12, 259-270] 참조)을 포함한다. 바람직하게는, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 RBC에 봉입된다 (상기 참조; 실시예 12).

- [0091] **스크리닝 방법**
- [0092] 본 발명의 다른 측면은 열 안정성 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 생성, 확인, 및 정제를 위한 스크리닝 방법에 관한 것이다. 일반적으로, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 상기 설명된 방법에 따라 초기에 설계될 수 있다. 이어서, 상기 설계된 폴리펩티드는 바람직한 특성, 예를 들어 가수분해 효율의 보유, 증가된 열 안정성, 증가된 혈장 반감기, 및/또는 감소된 항원성에 대해 스크리닝될 수 있다. 또한, 무작위 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 목적하는 특성에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0093] 열 안정성 돌연변이체의 스크리닝을 위한 검출 방법은 매우 다양한 기술을 포함한다. 다음은 포괄적인 프로토콜의 예시적인 요약이다. 돌연변이체 CocE 폴리펩티드 (예를 들어, 합리적 디자인, 무작위 돌연변이 유발, 또는 숙주 돌연변이 유발을 통해 생성된)를 코딩하는 핵산은 형질전환을 위해 적절한 발현 숙주 (예를 들어, 이. 콜라이 (*E. coli*) 세포, 예를 들어 이. 콜라이 BL21 Gold (스트라타젠 (Stratagene))) 내로 도입되고, 표준 프로토콜 (예를 들어 IPTG에 의한)에 따라 돌연변이체 폴리펩티드의 발현이 유도된다. 발현은 최적 단백질 발현을 생성시키기 위한 온도 (예를 들어, CocE의 경우 16°C, 예를 들어, 실시예 1 참조)에서 소정의 시간 (예를 들어, 30분 내지 24시간 또는 이를 초과하는 시간) 동안 수행된다. 별법으로, 발현은 승온에서 수행한다 (예를 들어, 승온은 적어도 약 35°C, 적어도 약 36°C, 적어도 약 37°C, 적어도 약 38°C, 적어도 약 39°C, 또는 적어도 약 40°C 이상일 수 있다). 바람직하게는, 돌연변이된 CocE 폴리펩티드가 발현되는 승온은 37°C이다. 상기 온도 부근에서, 야생형 CocE 폴리펩티드는 거의 봉입체 내로만 분배된다. 발현된 돌연변이체 폴리펩티드를 함유하는 세포는 CocE의 열 안정성 변이체의 존재에 대해 스크리닝된다.
- [0094] CocE의 열 안정성 변이체의 존재에 대한 스크리닝은 일반적으로 배양된 세포, 세포 용해물에 대한 직접 측정, 또는 세포 파괴 및 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 단리 후의 측정을 수반한다. 세포 파괴는 삼투압 충격, 화학적 용해, 초음파 처리, 및/또는 균질화를 포함할 수 있고, 돌연변이체 폴리펩티드의 단리는 매트릭스에 대한 직접 흡수 또는 항-코카인 항체 또는 융합-단백질 특이적 포획 시스템의 사용을 통한 친화도 흡수를 포함하는 많은 방법을 통해 수행할 수 있다. 흡수에 적합한 매트릭스는 니트로셀룰로스 종이, 필터, 비처리된 또는 친화도-처리된 미량역가 플레이트, 아가로스 또는 세파로스 수지, 및/또는 친화도-코팅된 팁을 포함한다.
- [0095] 배양된 세포 또는 단리된 돌연변이체 폴리펩티드의 에스테라제 활성은 돌연변이체의 열 안정성을 결정하기 위해 하나 이상의 온도에서 후속적으로 측정할 수 있다. 활성 분석이 수행되는 온도가 열 안정성 검출의 정도를 결정한다. 따라서, 최종 돌연변이체는 바람직하게는 45°C 이상의 용점 (예를 들어, 원 편광2색성에 의해 결정된)을 가질 것이지만, 45°C에서의 초기 스크리닝은 종종 활성 효소를 발견하지 못할 것이다. 대신에, 후속적으로 증가하는 온도에서의 돌연변이 유발 및 스크리닝의 사이클을 수회 수행하여 열 안정성 돌연변이체를 얻을 수 있다. 따라서, 초기 스크리닝은 30°C에서 수행할 수 있고, 추가의 돌연변이 유발 사이클 후에, 스크리닝은 적합한 열 안정성의 돌연변이체가 얻어질 때까지 일정 증분으로 증가하는 온도 (예를 들어, 34°C, 37°C, 40°C, 42.5°C, 45°C 등)로 수행할 수 있다. 일정 증분으로의 온도 증가는 절차 동안 실험적으로 결정되고, 특정 온도에서의 히트 (hit)의 수 및 생성된 돌연변이체의 결정된 Tm에 의해 영향받는다.
- [0096] 그래야 할 의무도 없고, 이론에 지지되기를 원하지 않지만, 본원에서는 본원에 설명된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 다양한 실시태양의 용융에 대한 기계적인 설명으로 생각되는 것을 따른다. CD 스펙트럼 데이터는 0도로 냉각시킬 때 원래의 스펙트럼이 재현되지 않기 때문에 코카인 에스테라제 및 돌연변이체의 CD 용융이 비가역적임을 보여준다 (예를 들어, 실시예 19 참조). 열역학적 파라미터는 확인할 수 없지만, CD 스펙트럼은 돌연변이체가 더 안정한지 또는 덜 안정한지, 상이한 2차 구조 또는 응집 특성을 갖는지를 비교해서 결정하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 설명된 CocE 폴리펩티드는 중간 단계를 통해 용융된다. 즉, 폴리펩티드는 2단계 용융 과정을 겪는 것으로 생각된다.
- [0097] 에스테라제 활성의 검출은 다양한 방법을 사용하여 수행할 수 있고, 여기서 기질은 특정 검출 시스템에 연결된다. 에스테라제 활성을 결정하는데 사용하기 위한 적절한 기질은 코카인, 삼중수소화 (3H) 코카인, 코카인 기질 유도체, 예를 들어 티오-코카인 유도체 (예를 들어, 도 6 참조), 및/또는 일반적인 에스테라제 활성을 보여주는 기질, 예를 들어 4-니트로페닐 아세테이트를 포함할 수 있다. 검출 시스템은 기질의 특성과 직접 연결될 수 있고, 예를 들어, 비변형 코카인의 절단은 240 nm에서 코카인 흡광도의 변화를 모니터링함으로써 (예를 들어, 실시예 4 참조), 또는 산성 벤조산 산물의 축적으로 인한 pH 변화를 모니터링함으로써 (예를 들어, 실시예 15 참조), 또는 코카인 앵타머의 사용을 통해 (예를 들어, [Stojanovic, M. N., de Prada, P. & Landry, D. W. (2001) J Am Chem Soc 123, 4928-4931]; [Stojanovic, M. N. & Landry, D. W. (2002) J Am Chem Soc 124, 9678-9679] 참조) 코카인의 분해 시에 형광의 변화를 모니터링함으로써 (실시예 15 참조) 검출할 수 있고; 삼중

수소화 (3H) 코카인의 절단은 크로마토그래피에 의한 분리를 통해 삼중수소화 벤조산 산물의 산성화 및 검출에 의해 (실시에 1 및 15 참조) 검출할 수 있고; 티오-코카인과 같은 코카인 유도체의 절단은 엘만 시약의 첨가 및 412 nm에서의 흡광도 변화의 결정을 통한 반응성 술폰히드릴기의 검출에 의해 (예를 들어, 실시에 15 참조), 또는 침전되는 술폰히드릴 반응성 중금속의 첨가 및 가시화에 의해 모니터링할 수 있고; 4-니트로페닐 아세테이트의 절단은 420 nm에서의 흡광도의 변화를 모니터링함으로써 검출할 수 있다 (예를 들어, [Halgasova, N. et al. (1994) *Biochem J* 298 Pt 3, 751-755]; [O'Conner, C.J. & Manuel, R.D. (1993) *J Dairy Sci.* 76, 3674-3682] 참조).

[0098] 상기 절차, 또는 유사한 고속 분석을 통해 확인된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 본원에 설명된 시험관 내 절차를 사용하여 추가로 평가할 수 있다 (예를 들어, Kcat 및 Km 값, 37°C에서의 안정성, 용점 (Tm), 내독소 수준, 혈장에서 코카인을 분해하는 능력). 열 안정성 에스테라제 활성 및/또는 감소된 면역원성을 갖는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 본원에 설명된 생체내 절차를 사용하여 추가로 평가할 수 있다 (예를 들어, 효능, 작용의 지속시간, 반복 투여의 효과, 및/또는 면역학적 평가). 바람직하게는, 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 코카인 독성의 크기 감소를 먼저 조사하고 (예를 들어, 실시에 5, 7, 및 8 참조), 독성을 적어도 약 5-10배 감소시키는 돌연변이체를 작용 시간 경로에 대해 추가로 평가할 수 있다 (예를 들어, 실시에 6 참조). 후보 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 예를 들어 폐경화 및/또는 RBC 내 봉입에 의해 추가로 안정화시키고, 상기 설명된 절차에 의해 재평가될 수 있다.

[0099] 본 발명을 상세하게 설명하였지만, 첨부된 청구의 범위에 규정된 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 변형, 변경 및 동등한 실시태양이 가능함을 이해할 것이다. 또한, 본원에 개시된 모든 예는 비-제한적인 예로서 제시됨을 이해하여야 한다.

[0100] [실시에]

[0101] 다음 비-제한적인 실시예는 본원에 개시된 본 발명의 다양한 실시태양을 더욱 예시하도록 제공된다. 당업자는 아래의 실시예에 개시된 기술이 본 발명자들이 본 발명의 실시에서 잘 기능하는 것으로 발견하여, 그의 실시를 위한 방식의 예를 구성하는 것으로 간주할 수 있는 방안을 나타내는 것임을 알 것이다. 그러나, 당업자는 본 명세서에 비추어, 개시된 특정한 실시태양에서 많은 변화가 이루어질 수 있고, 본 발명의 취지와 범위를 벗어나지 않으면서 여전히 비슷하거나 유사한 결과를 얻는다는 것을 알아야 한다.

[0102] **실시에 1: CocE 발현**

[0103] CocE의 발현 및 정제를 위한 방법을 확립되었고, 여기서 CocE는 이. 콜라이 내에서 카르복실 말단 Hisx6-태그와 융합 단백질로서 발현된다. 코카인 에스테라제 유전자를 이. 콜라이 발현 벡터 pET-22b(+) 내로 서브클로닝하였고, C-말단 히스티딘 태그를 함유하는 고수준의 코카인 에스테라제 효소가 23°C에서 IPTG의 첨가 시에 유도되었다. 제조합 단백질은 총 단백질의 약 10-15%로 축적되었다. CocE를 코발트-킬레이트 칼럼 (Talon™, 클론테크 (Clontech)) 또는 니켈-킬레이팅된 아가로스 칼럼 (피어스 (Pierce)) 상에서 Hisx6 태그에 의해 농축시켰다. 용출된 단백질은 SDS-PAGE 및 쿠마지 (Coomassie) 블루 염색에 의해 약 95% 순수하였고, 후속적으로 NaCl 구배를 사용하는 이온-교환 크로마토그래피 FPLC 칼럼 (Q-Sepharose)에 의해 분리하였다. 단일 피크로서 용출된 단백질은 SDS-PAGE 및 쿠마지 블루 염색에 의해 나타낼 때 약 99% 순수하였다 (예를 들어, 도 3 참조).

[0104] 효소 활성은 2가지 분석을 통해 결정할 수 있다: 삼중수소화 코카인을 가수분해시킨 다음, 산성화시킨 후 삼중수소화 벤조산 산물을 크로마토그래피에 의해 삼중수소화 코카인 염산염으로부터 분리시키는 방사성 리간드 활성 분석; 및 문헌 [Turner et al. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307]에 설명된 것과 유사한 조건 하에 분광광도 분석. 코카인의 독특한 흡수 스펙트럼 (240 nm에서의 흡광 계수 6.7 L/mmol/cm)으로 인해 효소 절단 이후 남아있는 코카인을 관찰할 수 있다. 코카인 봉피의 초기 선 속도 (속도를 나타냄)는 SpectraMax 190 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시스 (Molecular Devices))에서 SOFTmax Pro 소프트웨어 (v1.13)를 사용하여 결정하였다. 반응은 150 μl의 2x 효소 용액을 150 μl의 2x 코카인 용액에 첨가하여 개시시켰다. 최종 CocE 농도는 100 ng/mL 내지 20 ng/mL 범위였다. 최종 코카인 농도는 다음과 같았다: 250, 126, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91 및 1.95 μM. 모든 효소의 운동학에 대해, 버퍼는 인산염 완충 염수, pH 7.4이었다. 초기 속도를 조정가능 파라미터로서 kcat 및 Km을 사용하여 미켈리스-멘텐 등식에 피팅하였다 (GraphPad; PRISM, v4).

[0105] 코카인 분광광도 분석을 이용하여 결정할 때, 정제된 야생형 CocE 폴리펩티드는 약 500 min⁻¹의 Kcat 및 약 2 μM의 Km으로 코카인을 가수분해하고, 이는 앞서 기록된 값과 일치한다 (예를 들어, [Turner et al. 2000] 참조).

- [0106] 상기 발현 절차는 본원에 설명된 돌연변이체 CocE 폴리펩티드에 대해 사용될 수 있다.
- [0107] **실시예 2: 생체의 CocE 혈장 활성**
- [0108] 코카인 에스테라제 이후 코카인 수준의 생체의 결정을 인간 혈장 내에서 검사하였다 (University of Michigan Hospital blood bank). 코카인은 미국립 약물 남용 협회 (The National Institute of Drug Abuse, 미국 메릴랜드주 베테스다)로부터 입수하였다. 코카인을 멸균수에 용해시켰다. 인간 혈장의 분취액 (3 ml)을 실험 개시 전에 및 실험 동안 37°C에서 수조 내에서 10분 동안 유지시켰다. 혈장을 수조 내에서 평형화시킨 후, 코카인을 300 μ M의 최종 농도로 첨가하고, 30초 동안 볼텍싱하였다. 혈장 샘플을 제거하고, 내부 표준품 및 추가의 코카인 대사를 방지하도록 불화나트륨 포화 용액을 함유하는 미세원심분리관에 넣었다. 첫번째 혈장 샘플 (코카인 단독)을 취한 직후, 0.05 mg/ml CocE 또는 비히클 CocE를 첨가하고 볼텍싱하였다. 혈장 샘플을 CocE를 첨가한 지 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 45, 60 및 120분 후에 수집하였다. 코카인의 수준은 고성능 액체 크로마토그래피 탠덤 (tandem) 질량 분광법을 사용하여 측정하였다.
- [0109] 액체 크로마토그래피는 10 μ l 주사 루프에 맞추어 형성된 4중 구동형 펌프 및 오토샘플러 (autosampler)를 갖는 Surveyor HPLC 시스템 (써모일렉트론 코프. (ThermoElectron Corp., 미국 매사추세츠주 프랭클린))을 사용하여 수행하였다. 분리는 대응하는 가드 (guard) 칼럼을 갖는 Phenomenex C18 3 μ m 30 x 4.6 mm 칼럼 (워터스 코프. (Waters Corp., 미국 매사추세츠주 밀포드))을 사용하여 600 μ l/min의 유속에서 달성하였다. 용매 A는 0.1% 포름산 용액으로 이루어졌고, 용매 B는 아세트니트릴 중 0.1% 포름산이었다 (고순도 등급; 버딕 앤드 잭슨 (Burdick and Jackson, 미국 미시건주 머스케곤)). 3분 탄도 (ballistic) 구배를 사용하였고, 코카인 및 내부 표준품은 2.3 min에서 동시-용출하였다.
- [0110] 질량 분광법에 의한 검출 및 정량을 위해, IonMax 전기분무 이온화원이 장치된 Finnigan TSQ Quantum Ultra AM 3중 4중극자 (quadrupole) 질량 분광기 (써모일렉트론 코프.)를 양이온에서 사용하였고, 반응 모니터링 방식을 선택하였다. 질소는 분무 기체로서 역할을 하고, 아르곤은 충돌 기체로서 역할을 하였다. 기체 유속, 분무 전압 및 충돌 에너지를 최적화하였다. 비처리된 혈장 샘플 내에서 내부 표준품으로서 50 nM 중수소화 코카인 (코카인 D₃)을 사용하여, 코카인에 대한 검정 곡선을 결정하였다. 미지의 샘플을 또한 코카인 D₃으로 스파이킹하였다. 모든 샘플을 3중으로 평가하였다. 표준 곡선 및 미지물을 Xcalibur 버전 1.4 (써모일렉트론 코프.) 소프트웨어로 Quan Browser 프로그램에 의해 분석하였다. 검정 곡선은 1/x의 가중 인자를 갖는 표준 농도의 함수로서 코카인 피크 영역/내부 표준 영역비의 선 회귀를 사용하여 작성하였다. 표준 곡선 피트 (fit) 값은 값이 0.99보다 클 때 허용되었고, 복제 샘플에 대한 RSD 값은 0-10%이다.
- [0111] 결과는 CocE가 인간 혈장 내에서 돌을 잠깐 동안 혼합할 때 코카인을 매우 급속하게 분해할 수 있음을 입증한다 (예를 들어, 도 4 참조). 제1 시점은 코카인 에스테라제 또는 에스테라제 비히클의 첨가 전에 코카인 농도를 나타낸다. 에스테라제 처리 전에 코카인 수준은 유사하였지만, 코카인 에스테라제 투여 1 min 이내에 코카인 수준은 비히클-처리된 혈장 샘플에 비해 적어도 100배 내지 약 2 μ M로 감소하였다. 코카인 수준은 에스테라제-처리된 혈장 샘플 내에서 계속 감소하여, 2분 시점마다 1 μ M 미만으로 떨어졌다.
- [0112] 효소의 치료 효능은 CocE의 단일 정맥내 주사 후에 독성 효과를 내기 위해 요구되는 코카인의 증가하는 용량에 의해 입증하였다. 야생형 효소는 래트 및 인간 혈청에서 생체 외에서 코카인 분해를 위한 급속한 운동학을 입증하였다. CocE의 2개의 불활성 돌연변이체는 코카인의 독성 효과로부터 래트를 보호하지 못하였고, 이는 보호 효과가 가수분해 활성으로 인한 것임을 보여주는 것이다. 또한, CocE는 CocE에 의해 표적화되는 벤조일 에스테르 모이어티가 결합된 코카인 유사체인 WIN-35065-2의 치사율을 변화시키지 않았다. CocE의 생체내 및 생체의 특성 분석은 인간에서 독성에 대한 적합한 해독제 (antidote)로서의 효소의 역할을 지지한다.
- [0113] **실시예 3: 예측된 열 안정성 돌연변이체 CocE**
- [0114] 본원에 설명된 돌연변이체 CocE의 합리적 디자인은 분자 동역학 (MD) 시뮬레이션에 기초하였다. CocE의 컴퓨터 모델은 야생형 CocE의 공개된 결정 구조 (예를 들어, 도 2 참조)를 사용하여 작성하였다. 상기 모델은 활성 부위에서 구조를 파괴하지 않으면서 단백질의 이론적 용점을 증가시키는 특정 아미노산 변형을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 적절한 분자 동역학 (MD) 시뮬레이션에 기초한 분자 모델링은 증가된 열 안정성을 갖는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 설계하기 위해 부위-지정 돌연변이 유발을 합리적으로 유도할 수 있다. 전통적인 MD 시뮬레이션을 통해, 많은 작은 연속적인 시간 단계를 결합된 상호작용 (결합, 각, 및 2면각), 비-결합된 판 데어 발스 상호작용, 및 정전기적 상호작용 기반 또는 순 원자 전하를 포함하는 파라미터화된 상호작용 기능 (역장)의 세트에 의해 결정된 원자력 하에 취함으로써 큰 시스템의 시간 진화를 연구할 수 있었다. 단순한 역장

형태 때문에, MD 시뮬레이션은 심지어 십만 개 이상의 원자를 수반하는 매우 큰 시스템에 대해 의미있는 앙상블 평균 특성을 제공하기 위해 충분히 긴 시뮬레이션 시간 동안 수행할 수 있다. 따라서, CocE 및 각각의 제안된 돌연변이체에 대해, MD 시뮬레이션은 물 중에서 시뮬레이션된 폴리펩티드의 합리적인, 역학적으로 평균화된 3D 구조를 생성시킬 것이다.

[0115]

세균 코카인 에스테라제 (CocE)의 X-선 결정 구조 (PDB 코드 1JU3)에 기초하여 (Larson et al. (2002) Nature 9, 17), 열역학적 안정성에 대한 컴퓨터 모델링에 적합한 (-)-코카인과 CocE 결합의 완전 3D 모델을 제작하였다. CocE의 열 안정성을 증가시키기 위해서, 활성 부위 구조를 구조상 파괴하거나 그의 유연성을 켜칠 수 있는 백본에서의 임의의 이동 (shift)을 최소화하면서 제시된 폴드 내에서 열안정화 돌연변이를 예측할 수 있는 RosettaDesign 프로그램 (Kuhlman and Baker (2000) PNAS 97, 10383)으로 컴퓨터에 의한 방법을 실행하였다. RosettaDesign 프로그램으로 실행된 방법에서는 제시된 폴드에 대한 특정 서열의 적합성을 평가하기 위해 에너지 함수를, 서열 공간을 샘플링하기 위해 Monte Carlo 검색 알고리즘을 사용한다. 다른 연구자들에 의해 촉매 효율을 감소시키지 않으면서 효소의 열 안정성을 증가시키기 위해 유사한 방법이 성공적으로 사용되었다 (Korkegian et al. (2005) Science 308, 857). 비-표준 잔기 원자에 대한 부분 원자 전하는 Amber7 (또는 8) 프로그램 패키지의 Antechamber 모듈에서 실행된 표준 RESP 프로토콜을 사용하여 계산하였다 (Case, 2002). RosettaDesign 프로그램을 사용한 컴퓨터 모델링에 의해 보다 낮은 에너지, 따라서 증가된 열 안정성을 갖는 것으로서 계산된 CocE 돌연변이의 세트를 예측할 수 있다 (예를 들어, 표 2 참조). 본 실시예에 대해, 계산에서는 코카인 기질 분자로부터 거리가 6-25 Å인 아미노산 잔기 상의 유일한 가능한 돌연변이를 고려하였다.

[0116]

약 2.1 내지 약 4.5 kcal/mol로 CocE를 안정화시키는 것으로 계산된 확인된 단일 돌연변이 CocE 폴리펩티드는 다음을 포함하였다: L163V (서열 3); V121D (서열 4); S167A (서열 5); Q123E (서열 6); V225I (서열 7); I218L (서열 8); A310D (서열 9); A149S (서열 10); S159A (서열 11); S265A (서열 12); S56G (서열 13); W220A (서열 14); T122A (서열 15); S140A (서열 16); F189L (서열 17); A193D (서열 18); T254R (서열 19); N42V (서열 20); V262L (서열 21); L508G (서열 22); Y152H (서열 23); V160A (서열 24); T172R (서열 25); Y532F (서열 26); T74S (서열 27); W285T (서열 28); L146P (서열 29); D533S (서열 30); A194R (서열 31); G173Q (서열 32); C477T (서열 33); K531A (서열 34); R41I (서열 35); L119A (서열 36); K46A (서열 37); F84Y (서열 38).

표 2

컨센서스(consensus) 방안으로 RosettaDesign 프로그램을 사용하는 컴퓨터 모델링의 요약

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	컨센서스 돌연변이	에너지 변화 (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

[0117]

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

[0118]

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									

실시예 4: T172R 및 S159A 돌연변이체 CocE의 운동학 파라미터

야생형 CocE 및 T172R 및 S159A 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 촉매 효율에 대해 시험하였다.

CocE의 부위 지정 돌연변이 유발 (QuickChange™, 인비트로젠 (Invitrogen))을 수행하여 S159A (서열 11) 돌연변이체 CocE 폴리펩티드를 생성하였다. S159A를 생산하기 위해 사용된 클로닝 및 발현 기술은 아래에 나타낸 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하였다. CocE 유전자는 요구된 특이적 돌연변이를 함유하는 프라이머의 존재 하에 증합효소 연쇄 반응 (PCR)을 통해 증폭하였다 (인티그레이티드 디엔에이 테크놀로지스, 인크. (Integrated DNA Technologies, Inc.)). 특이적 돌연변이를 발현 플라스미드 내로 다시 서브클로닝하고, 상기 플라스미드의 뉴클레오티드 서열을 결정하여 돌연변이의 존재를 입증하였다.

돌연변이체 T172R은 특이적 T172R 돌연변이뿐만 아니라 돌연변이된 유전자의 용이한 검출을 위한 추가의 Sac II 제한 효소 부위를 함유하는 5' 및 3' 프라이머를 사용하는 오버래핑 (overlapping) PCR에 의해 생성하였다. 프라이머쌍 CocE 20-5'F-Nde I (5' GATATACATATGTGGACGGGAATTAC 3') 및 T172R-3'R (5' CAGACCTCGACGTGATGAGCCCGCGCCTATGAGAGCTGACCAGC 3'), 및 CocE-1800-3'R (5' GTGGTGCTCGAGTCGCTTGATAATCG 3') 및 T172R-5'F (5' GCTGGTCAGCTCTCATAGGCCGCGGCTCATCAGTCGAGGICTG 3')을 55°C의 어닐링 (annealing) 온도에서 고충실도 Pfu 효소 (스트라타젠)를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 생성되는 PCR 산물을 조합하고 다시 증폭시켜, T172R 돌연변이를 코딩하는 전장 CocE 유전자를 생성하였다. 유전자를 Nde I 및 Xho I로 소화시키고; 발현 벡터 내로 서브클로닝하고, 그 전체를 서열결정하여, 돌연변이의 존재 및 추가의 PCR-카피 오류 돌연변이의 부재를 확인하였다.

돌연변이를 함유하는 플라스미드를 이. 콜라이 BL21 세포 내로 형질전환시키고, IPTG-유도된 효소를 Ni-아가로스 상에서 정제하였다. 이어서, 발현된 단백질의 효소 활성 및 37°C에서의 열 안정성에 대해 시험하였다. 효소 활성은 실시예 1에 설명된 분광광도 분석을 이용하여 측정하였다. 열 안정성은 또한 야생형 및 돌연변이체를 모두 37°C에서 다양한 시간 동안 예비-인큐베이팅함으로써 분광광도 분석을 통해 시험하였다. 추가로, 야생형 및 T172R 돌연변이체 모두의 열-불안정성의 특성은 변성 및 비-변성 조건 하에 폴리아크릴아미드 겔 전기영

동에 의해 분석하였다. 간단히 설명하면, 돌연변이체 및 야생형 효소 (0.1 mg/ml)를 37°C에서 다양한 시점 동안 인큐베이팅하고, 4°C로 냉각시키고, β-머캅토에탄올을 함유하는 SDS-로딩 염료와 혼합하고, 4°C에서 10% SDS-PAGE 겔 (변성 조건) 상에서 진행시키거나 천연 10% 폴리아크릴아미드 겔 (비-변성 조건) 상에서 진행시켰다. 겔을 10% 메탄올, 7% 아세트산으로 30분 동안 고정시킨 후, Sypro-Ruby 단백질 겔 스테인 (몰레큘라 프로브스 (Molecular Probes), 인비트로젠)으로 3시간 동안 염색하였다. 단백질 염색은 Alphamager™ 3400 (알파 이노테크 (Alpha Innotech))를 사용하여 UV-광 하에 가시화하였다. 마지막으로, 야생형 및 T172R 돌연변이체 모두의 정확한 용점을 윈도우즈용 JASCO V500/FP-750 분석 프로그램에 의해 구동되는 JASCO-810 분광편광계를 사용하는 원 편광2색성에 의해 결정하였다. CD 스펙트럼을 밀리디그리 (millidegree) 단위로 측정하고, PBS 버퍼에 대해 표준화하였다.

[0125]

분광광도 분석 결과는 T172R이 야생형 CocE에 비해 실온에서 증가된 Vmax 및 Km, 및 37°C에서 크게 증가된 Vmax 및 Km을 갖는 것을 보여주었다 (예를 들어, 표 3; 도 5 참조). 실제로, 37°C에서 T172R Vmax 및 Km은 실온에서 야생형 CocE의 Vmax 및 Km에 대등하였다. S159A 돌연변이체 CocE는 야생형 CocE에 비해 37°C에서 약간 증가된 Vmax 및 Km을 보였지만, 실온에서 감소된 Vmax 및 Km을 보였다. 변성 조건 하에 전기영동 (도 6a)은 인큐베이션 온도에 무관하게 약 65000 Da의 야생형 및 T172R 모두에 대해 단일 단백질 밴드를 나타냈고, 이는 단백질 분해가 열불안정성에 대한 메커니즘을 적절하게 설명하지 않음을 나타낸다. 비-변성 겔 (도 6b)는 37°C에서 인큐베이션 전에 야생형 효소에 대한 단일 단백질 밴드를 보여주지만, 37°C에서 인큐베이션 시에 원래의 밴드가 사라짐에 따라 보다 고분자량 종이 나타나는 것으로 보인다. 상기 추정 단백질 응집물은 또한 T172R 돌연변이체에 대해 관찰할 수 있지만, 37°C 인큐베이션 시에 응집까지의 시간은 더 길고, 본 과정에서 T172R 돌연변이체는 야생형보다 37°C에서 대략 8x 더 긴 반감기를 갖는 것으로 추정되었다. 원편광 2색성에 의한 단백질 용점의 분석 (도 7)에서는 단백질 3차 구조에서 감온성 변화가 근-UV 범위의 스펙트럼 (260 nm 내지 320 nm)에서 일어났음이 밝혀졌다. 상기 스펙트럼 구역에서 감온성 변화의 곡선-피팅에서는 야생형 CocE는 용점이 36.15°C이고, 검출가능한 변성은 약 30°C에서 시작함을 나타냈다. T172R 돌연변이체는 용점이 41.43°C이고, 검출가능한 변성은 약 28°C에서 시작하는 것으로 결정되었다. 따라서, 아미노산 172에서 티로신으로부터 아르기닌으로의 단일 아미노산 변화 (열 안정성이 2.8 kCa/mol 증가된 것으로 추정됨)는 야생형 CocE에 비해 5도 증가된 용점을 갖는 것으로 결정되었다.

표 3

[0126]

T172R, S159A 및 wt CocE에 대한 운동학 파라미터.

	S159A	S159A (37°C에서 40min)	T172R	T172R (37°C에서 40min)	wt CocE	wt CocE (37°C에서 40min)
Vmax	876.6	130.7	1466	1267	1264	94.06
Tm	43.65	15.69	88.20	78.80	71.81	12.30

[0127]

실시예 5: 래트에서 생체내 야생형 CocE의 코카인 치사의 방지

[0128]

*생체 내에서 CocE의 에스테라제 활성을 결정하기 위해, 급성 코카인 독성의 설치류 모델을 실행하였다. 고용량의 코카인으로 처리할 때, 래트는 먼저 경련을 보인 후, 호흡 및 운동의 중지를 보였다. 최저 독성 용량의 코카인은 복강내 투여될 때 처리 15분 이내에 사망을 일으켰다.

[0129]

야생형 CocE에 의한 코카인-유도 치사에 대한 보호를 결정하고, 인간 BChE의 보호 효과와 비교하였다. CocE의 에스테라제 활성은 2개의 돌연변이체 효소 (각각은 활성 부위에 3개의 아미노산 중 하나가 결핍된다)의 활성을 평가함으로써 확립하였다. 추가로, 페닐메틸 술포네이트 플루오라이드 (PMSF)에 의한, 활성 부위 내에서 Ser17의 공유 변형에 의해 변형된 야생형 효소의 활성을 결정하였다. 효소에 의한 가수분해의 제안된 부위에 에스테르 다리가 결핍된 코카인 유사체인 WIN 35065-2 (Madras et al. (1989) J Pharmacol Exp Ther 251, 13-141)에 의해 유도된 독성에 대해 효소가 보호했는지를 증명함으로써, 코카인의 에스테라제에 의한 분해가 CocE의 보호 효과의 기전인 것으로 밝혀졌다.

[0130]

케이시당 3마리의 수컷 스프라그-돌리 (Sprague-Dawley) 래트 (300 그램) (할란 스프라그 돌리 (Harlan Sprague Dawley, 미국 인디애나주 인디애나폴리스))를 수용하였다. 경정맥 카테터의 외과적 이식 후에, 모든 래트를 실험 종료까지 개별적으로 수용하였다. 래트를 오전 7:30에 조명을 켜서 12-h 명/암 사이클로

유지하고, 사료 및 물은 자유롭게 이용하도록 하였다. 래트를 염산케타민 (100 mg/kg, i.p.) 및 자일라진 (10 mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후, 정맥내 카테터 (Micro-renethane 관, 15 cm, MRE-040, 브레인트리 사이언티픽 인크 (Braintree Scientific Inc., 미국 매사추세츠주 브레인트리))를 우측 경정맥 내로 이식하였다. 약 3 cm의 카테터를 정맥 내로 삽입하고; 나머지 튜브를 등으로 피하 통과시키고, 여기서 견갑골 사이에 만든 절개부로부터 나오도록 한다. 노출된 관을 1 cm 조각의 스테인레스 스틸 (0.28 직경, 스몰 파츠, 인크. (Small Parts, Inc., 미국 플로리다주 마이애미 레이크스))로 막았다. 카테터를 0.5 ml의 헤파린처리 염수 (50 U/ml)로 매일 플러싱하여 카테터 개방을 유지하였다. 수술 후, 래트를 1주 동안 회복시켰다. 각각의 래트를 단일 실험에 사용하였고, 모든 실험군은 6-8 마리의 래트로 이루어졌다.

[0131] 코카인-유도된 경련 및 사망을 차단한 CocE의 최저 유효 용량을 결정하기 위해, 0.1, 0.32, 또는 1.0 mg CocE 또는 비히클 (인산염 완충 염수, PBS)을 180 mg/kg 코카인 (i.p.) 투여 1분 후에 정맥내 투여하였다. CocE의 촉매 한계를 결정하기 위해, 1.0 mg CocE (i.v.) 투여 1분 전에 증가하는 용량의 코카인을 투여하였다 (100, 560, 1000 mg/kg, i.p.). 돌연변이체 및 PMSF-차단된 CocE를 180 mg/kg 코카인 (i.p.) 투여 1분 전에 투여하였다 (1 mg, i.v.). 최저 용량의 WIN-35065-2 (560 mg/kg, i.p.) 투여 1분 후에 CocE (1.0 mg, i.v.)를 또한 투여하였다. CocE (1.0 mg, i.v.)를 코카인 (100 mg/kg, i.p.) 투여 전후에 제공하여 에스테라제의 생체내 반감기를 결정하였다. 모든 정맥내 주사 후에 헤파린처리 염수 (0.5 ml)로 플러싱하였다. 처리 후에, 래트를 경련; 및 사망에 대해 관찰하였다. 경련 에피소드의 수, 각각의 에피소드의 지속시간, 및 경련의 종류를 기록하였다. 사망은 관찰된 운동 및 호흡의 정지로서 규정하였다. 경련 및 치사를 나타낸 각각의 실험군 내의 동물의 %를 계산하였다. 이어서, 표준 오차 평균%를 각각의 데이터 점에 대해 계산하였다.

[0132] 결과는 급성 독성의 설치류 모델에서, 코카인이 래트에서 용량-의존적으로 경련 및 사망을 유도하였음을 보여주었고; 사망은 100 mg/kg 코카인을 제공한 동물의 100%에서 투여 후 15분 이내에 관찰되었다 (예를 들어, 도 9 참조). 코카인 투여 후 주사된 CocE (1.0 mg)은 코카인-독성 용량 효과 곡선에서 10배 이동을 일으켰고 (예를 들어, 도 9 참조), 따라서 CocE의 보호적, 촉매 특성을 극복하기 위해 1000 mg/kg 코카인이 요구되었다. 상기 처리 요법은 코카인을 섭취하거나 흡입하거나 주사한 후에만 과용에 대한 해독제가 제공되는 인간 독성 상황과 매우 유사하다.

[0133] 야생형 CocE는 인간 BChE에 비해 우월한 촉매 효율을 보였다. 180 mg/kg 코카인 투여 1분 전에 제공될 때, 1 mg CocE는 코카인-유도 치사에 대해 100% 보호를 제공한 반면 (예를 들어, 도 10 참조), 10배 몰 당량 용량의 인간 BChE (13 mg)는 보호를 제공하지 않았고, 10배 더 적은 용량의 CocE (0.1 mg)과 유사하였다 (예를 들어, 도 10 참조).

[0134] CocE의 두 돌연변이체 (Ser117Ala 또는 Tyr44Phe)는 생체내 활성이 결핍되고, 따라서 보호 효과가 없었다 (도 11b). 또한, PMSF-처리된 효소도 코카인에 대한 CocE의 보호 효과를 제거하였다 (도 11b). 추가로, 가수분해가 불가능한 코카인 유사체인 WIN 35065-2의 치사 효과는 CocE를 사용한 처리에 의해 극복되지 않았다 (도 12). 촉매로 불활성화시킨 효소 제제 (PMSF-처리된 및 CocE 불활성 돌연변이체)를 사용하여 수행된 생체내 보호 연구에 기초하여, 효소의 보호 효과가 코카인을 가수분해하는 그의 능력으로 인한 것임이 명백하다. 함께 평가할 때, 상기 데이터는 CocE의 에스테라제 활성의 시험관 내 평가와 일치하고, 생체 내에서 코카인-유도 치사에 대한 효소의 보호 기전을 입증한다.

[0135] **실시예 6: 야생형 CocE의 시간-의존 효과**

[0136] 코카인 투여 전에 야생형 CocE의 투여 효과를 조사하였다. 래트 독성 모델은 실시예 5에 설명된 바와 같았다. 야생형 CocE를 코카인 투여 100, 30, 10, 3 및 1분 전과 1 및 6분 후에 투여하였다. 인간 혈장 샘플로부터의 화합물 추출은 100% 아세토니트릴 (3x 부피) 내에서 수행하고, 약 15 min 동안 인큐베이팅하고, 13,000 rpm에서 4.5 min 동안 원심분리하고, 생성되는 상등액을 모았다. 추출물을 Savant Speed Vac (써모일렉트론 코프.) 상에서 농축시켜 아세토니트릴을 제거하였다. 추출된 샘플을 물 중에 재구성하고, 10-1000배로 추가로 희석하였다.

[0137] 인간 혈장 샘플을 300 μM 코카인으로 스파이킹하고, 37°C에서 유지하였다. 혈장의 하나의 분취액을 코카인 에스테라제 또는 에스테라제 비히클의 투여 전에 샘플링하고, 다른 분취액을 에스테라제 투여 1 min 후에 모았다. 혈장 분취액을 즉시 내부 표준품 (코카인-D₃) 및 불화나트륨 포화 용액과 혼합하여 추가의 코카인 대사를 방지하였다. 조직 추출을 수행하고, 코카인 및 내부 표준품의 수준을 텐덤 질량 분광법과 함께 HPLC에 의해 정량하였다.

- [0138] 시험관 내에서 CocE의 시간-의존 불활성화를 위해, 정제된 CocE 효소 (250 ng/ml)를 분석 버퍼 내에서 코카인의 부재 하에 37°C에서 다양한 시간 동안 인큐베이팅하였다. 37°C에서 인큐베이팅한 후, 샘플을 얼음 상에 놓았다. CocE 활성에 대한 온도의 효과를 평가하기 위해, 샘플을 (-)-코카인과 함께 지시된 바와 같이 다양한 농도에서 125 ng/ml의 최종 효소 농도에서 인큐베이팅하였다. A240에서 (-)-코카인의 붕괴 속도를 멀티플레이트 판독기 상에서 측정하였다. 데이터를 Kaleidagraph™ (시너지 소프트웨어 (Synergy Software))를 사용하여 단일 지수 붕괴에 피팅하여, 13.2의 t_{in} 을 얻었다.
- [0139] 야생형 CocE는 시간-의존 보호 효과를 갖는 것으로 밝혀졌고; 코카인 투여 1분 전에 CocE (1 mg)로 처리할 때 100%의 래트가 생존한 반면, 각각 코카인 투여 30분 및 1분 전에 CocE로 처리할 때 단지 66% 및 32%의 래트가 생존하였다 (예를 들어 도 14 참조). 래트를 코카인 투여 100 min 전에 처리할 때 CocE의 보호 효과는 제거되었다. 상기 시간-의존 효과는 아마도 생체 내에서 효소의 열 실활 때문인 것으로 보인다. 래트 혈장 내에서, CocE는 아마도 pH 및 온도의 변화에 대한 감수성으로 인해 현저하게 짧은 반감기 (약 10분, 도 13)를 갖는 것으로 밝혀졌다. 추가로, 정제된 효소를 사용하는 예비 시험관 내 데이터는 CocE가 37°C에서 약 15 min의 $t_{1/2}$ 로 온도-의존 불활성화를 겪는 것을 제안한다.
- [0140] 상기 데이터를 통해, 코카인 투여 30분 전에 투여된 1 mg의 CocE 용량은 약 3 반감기로 붕괴하여, 코카인이 투여될 때 전체 순환계 내에 0.25 mg의 야생형 효소를 남길 것으로 대략 추정할 수 있다.
- [0141] 선행 연구에서는 래트에서 코카인의 치사 혈액 농도가 50-128 μ M이고 ([Mets B and Virag L (1995) Anesth Analg 81, 1033-1038]; [Mets et al. (1999) Life Sci 65, 1317-1328]), 코카인의 피크 혈장 수준은 복강내 주사의 약 13분 후에 일어난다고 제안하였다 (Sun et al. (2002) J Pharmacol Exp Ther 302, 710-716). 복강내 코카인 투여의 보고된 운동학에 기초하여 (Sun et al. (2002) J Pharmacol Exp Ther 302, 710-716), 100 및 320 mg/kg 코카인은 각각 35 μ M 및 113 μ M의 피크 코카인 혈액 농도를 유도하는 것으로 추정된다. 코카인의 치사 농도는 인간에서와 유사한 크기이다 (20-200 μ M) ([Finkle BS and McCloskey KL (1978) J Forensic Sci 23, 173-189]; [Wetli and Wright (1979) J Am Med Assoc 241, 2519-2522]). 1 mg의 야생형 CocE는 상기 용량의 코카인으로 처리한 래트를 생존시켰으므로 (도 9), 상기 효소가 인간에서 코카인-독성에 대해 보호할 것으로 예측할 수 있다. 또한, 코카인의 보고된 독성 수준을 초과하는 농도인 300 μ M 코카인으로 스파이킹한 후 CocE (본 발명의 생체 내 1.0 mg 용량의 물 당량)로 처리한 인간 혈장 내에서 코카인 수준을 고성능 액체 크로마토그래피 탠덤 질량 분광법을 사용하여 측정하였고, 이는 코카인 농도를 1분 미만 내에 약 2 μ M로 감소시켰다 (도 10).
- [0142] 래트에서 LD50 용량의 코카인에 대한 보호에는 BChE의 10 mg/kg 처리를 필요로 하고 (Lynch et al. (1997) Toxicol Appl Pharmacol 145, 363-371), 효소가 인간 내에서 유사하게 분포되는 것을 가정하면 70 kg의 개인은 과용에 대해 보호하기 위해 700 mg 용량의 외인성 BChE를 필요로 할 것이다. 또한, 코카인 독성에 대한 해독제의 필수 특징인, 코카인 투여 후에 투여될 때 BChE가 코카인-독성을 역전시키는 역할을 할 수 있다는 증거가 존재하지 않는다.
- [0143] 따라서, 300 그램 래트에서 1 mg의 야생형 CocE의 용량이 LD100을 초과하는 코카인의 용량에 대해 보호 효과를 제공하기에 충분함이 입증된다 (도 9). 추가로, LD100 용량의 코카인의 투여 전에, 및 더 중요하게는 투여 후 6분 이내까지 제공된 효소는 독성으로부터 보호를 제공하였다 (도 14). CocE는 혈청 내의 코카인 농도를 1분 미만 내에 150배 대사시켰다 (도 15).
- [0144] 상기 데이터를 고려하여, 독성 코카인 섭취 후에 70 kg의 인간에게 투여된 250 mg의 CocE는 개인을 사망으로부터 구제할 것으로 예측된다. 상기 사실은 야생형 CocE가 효율적인 항-코카인 분자이지만, 생리학적 조건 하에서 효소의 짧은 활성 시간으로 인해 치료 가치가 제한됨을 입증한다. 상기 결과는 야생형 CocE의 열 안정성 연구의 중요성을 제시한다.
- [0145] **실시예 7: 래트에서 생체내 T172R 돌연변이체 CocE의 코카인 치사의 방지**
- [0146] 래트에서 코카인-유도 치사를 방지하는 그의 능력을 평가함으로써 야생형 CocE 및 T172R 돌연변이체 CocE의 가수분해 활성을 생체 내에서 특성화하고 확인하였다.
- [0147] 동물 처리는 실시예 5에서와 동일하였다. 증가하는 용량의 코카인을 래트에게 투여하고 (i.p.), 1분 후에 야생형 CocE (0.32 mg), 돌연변이체 CocE T172R (0.32 mg), 또는 비히클을 정맥내 투여하였다. 모든 정맥내 주사 후에 해파린처리 염수로 플러싱하였다 (0.5 ml). 처리 후에, 래트를 사망에 대해 관찰하였다. 사망까지의 시

간을 1 g/kg 코카인 투여량에 대해 기록하였다. 야생형 및 T172R CocE (0.32 mg)을 320 mg/kg의 코카인의 i.p. 투여 전의 다양한 시간(1, 10, 30 및 60분)에 투여한 후, 래트를 사망에 대해 모니터링하였다.

[0148] 결과는 코카인에 의해 생성된 치사 효과를 역전시키거나 방지하는 정맥내 CocE, 특히 돌연변이체 CocE의 능력을 입증한다. 코카인 투여 1분 후에 투여된 야생형 CocE는 대조 래트를 치사시킨 코카인 투여량에서 치사를 방지하였고, 1 g/kg의 코카인 투여량까지 100% 치사는 일어나지 않았다 (예를 들어, 도 16 참조). T172R 돌연변이체 CocE 처리한 래트는 훨씬 더 높은 투여량을 견딜 수 있었고, 1 g/kg의 코카인은 단지 약 70% 치사를 일으켰다. 그리고, T172R 돌연변이체 CocE의 예방 효과는 야생형 CocE보다 더 오래 지속되었다 (예를 들어, 도 17 참조).

[0149] **실시예 8: 마우스에서 생체 내에서 반복된 CocE 용량**

[0150] 특히 반복된 용량에 관하여 마우스에서 독성에 대한 CocE의 효과에 대해 추가의 연구를 수행하였다.

[0151] 동물 독성 모델은 설명된 것을 제외하고는 앞서 설명된 것과 유사하였다. 수컷 NIH 스위스 (Swiss) 마우스를 사용하였다. 꼬리 정맥내 주사를 위해, 마우스를 작은 구속실에 넣고 이들의 꼬리를 노출시켰다. 적외선 250w 전구를 갖는 가열 램프를 꼬리로부터 약 4 인치에 놓고, 수분 동안 방치하였다. 이어서, 꼬리를 알콜 와이프 (wipe)로 세척하고, 30G 1/2 정밀 글라이드 (precision glide) 바늘 (피셔 사이언티픽 (Fisher Scientific))을 주입을 위해 측면 정맥 중 하나에 삽입하였다. 바늘이 정맥 내에 있는지 증명하기 위해, 소량의 약물을 주입하고, 정확한 위치에 존재하면 용액은 주사 부위에서 백색으로 나타나는 부정확한 피하 위치의 표시 없이 쉽게 주입될 것이다. 정맥내 카테터 삽입을 위해, 수컷 NIH 스위스 마우스를 i.p로 동시 투여된 케타민 100 mg/kg 및 자일라진 10 mg/kg로 마취시켰다. 마우스가 발 압력에 더 이상 반응하지 않을 때, 목을 면도하고 베타딘 및 알콜 와이프를 교대로 사용하여 준비하였다. 청정 조건 하에, 우측 가로 목 절개를 수행하고, 외부 경정맥을 분리하였다. 카테터를 해부 현미경의 도움으로 우심방의 수준으로 정맥 내로 삽입하고, 나일론 4-0 봉합사와 조직 접착제 3M Vetbond (3엠 애니멀 케어 프로덕츠 (3M Animal Care Products, 미국 미네소타주 세인트 폴))를 사용하여 정맥 내에 고정시켰다. 카테터는 내경 0.010 인치 및 외경 0.030 인치의 짧은 길이의 Tygon 관 (스몰 파츠, 인크.)이다. 동물 등의 중앙부를 작게 절개하고, 투관침을 배쪽 절개 부위에서 빠져나가도록 피하 삽입하였다. 이어서, 카테터를 투관침을 통해 동물의 등 밖으로 당기고, 여기서 나일론 봉합사와 조직 접착제를 사용하여 제자리에 유지하였다. 직경 0.011 인치의 짧은 조각의 스틸 와이어 (스몰 파츠, 인크.)를 카테터의 단부 내로 삽입하였다. 배쪽 절개부를 4-0 Vicryl 봉합사로 봉합하고, 마우스를 가열 램프 하에서 회복시켰다. 대략 1시간 후, 마우스를 그의 원래 케이지로 돌려보냈다.

[0152] 0.32 mg CocE 및 320 mg/kg 코카인의 조합물의 제1 투여시에 생존한 마우스에게 초기 투여 14일 후에 상기 조합물을 다시 투여하였다. 모든 마우스가 상기 제2 투여에서 생존하였다. 모든 마우스는 또한 제1 용량 조합물의 투여 21일 후의 제3 투여에서 생존하였다. 반복된 투여의 유효성은 아마도 그의 급속한 제거로 인해 상기 제제 내의 CocE에 대해 강한 면역 반응이 발생하지 않음을 제안한다.

[0153] 결과는 사망을 일으키는 코카인의 효능에서 우측으로의 극적인 이동이 0.32 및 1.0 mg/kg 코카인 모두에서 발생하였음을 보여주었다 (예를 들어, 도 18 참조). 사망에 이르는 잠재기는 CocE에 의해 현저하게 연장되었고, 180 mg/kg의 코카인 i.p. 투여 후에, 마우스는 일반적으로 약 3 min 내에 사망하였다. 1.0 g/kg 코카인 + 1.0 mg의 CocE의 투여 후에, 사망은 평균적으로 28분에서 일어났다. 또한, hBChE가 코카인의 독성을 차단하는 능력에 대해 데이터를 조사하였다. 1 mg의 용량에서, hBChE는 마우스를 치사시키는데 필요한 코카인의 용량을 약간 증가시켰다 (예를 들어, 도 18 참조). 상기 효소는 CocE보다 그 효과가 현저하게 더 작았다. hBChE 투여 후에 마우스를 치사시키는데 필요한 코카인의 용량이 더 많지만, 사망까지의 시간은 상기 효소에 의해 변경되지 않았다.

[0154] **실시예 9: 생체내 반감기 및 생체분포 시험**

[0155] 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 생체내 반감기 및 생체분포를 BALB/c 마우스에서 조사하였다. 간단히 설명하면, 잘 확립된 클로라민-T 요오드화 방법 (Hunter, WM and Greenwood, FC (1962) Nature 194, 495-496)을 사용하여 돌연변이체 CocE의 티로신 잔기에 ¹²⁵I를 표지하였다. BALB/c 마우스의 꼬리 정맥을 통해 0.1 mL의 0.5 μCi ¹²⁵I-표지된 돌연변이체 CocE 또는 돌연변이체 CocE-PEG 컨쥬게이트를 주사하였다. 각각의 실험군은 24마리의 마우스로 구성된다. 약물을 주사한 지 15, 30, 90분, 3, 12, 24, 48 및 72시간 후에 3마리의 마우스를 경추 탈구에 의해 희생시켰다. 혈액 샘플 및 간, 폐, 심장, 신장 및 비장의 조직 샘플을 수집하고, 칭량한 후, 감마 계수기를 사용하여 방사성을 측정하였다. 혈액 샘플을 또한 원심분리하고, 상등액을 수집하고, 혈장-회합 방사

성 표지의 추정치를 계수하였다. 피크 대 내부 표준품의 피크 비율을 분석 파라미터로서 사용하였다. PK 파라미터는 혈장 방사성 데이터를 하기 쌍지수적 식 (biexponential equation) (Gibaldi, M. and Perrier, D. (1982) Pharmacokinetics)에 피팅함으로써 KINFT (Kaltenbach, ML and Vistelle, R (1994) Anticancer Research 14, 2375-2377) 비선형 최소-제곱 컴퓨터 프로그램을 사용하여 계산한다:

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

식에서, A(t) = %ID/mL 혈장이고, ID = 주사된 용량이다. k_2 는 1차 제거 시간 $t_{1/2}$ 을 계산하기 위해 사용될 것이다. 혈장 농도-시간 곡선의 곡선하 면적 (AUC), 분포의 정상-상태 부피 (V_{ss}), 총 혈장 제거 (C1), 및 평균 체류 시간 (MRT)은 문헌 (Gibaldi and Perrier, 1982)에 기재된 바와 같이 A_1 , A_2 , k_1 , k_2 , 및 마우스의 체중 (kg)으로부터 계산한다. 장기 투과성-표면적 (PS) 곱 (product)은 다음과 같이 계산한다:

$$PS = [V_d - V_0]C_{p(60min)} / AUC_{(0-60min)}$$

여기서, $C_{p(60min)}$ 은 주사 60 min 후에 말단 혈장 농도 (dpm/ μ l)이고, V_d 는 1분당 조직 1그램당 봉해 대 $C_{p(60min)}$ 의 비로부터 결정된 조직 분포 부피이고, V_0 는 장기 혈장 부피이다. 샘플의 장기 전달은 다음과 같이 결정된다:

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

여기서, %ID/g는 장기 1그램에 의해 섭취된 주사된 용량 %이다.

실시예 10: 면역학

CocE는 마우스를 면역화시키기 위해 불완전 프로인트 (Freund) 면역보강제 (IFA) 내에서 사용할 수 있다 (표 4 참조). CocE 항체에 특이적인 직접적 ELISA를 표준 프로토콜에 의해 수행하였다. 코카인 에스테라제 (50 μ l/웰)를 재현탁시키기 위해서 보레이트 완충 염수 (1.5 M NaCl, 0.5 M H_3BO_3 , 1.0 M NaOH)를 사용하여 96-웰 미량 역가 플레이트를 CocE (1 μ g/ml)로 코팅하였다. 코팅 플레이트를 4°C에서 철야 방치하였다. 다음날 아침에 코팅 버퍼를 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 2% 정상 염소 혈청으로 1 hr 동안 37°C에서 차단하고, 3회 세척하였다. 다양한 군의 마우스로부터의 혈청을 10^2 내지 10^7 의 범위로 웰 내에서 50 μ l의 PBS로 연속적으로 희석하고, 2회 실험을 수행하였다. 플레이트를 덮고, 30분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 후속적으로, 플레이트를 3회 세척하고, 50 μ l/웰의 염소 항-마우스 IgG 퍼옥시다제 표지된 항체로 1:400으로 희석하였다. 이어서, 플레이트를 3회 세척하고, 100 μ l 퍼옥시다제 기질 용액 (시트레이트 포스페이트 버퍼에 용해시킨 OPD)을 각각의 웰에 첨가하였다. 5-10분 인큐베이션 후 (양성 대조군에서의 발색을 기초로 하여), 3M H_2SO_4 (50 μ l/웰)를 사용하여 반응을 정지시켰다. 플레이트를 490 nm에서 판독하고, 배경 흡광도보다 증가를 보인 가장 높은 희석액에 의해 역가를 결정하였다. 양성 대조군은 복강내 (IP) 주사에 의해 불완전 프로인트 면역보강제 (IPA) 내에 용해시킨 100 μ l의 코카인 에스테라제 (100 μ g)로 Balb/c 마우스를 면역화시킴으로써 유도하였다. 양성 1군에서, 혈청을 2주 면역화시킨 마우스로부터 단리하였다. 양성 2군에서, 면역화시킨 마우스를 1차 면역화 2주 후에 IP 주사에 의해 100 μ l 중의 100 μ g으로 부스팅하고, 혈청을 추가로 1주 후에 (1차 면역화 3주 후) 수거하였다.

고 역가는 CocE로 면역화시킨 2개의 양성 대조군으로부터 유도되었다 (각각 10^5 및 10^6). 코카인 시험 투여 동안 CocE를 i.v 투여한 동물로부터 얻은 항체 역가는 CocE + IFA로 면역화시킨 양성 대조군 동물에 비해 검출가능하지만 비교적 낮은 역가를 보여주었다. CocE/IFA로 1회 면역화시킨 동물로부터 얻은 혈청은 10^5 의 높은 역가를 보였지만, 추가의 부스팅 투여를 실시한 동물로부터의 혈청(3마리 마우스/군)은 10^6 의 보다 높은 역가를 가졌다. 상기 동물로부터 수거한 혈청은 모든 후속적인 적정 실험을 위한 양성 대조군으로 기능할 것이다.

표 4

면역화시킨 마우스의 CocE 역가

군	프로토콜	역가 (\log_{10} 희석액 \pm SE)
양성 1군 (n=3) 2주	면역화 (IFA/IP)	5
양성 2군 (n=3) 3주	면역화/부스팅 (IFA/IP)	6
시험 투여 및 처리 (3x)	코카인과 함께 CocE 투여	3.33 \pm 0.333

시험 투여 및 처리 (4x)	코카인과 함께 CocE 투여	3.5±0.5
-----------------	-----------------	---------

실시예 11: CocE 폐길화

효소 분자당 1 내지 2개의 PEG 중합체의 컨쥬게이션이 일반적으로 목적하는 보호 효과의 생성에 충분하다 (Avramis et al. (2002) Blood 99, 1986-1994). 각각의 야생형 CocE 분자는 8개의 라이신 잔기를 함유하는 것으로 보고되고, 여기서 잔기는 활성 부위에는 존재하지 않고, 2개의 잔기만이 활성 부위에 근접하여 존재하기 때문에 (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307), 폐길화를 위해 라이신을 표적화하는 것이 효소를 불활성화시킬 것으로 보이지 않는다. 돌연변이체 CocE를 모두가 활성화된 N-말단 기능적 히드록시숙시닐 에스테르기를 함유하는 다양한 모노메톡시-PEG (m-PEG) 중합체 (3-12 KDa의 MW 범위) (mPEG-NHS; 쉬어 워터 인크. (Shear Water Inc., 미국 알라바마주 버밍엄))와 혼합하였다. 분자량이 5.5 KDa인 PEG를 먼저 시도하고, 그 이유는 본 발명자들의 결과 및 다른 연구자의 결과 (예를 들어, [Veronese, FM and Harris, JM (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 453-456]; [Avramis et al. (2002) Blood 99, 1986-1994] 참조)가, 상기 분자량이 유의한 보호를 보임을 입증하였기 때문이다. 최적 조건을 얻기 위해, 1:2 내지 1:10의 상이한 물비의 [NH₂]:[mPEG] (전자는 돌연변이체 CocE의 라이신 잔기의 총 물수를 기초로 하여 계산됨)를 시험하였다. 컨쥬게이션은 부드럽게 교반하면서 약 40분 동안 4°C에서 진행시켰다. 이어서, 4°C에서 환외여과 (MWCO 10,000)에 의해 반응 산물을 정제하였다. 폐길화된 돌연변이체 CocE 산물의 활성은 기 확립된 절차 (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307)를 사용하여 코카인 가수분해의 초기 속도를 측정함으로써 결정하였다. 또한, MALDI-TOF 질량 분광법을 상기 산물에 대해 수행하여 폐길화 정도 및 이들의 분자량을 분석하였다. 폐길화된 산물은 -40°C에서 저장하고, 사용하기 직전에 해동시킨다.

돌연변이체 CocE-PEG 컨쥬게이트의 최적 pH, 온도, 이온 강도, 및 운동학 파라미터 (예를 들어 Km, Vm)의 결정을 포함하는 표준 특성 분석을 PBS에서 수행하였다. 또한, 폐길화된 산물의 열 안정성 및 단백질 분해에 대한 그들의 안정성을 인간 혈액 또는 혈액의 존재 하에 조사하였다. 돌연변이체 CocE-PEG 산물의 생체내 기능 시험은 상기한 바와 같이 수행하였다. 유리 CocE와 비교한 돌연변이체 CocE-PEG 컨쥬게이트의 생체내 반감기 및 생체분포는 상기한 바와 같이 수행하였다 (실시예 9 참조).

폐길화 실험으로부터 얻은 결과에 대해 통계학적 분석을 수행한다. 데넛 (Dennett)의 후-시험 (post-test)과 함께 무작위 차단 2원 (random block two-way) ANOVA를 윈도우즈용 GraphPad (미국 캘리포니아주 샌디에고) Prism 및 GraphPad 소프트웨어를 사용하여 두 변수가 존재하는 데이터 세트에 대해 수행하였다. 두 조건이 존재하는 실험을 위해 대응 표본 (paired) t-시험을 수행하였다.

고분자량 (예를 들어, 60 KDa 이하)의 분지형 PEG에 대한 돌연변이체 CocE의 컨쥬게이션을 또한 수행할 수 있다 (예를 들어, [Reddy et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 571-586] 참조).

추가로, 부위 특이적 폐길화가 기능적 및 구조적 이질성을 감소시키기 위한 실행가능한 대안일 수 있다. 활성 부위 근처에 시스템 잔기의 제거 또는 단백질 표면 상의 시스템 잔기의 도입은 보다 우수한 폐길화 기질로서 기능할 수 있다 (말레이미드 커플링을 통한). 유사하게, PEG의 CocE에 대한 아민-커플링은 임의의 돌연변이체 CocE에 대해, 예를 들어 아르기닌 잔기의 보존적 치환을 통해 사용될 수 있다 (야생형 CocE에 총 9개의 라이신이 존재하고, 이중 7개는 표면 라이신임).

예비적인 발견은 야생형 (WT) CocE가 상기 설명된 절차를 사용하여 한 말단에 활성화된 숙신이미딜 관능기를 함유하는 모노메톡시-PEG (m-PEG) 중합체 (MW: 5.5 KDa)와 성공적으로 연결되었음을 보여주었다. 초기 CocE 활성의 높은 수율 (>70%)은 폐길화 반응 후에 회복되었다. MALDI-TOF 질량 스펙트럼은 PEG-CocE 산물에 대한 4개의 1차 피크를 보여주었고, 이는 상이한 수의 PEG 사슬 (각각 1 내지 4 범위)을 함유하는 컨쥬게이트의 이질적 혼합물의 존재를 나타낸다 (예를 들어, 도 19 참조). 문헌에는 단백질 분자당 단지 1-2개의 PEG 사슬의 컨쥬게이션이 PEG-유도된 보호 효과를 생성시킬 수 있을 것으로 제안되었다 ([Veronese, FM and Harris, JM (2002b) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 457-606]; [Avramis et al (2002) Blood 99, 1986-1994]). 이와 관련하여, 본원에서 사용된 폐길화 방법은 상기 요건을 분명히 충족시킨다.

실시예 12: RBC 봉입

CocE의 RBC 봉입은 연결된 PTD 펩티드를 통해 달성할 수 있다. LMWP는 단백질을 세포막을 가로질러 이동시키는 그의 효능 (Park et al. (2005) FASEB Journal, in press) 및 독성 결여 (Chang et al. (2001) AAPS Journal 3, Article #17, #18 and #19) 때문에 돌연변이체 CocE를 RBC 내로 수송하기 위한 PTD 펩티드로서 선택되었다.

봉입된 돌연변이체 CocE가 RBC에 영구적으로 매입되는 것을 보장하기 위해서, CocE와 LMWP 사이의 연결은 돌연변이체 CocE-LMWP 컨쥬게이트가 RBC 내로 도입된 후에 자동적으로 급속하게 분해될 수 있다. 링커, 예를 들어 상승된 세포질 글루타티온 및 리덕타제 활성의 존재 때문에 RBC 내에서 신속하게 분해되는 디설피드 (S-S) 결합 (Trouet et al. (1982) Proceeding of the National Academy of Science 79, 626-629)은 CocE가 RBC 내에 유지되는 것을 확실하게 한다.

- [0175] S-S 결합으로 연결된 돌연변이체 CocE-LMWP 컨쥬게이트를 생성시키기 위해서, LMWP의 N-말단의 아민기 (LMWP 상의 유일한 -NH₂기입)를 먼저 SPDP1로 활성화시킨 후, 돌연변이체 CocE 상의 (야생형에 4개 존재하는) 유리 시스템인 잔기 중의 하나와 S-S 결합을 형성시키기 위해 이전에 개발된 변형된 절차에 따라 (Liang et al. (2000) AAPS Pharmaceutical Science 2, Article 7), 활성화된 LMWP를 디티오프레이톨 (DTT)의 존재 하에 돌연변이체 CocE와 혼합하였다 (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307). CocE는 DTT 중에서 보관할 때 안정하고 (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307), 이것은 컨쥬게이션을 위해 상기 유리 시스템인 기를 사용할 경우에 상기 효소의 촉매 활성이 손상될 것으로 보이지 않음을 제한한다 (야생형 CocE에서 각각의 시스템의 세린으로의 이미 수행된 돌연변이는 활성을 감소시키지 않았다). 이어서, 최종 LMWP-CocE 산물은 헤파린 칼럼을 통해 정제하고, 동결건조에 의해 보관하였다.
- [0176] 봉입은 RBC를 돌연변이체 CocE-LMWP와 함께 30-60분 동안 인큐베이팅하여 달성하였다. PTD-매개된 세포 도입은 온도-비의존적이기 때문에 (Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572), 봉입은 RBC의 기능성을 최대로 보존하기 위해서 4°C에서 수행하였다. RBC 내 돌연변이체 CocE의 포획의 과정 및 정도는 FITC-표지된 돌연변이체 CocE를 사용하여 공촛점 현미경 및 유동 세포 분석에 의해 모니터링된다. 돌연변이체 CocE-포획된 RBC의 형태도 SEM에 의해 조사한다.
- [0177] RBC (예를 들어 산소 전달 활성) 및 돌연변이체 CocE (예를 들어 코카인-가수분해 활성, 운동학 특성, 예를 들어 Km, Vm 등)의 기능성 평가, 돌연변이체 CocE의 RBC로부터의 누출 (즉, 돌연변이체 CocE-로딩된 RBC를 버퍼 내에서 인큐베이팅한 후, 상등액에서 효소 활성을 측정함으로써), 및 포획된 돌연변이체 CocE의 단백질 분해에 대한 안정성을 포함하여 기본적인 특성을 버퍼 또는 혈장에서 분석하였다. RBC-봉입된 돌연변이체 CocE에 대해 얻은 결과를 유리 효소에 대해 얻은 결과와 비교하였다. 돌연변이체 CocE-봉입된 RBC의 생체내 기능 시험은 상기한 바와 같이 수행하였다.
- [0178] 인간 RBC (미국 적십자 (American Red Cross, 미국 미시건주 디트로이트)로부터 얻음)가 시험관 내 연구를 위해 사용된다. 그러나, 기능 시험 및 약동학 연구를 포함하는 생체내 동물 연구를 위해서는, 세포 생체 부적합성 및 가능한 독성 효과를 방지하기 위해 동일한 동물 종으로부터 얻은 자가 RBC를 사용한다.
- [0179] 돌연변이체 CocE-포획된 RBC의 순환 반감기 ($t_{1/2}$)는 상기 설명된 바와 동일한 절차에 따라 ¹²⁵I-표지된 돌연변이체 CocE (즉, 그의 RBC 내로의 로딩 전)를 마우스 내로 주사함으로써 결정하였다. 각각의 실험 세트는 24마리의 마우스로 구성된다. 3마리의 마우스를 3-, 6-, 12-, 24시간 및 3-, 6-, 10-, 및 15일 시간 간격으로 희생시켰다. 혈액 및 조직 샘플을 수집하고, 칭량한 후, 방사성을 측정하였다. 제거 $t_{1/2}$ 및 조직 분포를 포함하는 PK 파라미터는 상기 설명된 바와 같은 KINFT 프로그램을 사용함으로써 계산하였다. RBC-봉입된 돌연변이체 CocE에 대해 얻은 약동학 결과를 유리 돌연변이체 CocE에 대해 얻은 결과와 비교하였다.
- [0180] RBC 봉입 실험으로부터 얻은 결과에 대해 통계학적 분석을 수행하였다. 데넷의 후-시험과 함께 무작위 차단 2원 ANOVA를 윈도우즈용 GraphPad (미국 캘리포니아주 샌디에고) Prism 및 GraphPad 소프트웨어를 사용하여 두 변수가 존재하는 데이터 세트에 대해 수행하였다. 두 조건이 존재하는 실험을 위해 대응 표본 t-시험을 수행하였다.
- [0181] 앞서 제시된 결과가 두 요건을 충족시킬 수 있는지를 조사하기 위해서, PTD-매개된 RBC 봉입에 대한 예비 연구를 L-아스파라기나제를 모델 효소로 사용하여 수행하였다. 강력한 막-투과 활성을 갖는 것으로 입증된 (Park et al. (2005) FASEB Journal, in press), 닥터 양 (Dr. Yang)의 실험실에서 이전에 개발한 PTD 펩티드인 LMWVP (Chang et al. (2001) AAPS Journal 3, Article #17, #1, 및 #19)를 상기 설명된 것과 유사한 절차를 사용하여 아스파라기나제에 연결하였다. 이어서, LMWP-ASNase 컨쥬게이트를 RBC (DBA/2 마우스에서 수집함)와 함께 2 hr 동안 4°C에서 인큐베이팅하였다. 비교를 위해, 봉입된 ASNase를 함유하는 RBC-고스트를 기 확립된 절차 (Updike et al. (1976) Science 193, 681-683)에 따라 제조하였다. 예비 결과는 LMWP-매개된 방법의 로딩 효율이 통상적인 삼투-기반 세포 과열 기술보다 우수하지 않다면 적어도 상기 기술과 대등함을 보여주었다. 그러나, PTD-매개된 방법의 주요 잇점은 처리를 위해 로딩 및 세척 절차의 여러 단계를 모두 필요로 하는 다른 세

포 도입 방법과 달리 단일 단계만을 필요로 한다는 것이다.

[0182] 도 20은 정상 RBC, ASNase-로딩된 RBC-고스트, 및 LMWP-ASNase-로딩된 RBC의 샘플로부터 얻은 주사 전자 현미경 (SEM) 영상을 제시한다. 볼 수 있는 바와 같이, 삼투압 과열/재밀봉 방법으로부터 얻은 ASNase-로딩된 RBC (즉, RBC-고스트)는 형상 및 형태의 유의한 변화를 보였지만, LMWP-ASNase-로딩된 RBC는 정상 RBC와 실질적으로 구분할 수 없는 형상 및 형태 (즉, 양면이 오목한)를 보였다. 상기 발견은 PTD-매개된 세포 봉입이 세포막의 임의의 유의한 변동 또는 변형을 유발하지 않는다는 많은 다른 연구자들의 보고와 일치하는 것이다 ([Dietz, GPH and 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 25, 2437-2443]).

[0183] 상기 2개의 RBC-봉입 시스템을 추가로 평가하기 위해서, 예비 제거 연구를 수행하였다. 혈장 내에서 ASNase 활성의 반감기를 (1) ASNase-로딩된 RBC-고스트, 및 (2) LMWP-ASNase-로딩된 RBC의 정맥내 주사 후에 평가하였다. 각각의 동물 군은 4마리의 DBA-2 마우스로 구성되었고, 각각의 마우스에게 로딩된 ASNase 활성 8 단위를 투여하였다. 혈액 샘플을 상이한 시간 간격으로 꼬리 정맥으로부터 채취하고, 전혈 내의 ASNase 활성의 정도를 생산된 암모니아의 직접적인 네슬러 시약 처리 (Nesslerization)에 의해 측정하였다 (Ho et al. (1970) Journal of Biological Chemistry 245, 3708-15). 그 결과는 RBC-고스트에 대한 순환 반감기 ($t_{1/2}$: 5.9일)에 비해 LMWP-ASNase-봉입된 RBC에 대한 순환 반감기 ($t_{1/2}$: 9.2일)가 거의 2배 증가하였음을 입증하였다 (예를 들어, 도 21 참조). 봉입된 RBC와 정상적인 비처리된 RBC의 반감기 사이의 차이는 현재 알려져 있지 않다. 그럼에도 불구하고, RBC-고스트에 비해 $t_{1/2}$ 가 2배 증가한 상기 결과는, RBC-고스트 봉입 방법을 이용한 경우에도 생체내 ASNase 활성이 유리 ASNase의 26시간으로부터 RBC-고스트-봉입된 ASNase의 29일로 연장되어 10배 증가하였음이 문헌에 보고된 바와 같이, 상기 방안의 장점을 입증하였다 (Kravtsov et al. (1996) European Journal of Clinical Pharmacology 49, 465-470). 따라서, 본원에서 설명된 봉입 방법에 의해 상기 $t_{1/2}$ 이 추가로 2배 증가하는 것이 특히 효과적이다.

[0184] RBC-봉입된 ASNase가 그의 원래의 생물학적 기능을 계속 유지할 수 있는지를 확인하기 위해서, RBC-고스트-ASNase와 RBC-ASNase 모두에 의한 항-종양 효과를 종양 보유 마우스에 대해 조사하였다. L5178Y 마우스 림프종 세포를 배양하고, 각각의 DBA/2 마우스에 7×10^5 암세포를 복강내 주사하였다. 종양 이식 5일 후에, 유사한 체중의 마우스를 선택하고 다음과 같은 3개의 군으로 나누었다: (1) 염수만을 투여한 대조군; (2) ASNase-로딩된 RBC-고스트; 및 (3) LMWP-ASNase-로딩된 RBC. 각각의 군은 5 마리의 마우스로 이루어지고, 각각의 실험 마우스에게 0.1 ml의 약물-봉입된 RBC (또는 고스트)를 투여하였다. 그 결과는 비처리 대조군, ASNase-RBC-고스트-처리군, 및 LMWP-ASNase-RBC-처리군에 대한 평균 생존 시간이 각각 10.0, 12.6, 및 14.4일임을 보여주었다 (예를 들어, 도 22 참조). 단지 마우스의 총 혈액 부피의 5%와 동등한 0.1 ml의 RBC 현탁액만을 항-종양 치료를 위해 각각의 마우스에게 투여한 사실을 고려할 때, 3개의 군 사이의 생존 시간이 단지 약 2일 정도만 상이하지만, RBC-봉입된 ASNase 처리 효과는 여전히 매우 크다는 것을 유의하여야 한다. 전체적으로, ASNase 모델 효소를 사용하여 얻은 상기 발견은 RBC-봉입된 효소가 계속 치료상 활성을 보임을 입증하였다. 코카인은 아스파라기나제 기질보다 RBC 막을 보다 쉽게 투과할 수 있음을 유의해야 한다.

[0185] 따라서, 코카인이 RBC 막을 쉽게 통과하고 (및 실제로 RBC 내에 다소 농축되고) (Javaid et al. (1978) Journal of Chromatography 15, 105-113), PTD-매개된 봉입이 RBC의 물리적 및/또는 화학적 특성을 변경시키지 않고, RBC-봉입된 효소가 유리된 효소처럼 기능하기 때문에, 코카인-관련 병태의 치료시에 RBC-봉입된 CocE를 사용하는 것은 효과적인 방안이다.

[0186] **실시예 13: 내독소 제거**

[0187] CocE 돌연변이체의 내독소 오염은 몇몇 방식으로 수행할 수 있다. 이상적으로는, 내독소 오염 제거는 농도를 10 EU/mg 단백질 미만의 수준으로 감소시킨다. 오염 제거의 방법은 다른 이온-교환 칼럼 크로마토그래피 조건, 크기 배제, 폴리에틸렌이민 (PEI) 및 소수성 칼럼 크로마토그래피, 한외여과 및 세제 추출을 포함한다. 내독소 검출 시스템 (PYROGENT 5000, 캄브렉스 (Cambrex))을 사용하여 제제의 내독소 함량을 결정하였다. 분석은 Limulus 유주세포 용해물 (LAL)로부터의 항-LPS 인자를 기초로 한다. 분석 감도는 0.01 내지 100 EU/ml이었고, 요구되는 수준 내에 해당하였다. 분광광도 분석은 96-웰 미량역가-플레이트 포맷으로 설계되었다. 다음 절차에 의한 내독소 및 CocE 및/또는 돌연변이체 CocE의 분획화는 내독소 수준 및 코카인 에스테라제 활성 모두를 분석할 수 있다. 코카인 에스테라제 활성은 240 nm에서 코카인의 고유한 흡수를 이용하는 분광광도 분석을 사용하여 측정하였다. 가수분해 시에, 흡수 스펙트럼은 240 nm 피크의 극적인 감소를 보였다 (Turner et al.

(2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307).

- [0188] 음이온 교환 크로마토그래피: 현재의 조건은 내독소 오염 제거를 위해 pH 8.0에서 Q-Sepharose 칼럼 상에 고압 액체 크로마토그래피 (FPLC)를 사용하는 것을 수반한다. 버퍼 조건 (pH)은 CocE 및/또는 돌연변이체 CocE의 흡착 및 내독소 분리를 모두 최대화시키기 위해 최적화될 수 있다. 맑은 분획은 CocE 또는 돌연변이체 CocE 활성의 활성 측정 (코카인의 가수분해의 분광 분석, 240 nm에서의 흡수)에 의해 평가하였다. 내독소 수준은 PYROGENT 5000 (상기한 바와 같은)을 사용하여 평가하였다.
- [0189] 크기 배제 크로마토그래피 및 한외여과: 내독소는 버퍼 조건에 따라 단량체 형태 ($MW \sim 1-2 \times 10^4$) 또는 미셀 (micellar) 형태 ($MW \sim 4 \times 10^5$ 내지 1×10^6)로 존재할 수 있다. 콜레이트와 같은 세제의 존재는 모노머 형태에 유리하고, 2가 양이온 (예를 들어 Ca^{2+})은 미셀 형태에 유리하다 (Hirayama, C and Sakata, M (2002) *Journal of Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Science* 781, 419-432). 이러한 내독소의 특성은 Sephadex 75 또는 Sephadex 200 (파마시아 (Pharmacia)) 칼럼 수지를 사용하여 겔 여과 크로마토그래피에 의해 CocE 및/또는 돌연변이체 CocE로부터 미셀을 (즉, 2가 양이온, 예를 들어 Mg^{2+} 또는 Ca^{2+} 의 존재 하에) 분리하기 위해 사용된다. 미셀 내독소는 칼럼 상에 유지되지 않아야 하고, 공극을 통과해야 하는 반면에, CocE 및/또는 돌연변이체 CocE는 65 kDa 단백질에 대응하는 단분산된 단백질로서 용출되어야 한다. 유사하게, CocE 및/또는 돌연변이체 CocE로부터 미셀 형태의 내독소를 분리하기 위한 한외여과 장치의 능력을 평가할 것이다. 한외여과 장치는 현재 3×10^5 내지 1×10^6 의 분자량 컷오프 (cutoff)로 이용가능하고, 이는 미셀 내독소는 유지시키지만 CocE 자체는 유지시키지 않기 위해 필요한 범위 내이다.
- [0190] 폴리에틸렌아민 크로마토그래피: 미즈너 등 및 모리모토 등 ([Mitzner et al. (1993)] 및 [Morimoto et al. (1985)])은 BSA 제제로부터 내독소를 제거하기 위해 각각 셀룰로스 비드 또는 셀룰로스 섬유 상에 고정된 PEI를 이용하였다. PEI-크로마토그래피 칼럼은 내독소의 일부 소수성 특성을 이용하여 이를 우선적으로 흡착할 수 있는 매우 약한 음이온 교환제이다. 비드 크기에 따라 다양한 PEI-실리카 비드 제제가 시그마 (Sigma)로부터 이용가능하다. 실리카-기반 비드가 HPLC 기기와 보다 전통적으로 사용되기 때문에, 본 발명자들은 보다 낮은 압력 실험을 위해 칼럼을 충전하고, 200 μm 메쉬 크기를 선택할 것이다.
- [0191] Triton X-114 추출: Triton X-114 상 분리는 알부민 및 카탈라제로부터 내독소를 분리하기 위해 성공적으로 사용된 바 있다 (Aida, Y and Pabst, MJ (1990) *J Immunological Methods* 132, 191-195). 아이다 (Aida) 및 파브스트 (Pabst)는 단일 Triton X-114 추출 단계 후에 내독소 농도의 1000배 감소를 보고하였다. CocE 및 돌연변이체 CocE 샘플을 등부피의 Triton 114와 함께 인큐베이팅하고, 먼저 빙상에서 인큐베이팅한 후, 37°C에서 15분 동안 인큐베이팅하였다. 내독소를 함유하는 Triton X-114 상은 원심분리에 의해 제거하였다. 상기한 바와 같이, CocE는 상당히 열 불안정성이지만, 기질인 코카인의 존재에 의해 다소 보호될 수 있음이 입증되었다. CocE를 Triton X-114와 함께 37°C에서 인큐베이션할 때 유의한 CocE 불활성화가 발생할 경우, 효소는 추출 동안 과량의 기질을 포함시킴으로써 안정화될 것이다.
- [0192] **실시예 14: CocE 숙주 유기체의 돌연변이 유발**
- [0193] 몇몇 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 균주를 포함하여, 코카인 에스테라제 부산물 상에서 감온성 성장을 보이는 몇몇 세균 균주가 존재하고, 이들 유기체는 적합한 플라스미드 벡터 내에서 코딩되는 CocE 유전자의 첨가에 의해 코카인 상에서의 감온성 성장에 적용될 수 있다. 예를 들어, CocE 유전자는, 유전자 단편을 코카인을 대사시킬 수 없지만 코카인 에스테라제 부산물인 에크고닌 메틸 에스테르 및 벤조에이트 상에서 성장할 수 있는 세균인 로도코커스 에리트르폴리스 CW25 내로 서브클로닝함으로써 로도코커스 MB1로부터 처음으로 서열이 결정되었다 (Bresler et al. (2000) *Applied & Environmental Microbiology* 66, 904-908). CocE 유전자는 서플 벡터 pJAK-14 및 pMMB67EH 내로 서브클로닝되었다 (예를 들어, 실시예 1 참조). 상기 플라스미드는 슈도모나스를 포함하여 임의의 그람-음성 세균에서 발현될 수 있고, 추가로 pMMB67EH 플라스미드는 헬퍼 (helper) 플라스미드 pRK2013을 사용한 세균 컨주게이션에 의한 용이한 형질전환 및 높은 수준의 발현을 허용한다. 코카인 에스테라제 부산물 상에서 감온성 성장을 보이는 세균 (예를 들어, 슈도모나스 균주) 내로의 플라스미드의 형질전환은 코카인을 유일한 탄소원으로 사용하여 함유하는 플레이트 상에서의 감온성 성장을 허용한다. 260 nm의 UV-광 방사선을 사용하여 원래의 로도코커스 MB1 및 CocE 플라스미드-함유 슈도모나스 균주 모두의 돌연변이 유발을 수행하였다. 노출은 90-95%의 세포가 치사되도록 조정하였다. 나머지 세포를 앞서 설명된 바와 같이 1 hr 동안 26°C에서 영양 배지에서 회복시키고, 수거하여 코카인의 존재 하에 농축하였다 (Britt, et al. (1992)

Journal of Bacteriology 174, 2087-2094). 농축은 CocE의 열 안정성 변이체를 선택하기 위해서 37°C에서 수행하였다. 마지막으로, 세포를 10 mM 코카인을 함유하는 최소 배지 아가 플레이트 상에 플레이트팅하고, 37°C에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 성장시키고, 37°C에서의 CocE 활성을 시험하였다. 37°C에서 활성인 가용성 CocE를 생산하는 것으로 밝혀진 돌연변이체에 대해 CocE 유전자의 PCR 증폭을 수행하고, 추가의 특성 분석을 위해 증폭 산물을 pET-22B(+) 플라스미드 내로 서브클로닝하였다. CocE 돌연변이 유발에 대한 준비로서, 코카인 가수분해 산물 상에서 성장할 때 37°C에서의 비감온성에 대해 예비선택하기 위해 천연 슈도모나스 균주를 돌연변이시킨 후, CocE에 클로닝한 후 37°C에서 코카인에 대해 감온성을 입증하는 것이 필요할 수 있다.

[0194] 실시예 15: 열 안정성 CocE 돌연변이체의 확인을 위한 고속 스크리닝 방법

[0195] 열 안정성 CocE 변이체의 확인을 위한 몇몇 고속 스크리닝 방법을 실시하였다. 야생형 효소는 30°C를 넘는 온도에서 열-불안정성인 것으로 알려져 있으므로, 이. 콜라이 BL21 세포 내로 형질전환한 후, 콜로니를 계대배양하고, 단백질 발현을 16°C에서 유도하였다. 이어서, 발현된 단백질을 온도 30°C 이상에서 에스테라제 활성에 대해 시험하였다. 수 라운드의 돌연변이 유발 및 증가하는 온도에서의 시험 후에, 열 안정성 돌연변이체를 얻었다. 이어서, 각각의 개별적인 돌연변이체 CocE를 제조하고, 정제하고, 상기한 바와 같이 37°C에서의 활성 및 열 안정성에 대해 시험하였다 (실시예 1 및 4 참조).

[0196] 돌연변이체 폴리펩티드를 함유하는 세균 콜로니를 복제 (replica) 플레이트의 니트로셀룰로스 필터 임프린트 (imprint), 이어서 세균 용해 및 단백질 고정에 의해 아가 플레이트로부터 직접 스크리닝하였다. 다양한 온도에서의 효소 활성의 결정은 (-)코카인의 산성 부산물인 벤조산의 축적을 모니터링함으로써 달성된다. 습기있는 니트로셀룰로스 임프린트를, 버퍼가 존재하지 않고 산성화 시에 무색으로부터 유색으로 변하는 pH 인디케이터, 예를 들어 메틸 레드와 코카인의 혼합물 (pH 7.4)로 사전에 포화시킨 건조된 필터지 상에 배치하였다. 활성 효소는 색상 변화에 의해 확인하고, 콜로니를 적절하게 수거하였다. CocE에 의해 절단되는 동일한 부위인 벤조일 에스테르기에서 코카인을 가수분해하는 촉매 항체의 세포 발현을 검출하기 위해, 벤조산 형성에 의한 산성화를 기초로 한 검출 방법을 사용하였다. 별법으로, 니트로셀룰로스 임프린트에 의한 검출은 코카인 티올-유도체에 대한 노출 및 침전 중금속 (예를 들어, 수은계) 인디케이터 시스템을 통한 술폰히드릴기의 후속적인 검출에 의해 달성된다.

[0197] 돌연변이체 폴리펩티드를 함유하는 세균 콜로니는 또한 액체 배지 내로 계대배양하고 코카인 티올-유도체 및 비색 티올 인디케이터인 엘만 시약을 사용하는 검출을 사용하여 코카인 에스테라제 활성에 대해 직접 시험함으로써 스크리닝하였다 (예를 들어, 도 6 참조). 엘만 시약은 유리 티올기와 신속하게 디술피드 결합을 형성하고, 412 nm에서 흡광하는 착색된 티올레이트 이온을 방출한다. 배양액을 16°C에서 IPTG의 존재 하에 밤새 인큐베이션하여 단백질 발현을 유도하고 (20 μ l), 1 mM 벤조일티오에스테르 코카인 유도체, 및 100 mM 인산나트륨 (pH 7.4) 중의 500 μ M 엘만 시약과 최종 부피 200 μ l로 혼합하였다. 그 결과 (예를 들어, 도 6 참조)는 야생형 CocE 효소를 함유하는 세포가 세포 단독의 경우보다 훨씬 더 높은 수준에서 벤조일티오에스테르를 절단할 수 있음을 나타낸다.

[0198] 마지막으로, 액체 배지 내로 계대배양한 후, 친화도 배지를 사용한 돌연변이체 폴리펩티드의 용해 및 단리에 의해 돌연변이체 폴리펩티드를 함유하는 세균 콜로니를 스크리닝하였다. 예를 들어, 용해된 세포를 6xHIS 태깅된 (tagged) 단백질의 수거 및 후속적인 용출을 허용하는 니켈-아가로스 필터-플레이트를 통해 세척하였다 (예를 들어, Ni-NTA Superflow 96-Bio-로봇 (robot) 키트 (퀴아젠 (Qiagen))). 별법으로, 세포를 6xHIS 융합 단백질의 결합 및 오염물의 후속적인 제거를 허용하는 니켈-코팅된 미량역가 플레이트 내에서 용해시킨다 (예를 들어, 고정기 (immobilizer) 니켈 킬레이트 플레이트 (닝크 (Nunc)) 또는 NEN 니켈-킬레이트 플래시 플레이트 (퍼킨 엘머 (Perkin Elmer))). 유사하게, 용해된 세포를 니켈 코팅된 마이크로비드 (예를 들어, Ni-NTA 자성 아가로스 비드 (퀴아젠))와 함께 인큐베이션한 후, 오염 단백질을 제거하였다. 이어서, 단리된 에스테라제 단백질을 앞서 언급된 임의의 분석, 예를 들어, 분광광도 활성 분석 (실시예 1 및 4), 삼중수소화 코카인 활성 분석 (실시예 1), 벤조산 pH 표시 활성 분석, 티올-유도체 코카인 검출 시스템, 코카인 분해 시에 형광 변화의 모니터링에 의한 코카인 앵타머의 사용 ([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]), 또는 일반적인 에스테라제 기질, 예를 들어 4-니트로페닐 아세테이트의 사용 및 앞서 설명된 바와 같이 420 nm에서의 비색 변화의 모니터링 ([Halgasova, N. et al. (1994) Biochem J 298 Pt 3, 751-5]; [O'Conner, C.J. & Manuel, R.D. (1993) J Dairy Sci. 76:3674-3682])에 의해 시험하였다.

[0199] 실시예 16: N197K 돌연변이체 폴리펩티드의 예비 분석

[0200]

N197K 돌연변이체 폴리펩티드 (서열 42)의 예비 분석에서는 제0일에 37°C에서 1시간 후 우수한 안정성을 보여주었다. Vmax 및 Km 값을 표 5에 나타낸다. 제3일에 재검토에서는 유사한 안정성을 보여주었다. Vmax 및 Km 값을 표 6에 나타낸다. 제3일에 보다 높은 Km 값은 원래의 코카인의 재사용으로 인한 것이었다. 37°C에서 인큐베이션된 샘플의 겔 여과에서는 응집물의 형성을 보여주었다.

표 5

[0201]

N197K 초기 시험 (제0일)

	N197K (0)	N197K (60)
식 1		
최적 피트 값		
VMAX	2928	2187
KM	34.77	24.24

표 6

[0202]

N197K 반복 시험 (제3일)

	N197K (0)	N197K (60)
식 1		
최적 피트 값		
VMAX	3357	3085
KM	102.2	113.5

[0203]

실시예 17: 열 안정성 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 확인

[0204]

열 안정성 돌연변이체 CocE 폴리펩티드는 돌연변이체 CocE 폴리펩티드의 $\tau_{1/2}$ 를 결정함으로써 확인하였다. 간단히 설명하면, 효소를 37°C에서 다양한 시간 동안 예비인큐베이션하였다. 활성 측정치는 RT (25°C)에서 결정하였다. $\tau_{1/2}$ 이 12분 (야생형 CocE의 $\tau_{1/2}$)보다 더 큰 돌연변이체 효소를 열 안정성인 것으로 간주하였다 (예를 들어, 도 27과 표 7 참조). 조합 돌연변이체 CocE 폴리펩티드 T172R/G173Q에 의해 입증되는 바와 같이, 다양한 실시태양에서, 안정성이 보다 낮거나 없는 2개의 단일 돌연변이의 조합은 열 안정성 조합을 생성시킬 수 있다.

표 7

열 안정성 돌연변이체 CocE 폴리펩티드

돌연변이체	37°C에서의 안정성 (t _{1/2})
T122A	없음
Q123E	없음
S159A	없음
S140A	없음
S167A/W52L	없음
T172R	~46 min
V121D	없음
L163V	없음
F189A	없음
F189A/T172R	~40 min (T172R과 유사함)
C107S	없음
W220A	없음
F189L	없음
A193D	없음
T172R/A193D	~40 min (T172R과 유사함)
G173Q	~25 min
T254R	없음
N42V	없음
T172R/G173Q	~326 min
G171Q/T172R/G173Q	없음
G171A	없음
G173A	없음
wt-I175-G-D185	없음
wt-T176-G-G-D185	없음
T172R/G173Q-I175-G-D185	
T172R/G173Q-I175-G-G-A186	~75 min
T172R/G173Q-T176-G-G-D185	~75 min
S177Q	없음
D45R	없음
F47R	없음
L169K	~274 min
L174R	없음
A181K	없음
S179R	없음
F189K	25 min
V190K	없음
A194K	없음
R182K	없음

[0205]

[0206] 실시예 18: 열 안정성 코카인 에스테라제 돌연변이체의 응집의 보호

[0207] 열 안정성 CocE 돌연변이체의 응집으로부터의 보호는 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 평가하였다. 간단히 설명하면, 효소를 37°C에서 0분 또는 60분 동안 예비인큐베이션하고, 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분리하였다. 야생형 CocE, T172R 및 T172R/G173Q에 대한 결과는 도 28에 도시한다.

[0208] 실시예 19: 저-UV 스펙트럼

[0209] 5-세포 홀더 (holder) 및 0.2 mg/ml 단백질 농도를 이용하여 노르마 그린필드 (Norma Greenfield, UMDNJ)의 도움으로 Aviv 분광편광계 Mode 400을 사용하여 저-UV CD 스펙트럼 데이터를 얻었다. 얻어진 원 데이터 값을 대조군 PBS에 대해 블랭킹 (blanking)하고, 평탄화하고, 문헌 [A. Perczel, K. Park, and 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)]에 기재된 바와 같은 CCA 알고리즘을 사용하여 디컨벌루션시켰다. 상기 알고리즘은 데이터 세트를 재구성하고, 각각의 곡선이 데이터 세트에 기여하는 백분율을 온도의 함수로서 표현하기 위해 요구되는 최소수의 곡선을 찾는다.

[0210] 5-세포 홀더를 사용하여 단일 CD 스펙트럼 용융에서 얻은 CocE WT 및 4개의 돌연변이체의 저 UV CCA 디컨벌루션

분석을 아래에 제시한다. 실험은 8시간에 걸쳐 0-80℃에서 수행하였다.

[0211]

온도 의존 용융이 시험된 파장 (200-250 nm)에서 관찰되었고, 각각의 돌연변이체에 대한 평탄화된 스펙트럼을 도 29에 도시한다. CCA 알고리즘을 통한 디컨벌루션은 각각의 스펙트럼이 도 30에 도시된 바와 같은 3개의 곡선의 세트에 의해 가장 잘 설명됨을 나타내었다. 이는 CocE의 용융이 원래의 곡선 (곡선 1)에서 중간 언폴딩 단계 (곡선 2)으로, 마지막으로 완전 변성된 단백질 (곡선 3)로 이동하는 적어도 2 단계 과정을 제안한다. 각각의 온도가 상기 3개의 곡선을 설명하는데 역할을 하는 기여 %를 도 31에 도시한다. 용량 반응 분석을 사용하여 초기 스펙트럼 용융 (1), 중간 상태의 형성 및 용융 (2), 및 완전 용융된 단백질의 축적 (3)의 온도를 대략적으로 추정하였다. 상기 수를 모으고, 도 32에 플로팅하고, 표 8에 제시한다.

표 8

각각의 단계의 용점

WT	#1 용융	#2 형성	#2 용융	#3 형성
WT	37.04	34.57	50.98	59.86
T172R	39.22	38.11	54.56	56.85
T172R-A193D	38.11	46.47	47.68	58.72
T172R-F189K	38.8	46.81	48.42	57.23
T172R-G173Q	40.62	45.61	46.17	56.61

[0212]

*열 안정성이 가장 높은 돌연변이체 T172R-G173Q (다른 분석에서 결정될 때)는 원래 곡선 1의 최고 온도 용융 (야생형에 대해 40℃ 대 37℃), 및 곡선 2 중간체의 소멸 (야생형에 대해 46℃ 대 50℃) 및 완전 용융된 곡선 3의 출현 (야생형에 대해 56℃ 대 59℃) 모두에 대해 최저 온도를 보였다.

[0213]

요약하면, 모든 돌연변이체는 2-단계 용융 과정을 겪는 것으로 보인다.

[0214]

실시예 20: 산물 및 억제제를 사용한 안정화

[0215]

코카인 에스테라제 (CocE)는 코카인을 절단하여 벤조산 및 에코고닌 메틸 에스테르를 생산한다. 간단히 설명하면, 코카인의 다른 기질 및 억제제와 효소를 열안정화할 수 있는 화합물은 일반적으로 반응성 에스테르 결합에서 아미드 및 티올 유사체를 치환하거나, 결합을 제거하고(하거나) (억제제에 대해), 벤조산 이탈기 대신에 벤조일 유사체를 치환하고(하거나) 분자의 에코고닌 부분 상의 메틸-에스테르기를 제거 또는 대체함으로써 조사되었다. 아래 논의한 바와 같이, 일부 기질, 산물 및 억제제는 야생형 CocE의 열 변성을 안정화시킬 뿐만 아니라 겔 전기영동에서 열-유도된 응집을 방지한 것으로 결정되었다.

[0217]

코카인은 코카인 에스테라제 (CocE)의 천연 기질이다. 코카인 절단을 240 nm에서 흡광도 강하에 의해 모니터링하였다. 코카인 (mM 범위)은 고분자량 CocE 응집물 (0.1 mg/ml 효소 농도)의 37℃-유도된 형성을 방지하였다 (예를 들어, 도 33 참조). 코카인 (μM 양)은 37℃-유도된 활성 손실을 안정화시켰지만 (예를 들어, 도 34 참조), 상기 안정화 기전은 보다 고 농도에서의 기질 억제에 의해 복잡하다.

[0218]

벤조산은 CocE의 천연 산물이고, 4-니트로페닐 아세테이트에 대한 CocE 절단의 약한 억제제(Ki 310 μM)이다. 벤조산은 고분자량 CocE 응집물 (0.1 mg/ml 효소 농도)의 37℃-유도된 형성을 방지하였다 (예를 들어, 도 35 참조). 벤조산 (μM 양)은 37℃-유도된 활성 손실을 안정화시켰지만 (예를 들어, 도 36 참조), 상기 안정화 기전은 보다 고 농도에서의 기질 억제에 의해 복잡하다.

[0219]

CocE는 4-니트로페닐 아세테이트 (4NPA)의 4-니트로페놀 (4NP) 및 아세테이트로의 절단을 촉매한다. 절단 반응은 400 nm에서 산물 형성의 관찰에 의해 모니터링하였다. 4NP 및 4NPA (mM 범위)는 둘 모두 고분자량 CocE 응집물 (0.1 mg/ml 효소 농도)의 37℃-유도된 형성을 방지하였다.

[0220]

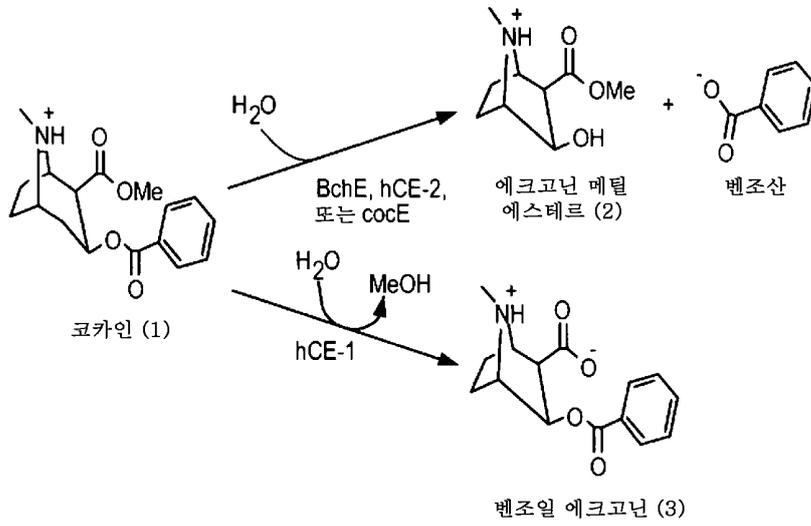
페닐보론산은 CocE의 강력한 억제제(Ki 250 nM)이다. 페닐보론산은 농도 계측 분석에 의해 CocE의 37℃-유도된 응집을 0.2 μM의 EC50으로 안정화시켰다.

[0221]

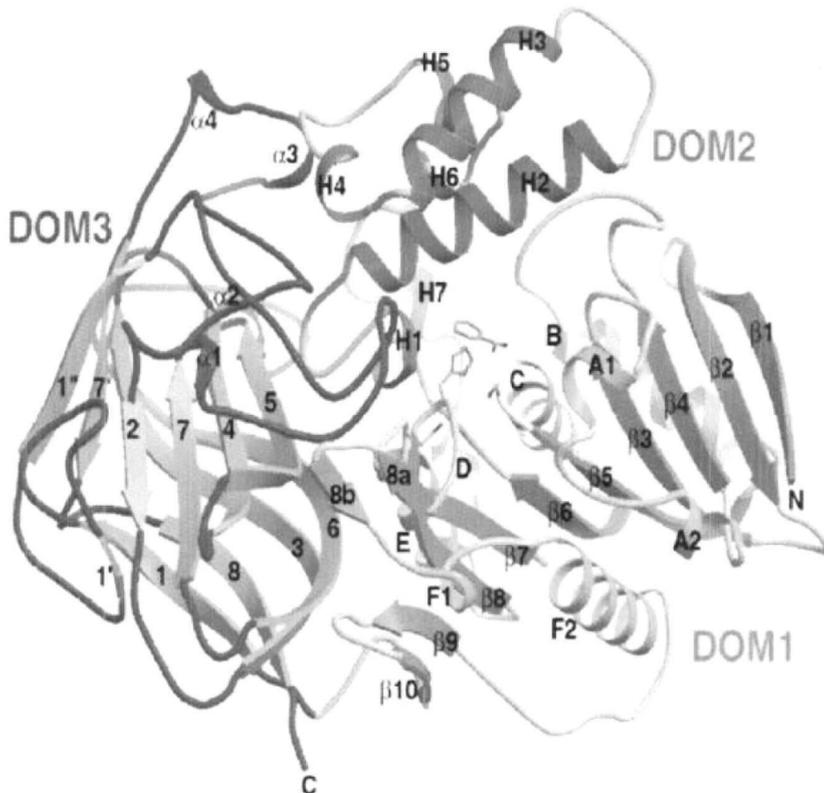
상기한 내용을 이용하여, 유사하게 효소를 안정화시키지만 반드시 활성 부위에 존재하지는 않는 소분자를 스크리닝하기 위한 스크리닝 분석을 개발하였다. 안정화 분자로서 확인된 분자는 사용을 위해 준비할 때까지 본원에 개시된 단백질을 안정화시키기 위해 사용된다.

도면

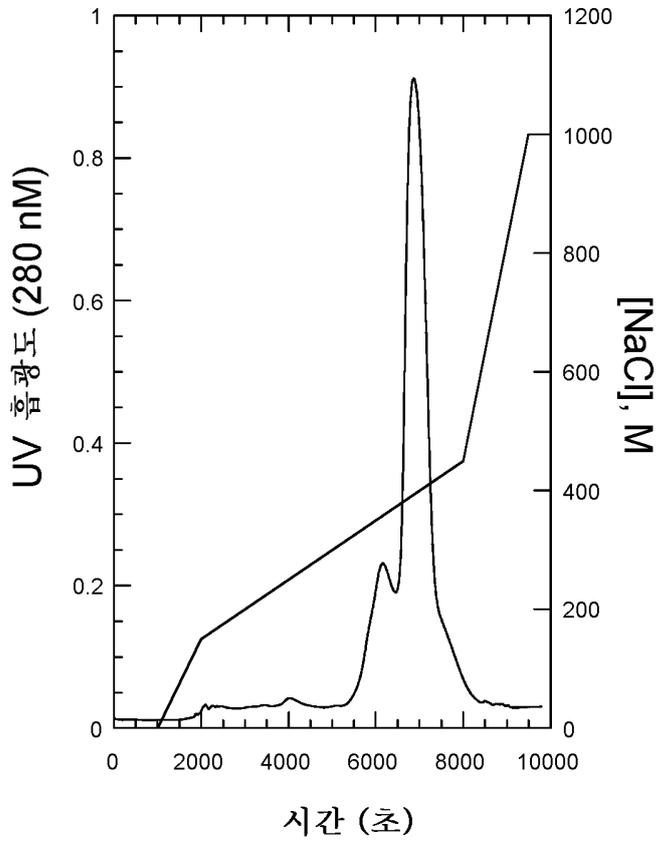
도면1



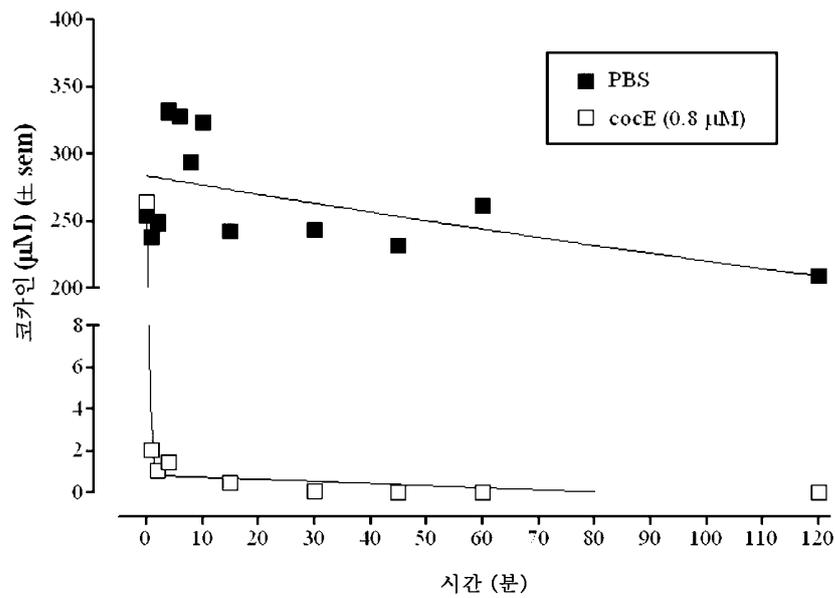
도면2



도면3



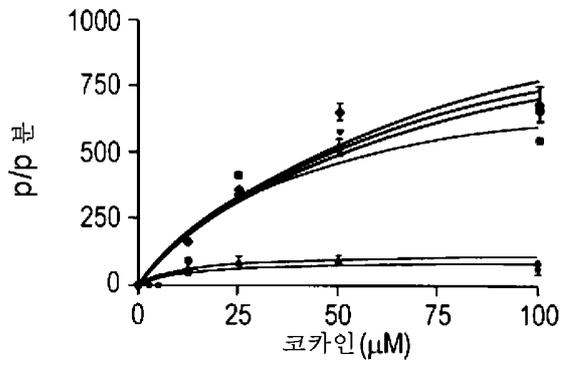
도면4



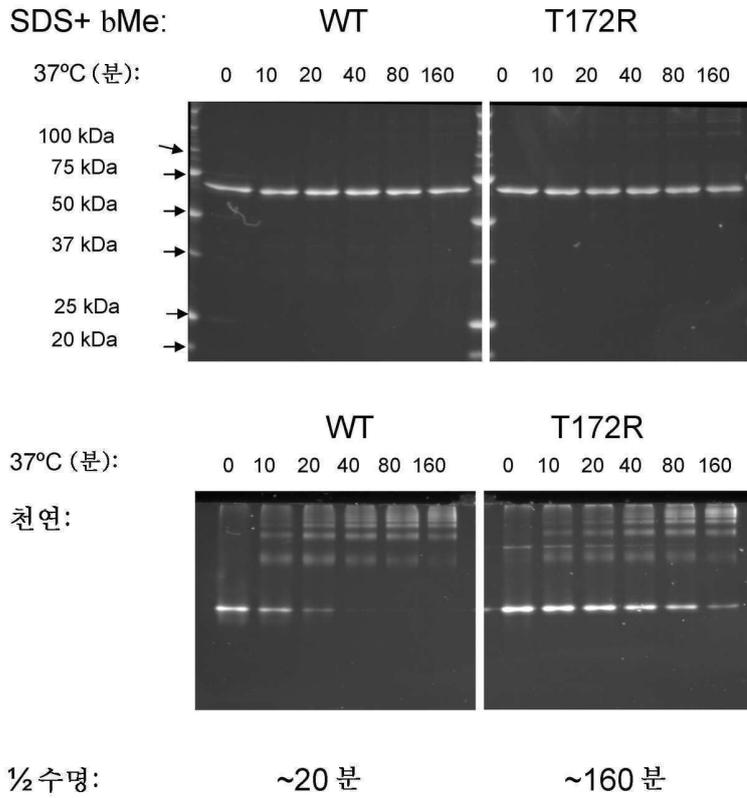
도면5

- T172R
- S159A
- T172R(37℃에서 40분)
- wt CocE
- S159A(37℃에서 40분)
- wtCocE(37℃에서 40분)

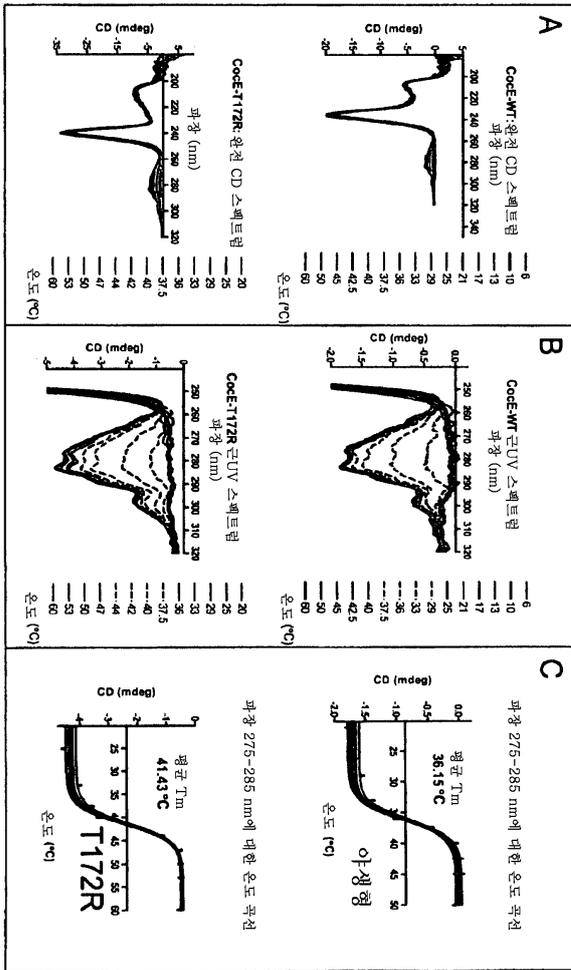
돌연변이체 S159A & T172R의 반복(3-6-06)



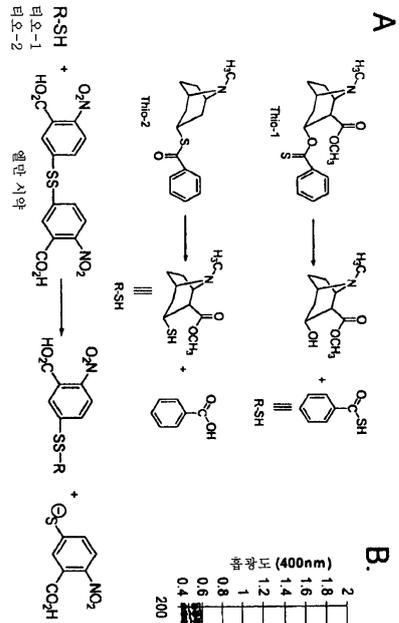
도면6



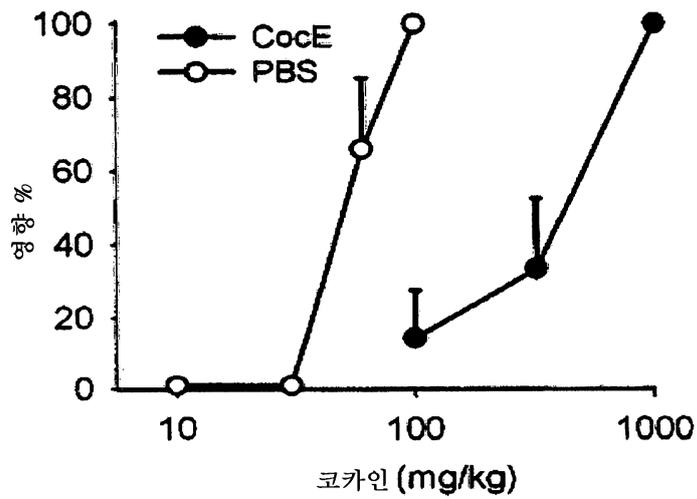
도면7



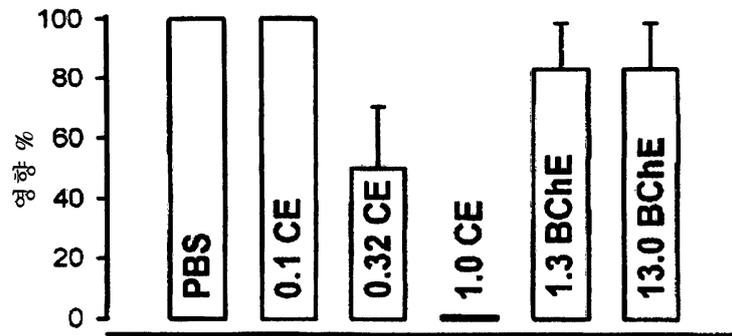
도면8



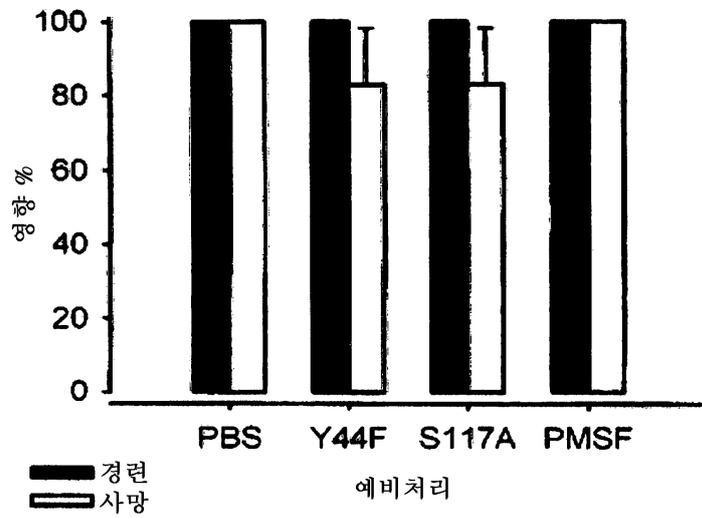
도면9



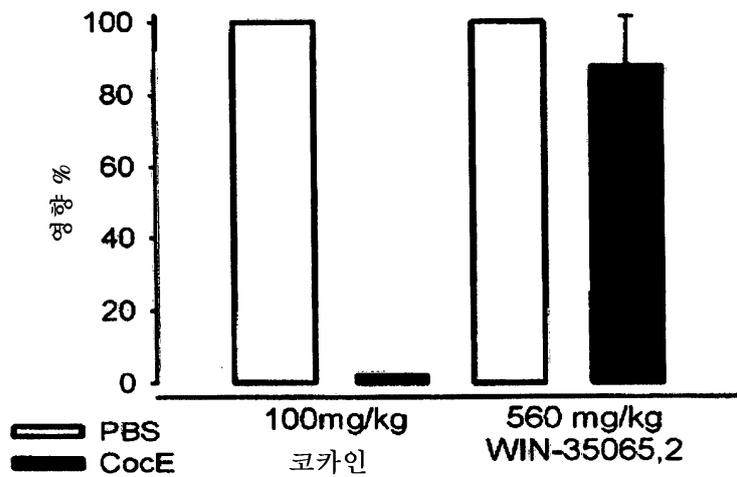
도면10



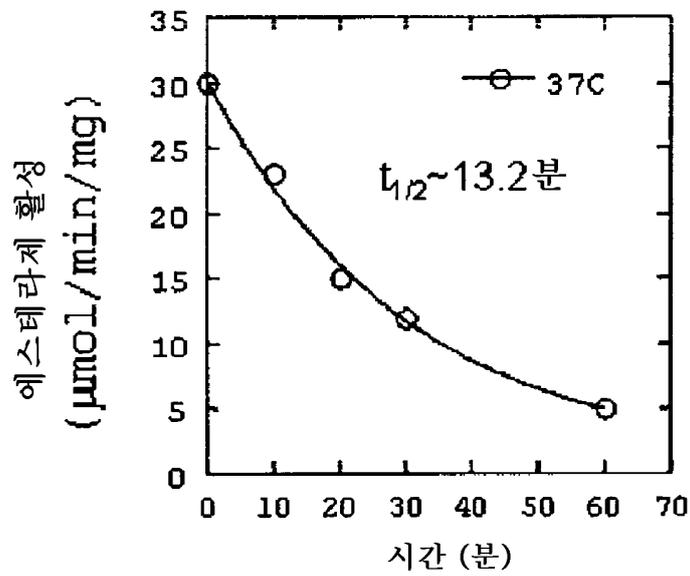
도면11



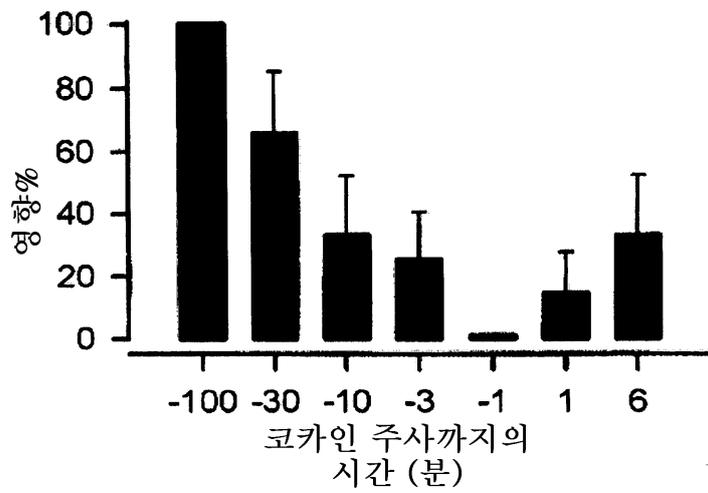
도면12



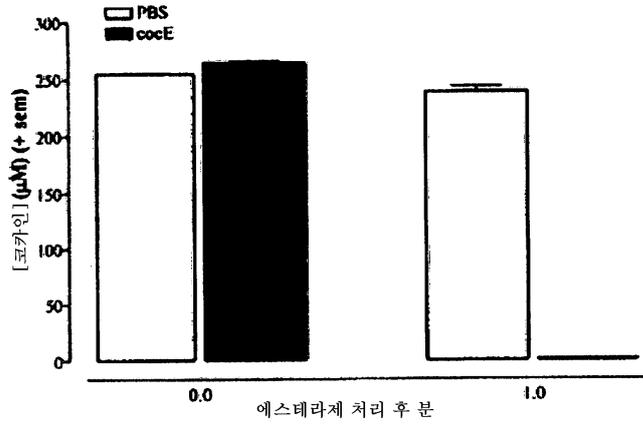
도면13



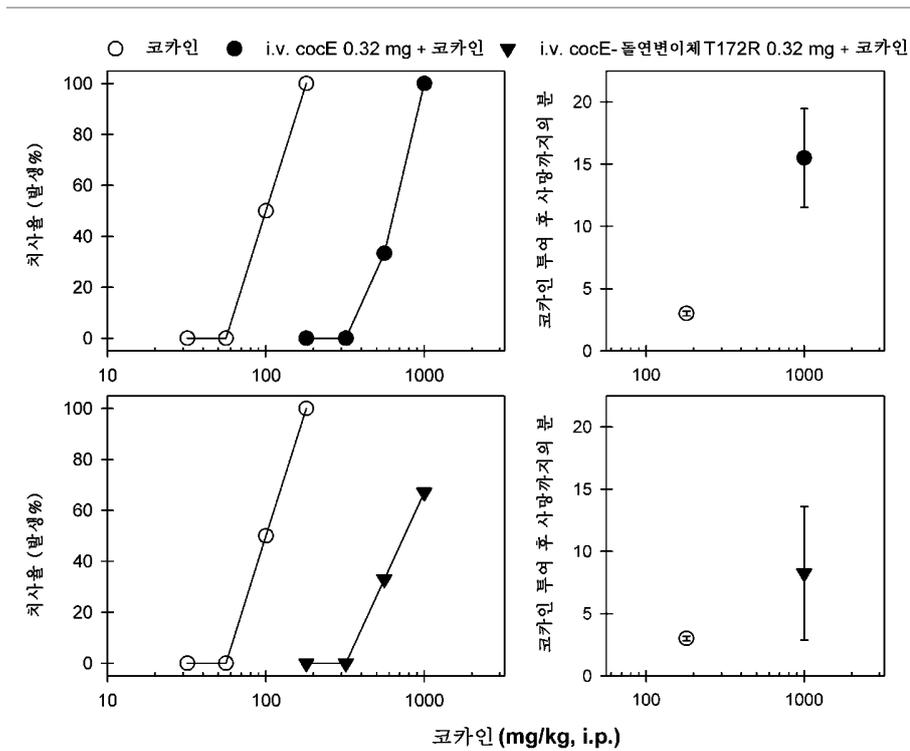
도면14



도면15

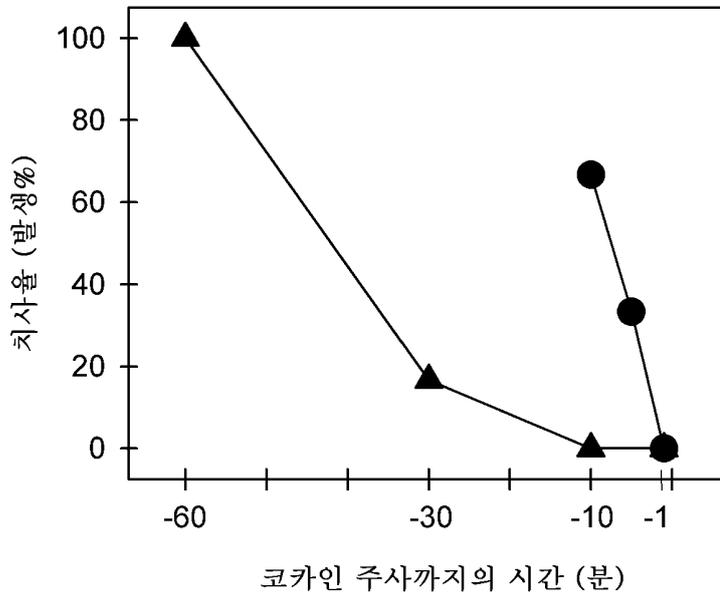


도면16

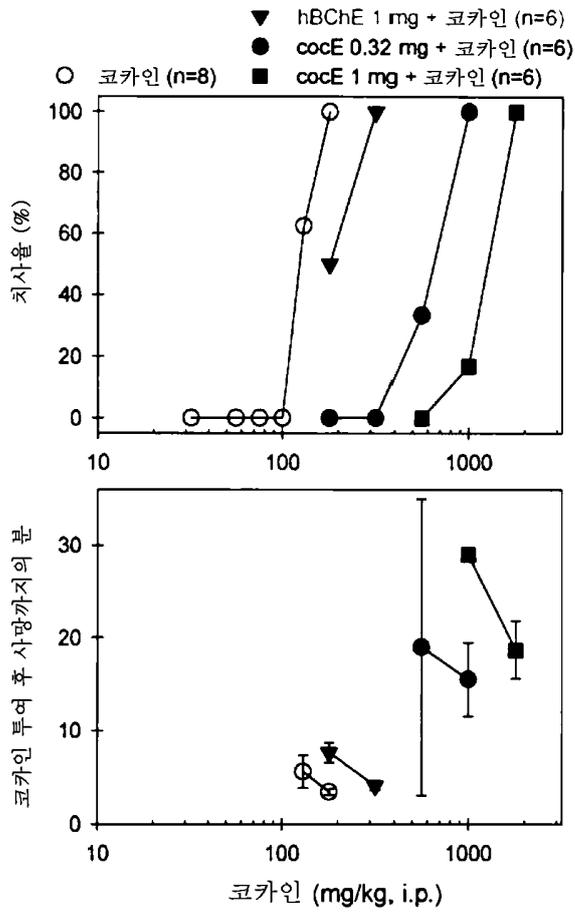


도면17

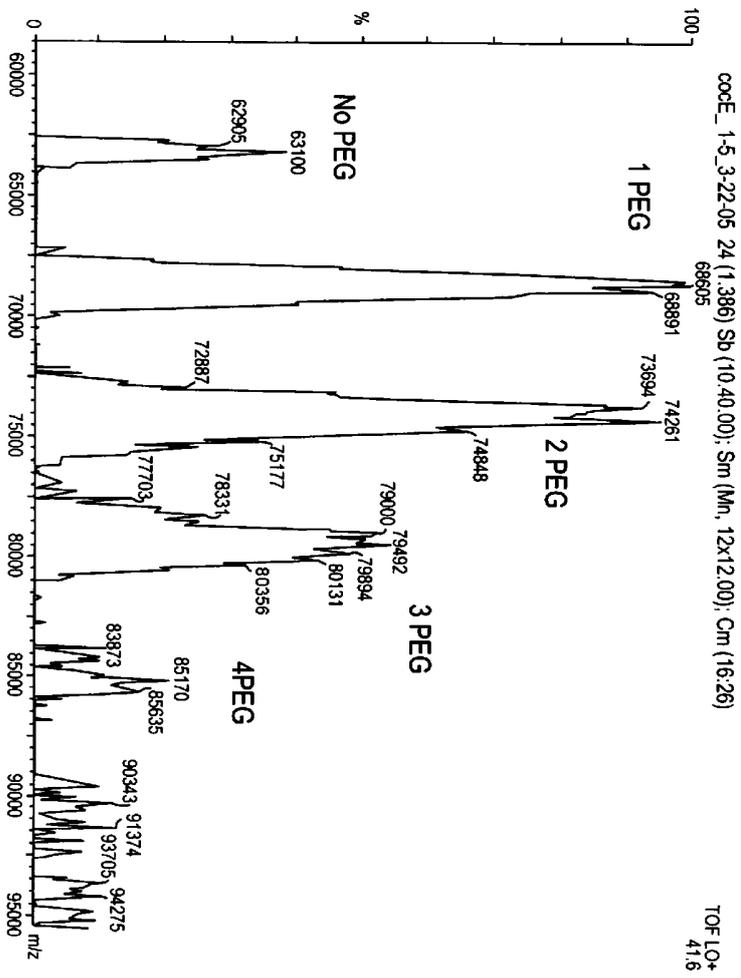
- iv cocE 0.32 mg + ip 코카인 320 mg/kg (n=6)
- ▲ iv T172R 0.32 mg + ip 코카인 320 mg/kg (n=6)



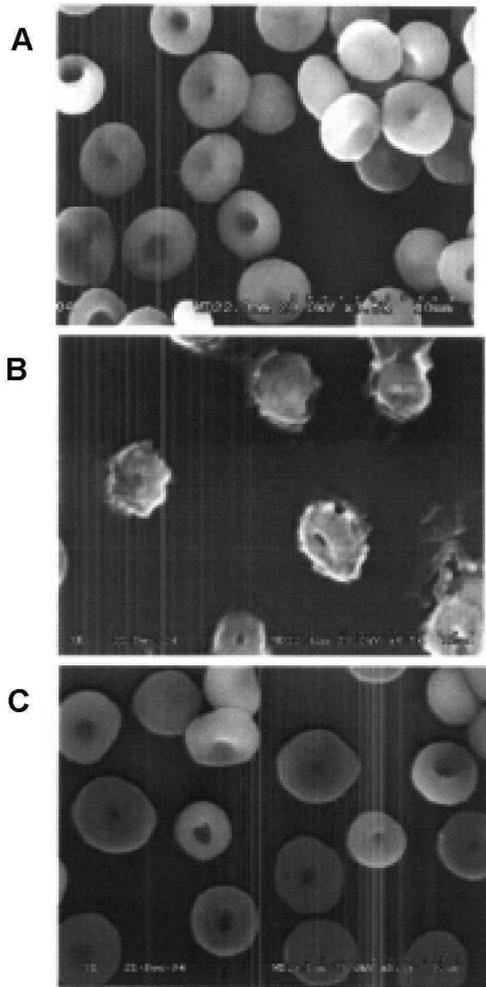
도면18



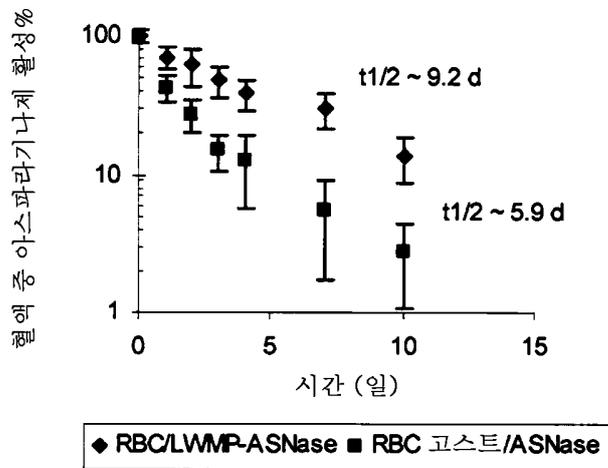
도면19



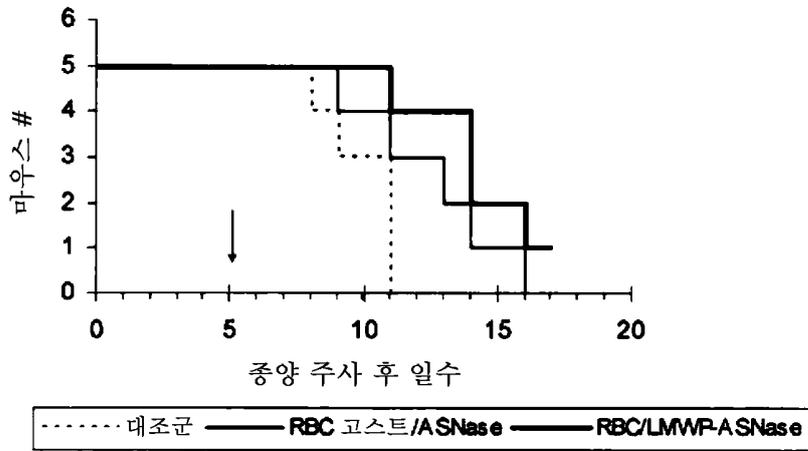
도면20



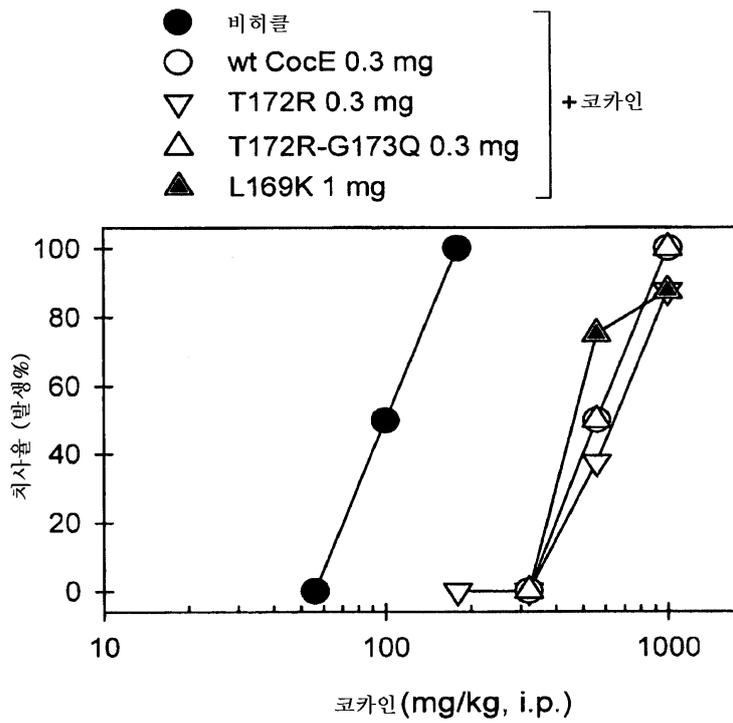
도면21



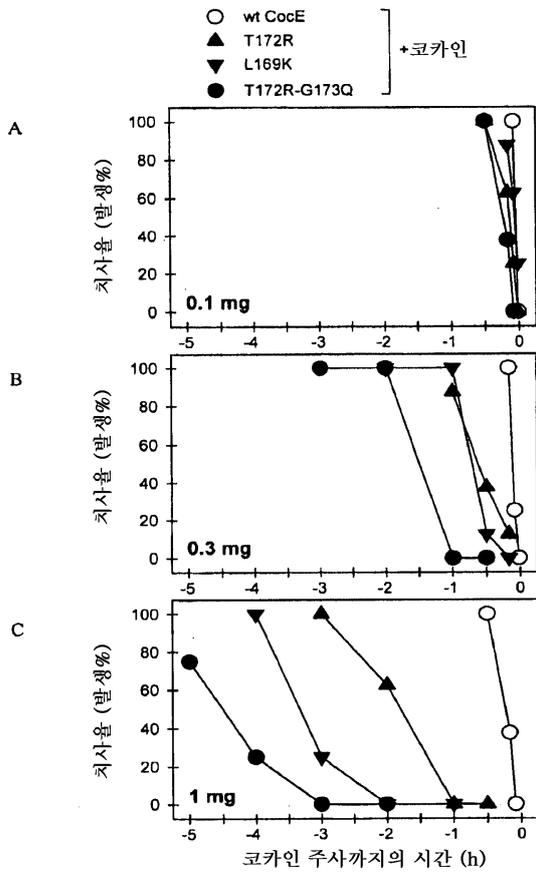
도면22



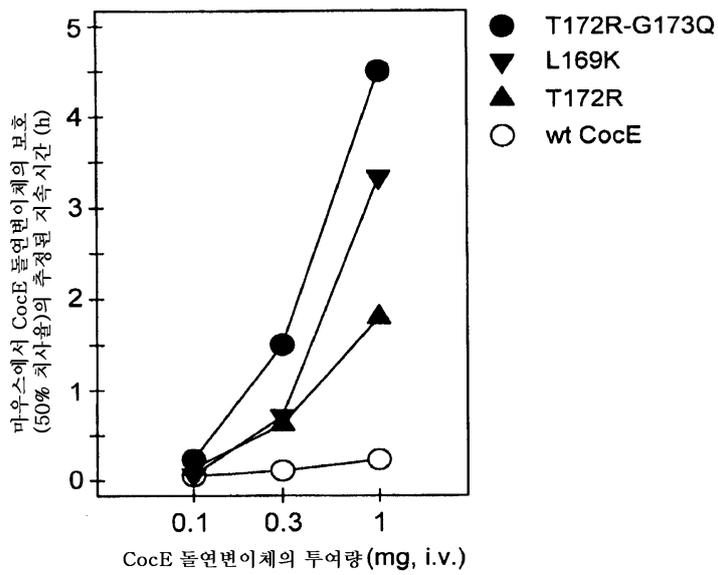
도면23



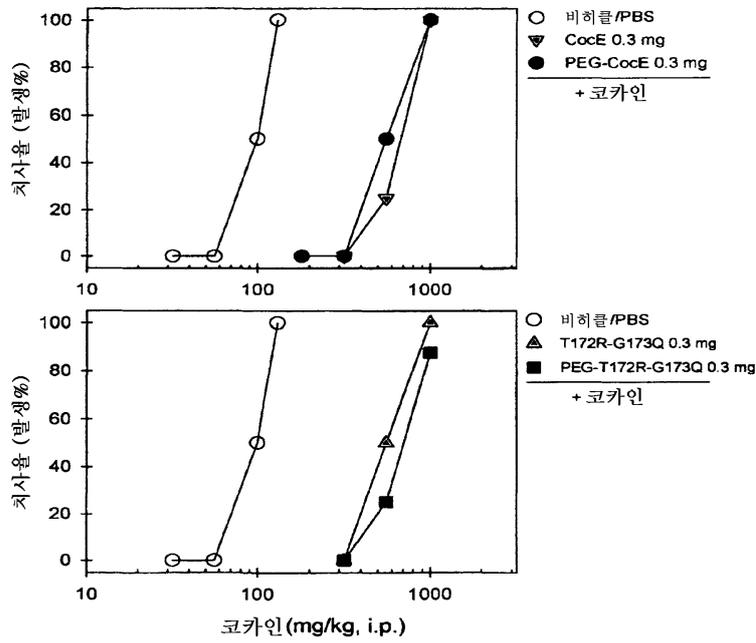
도면24



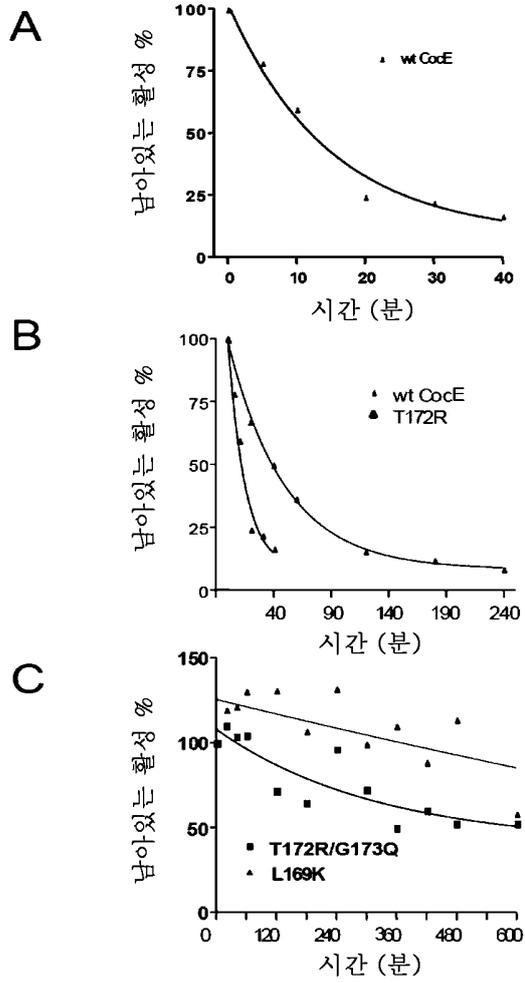
도면25



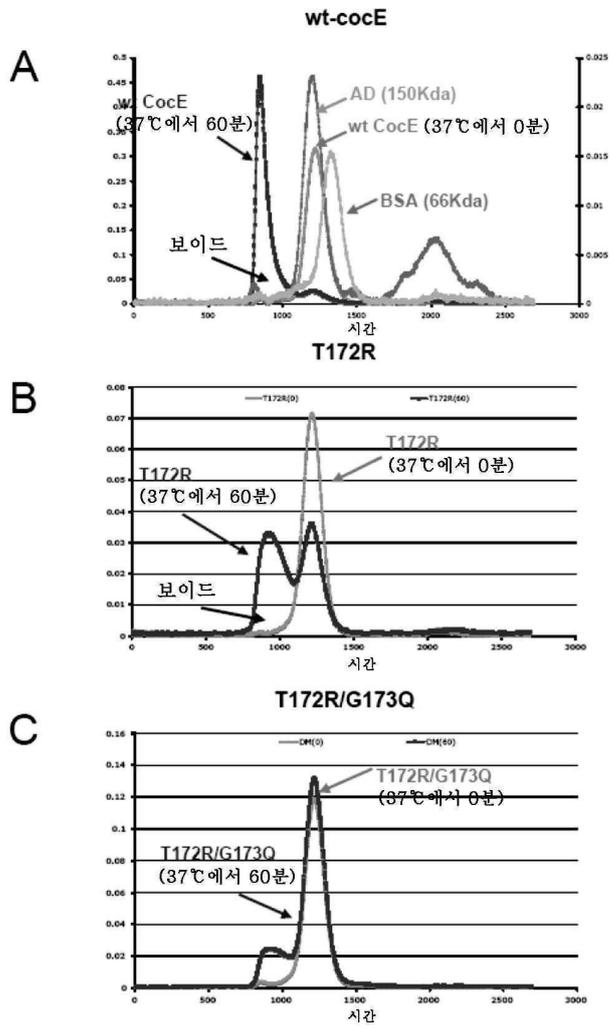
도면26



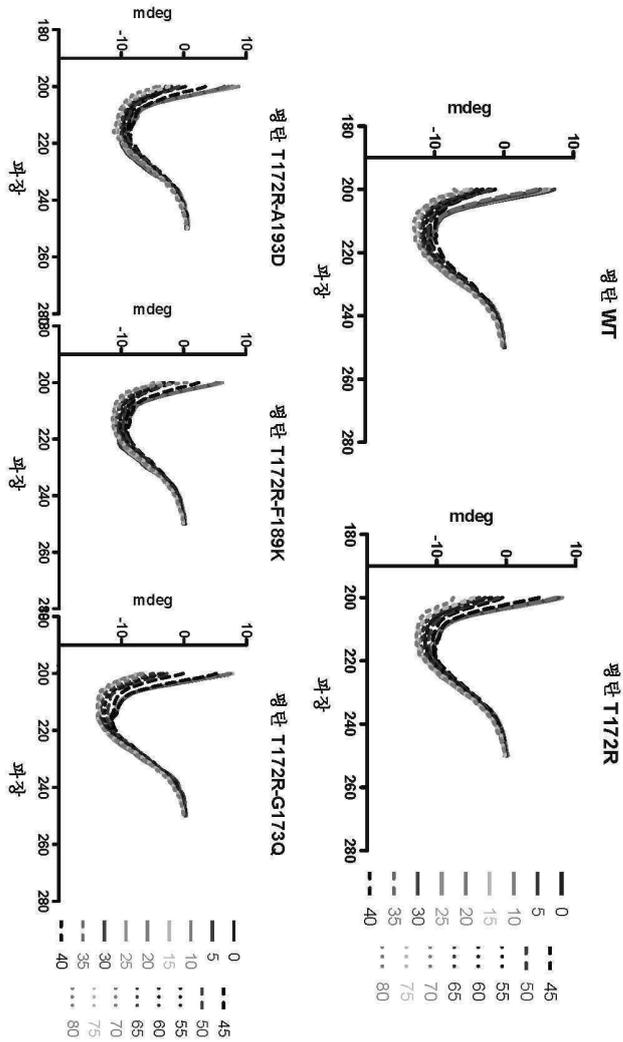
도면27



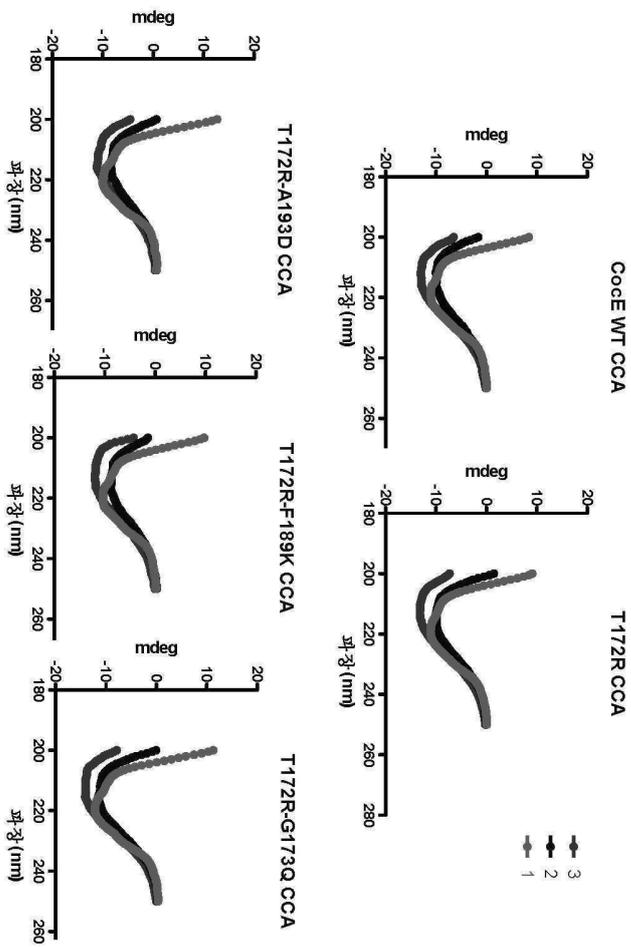
도면28



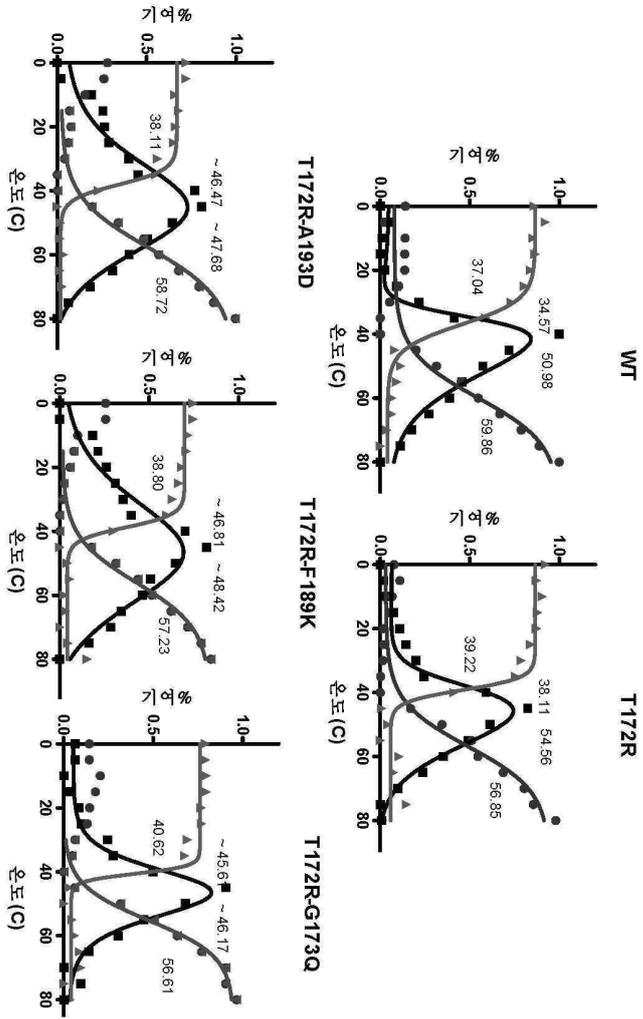
도면29



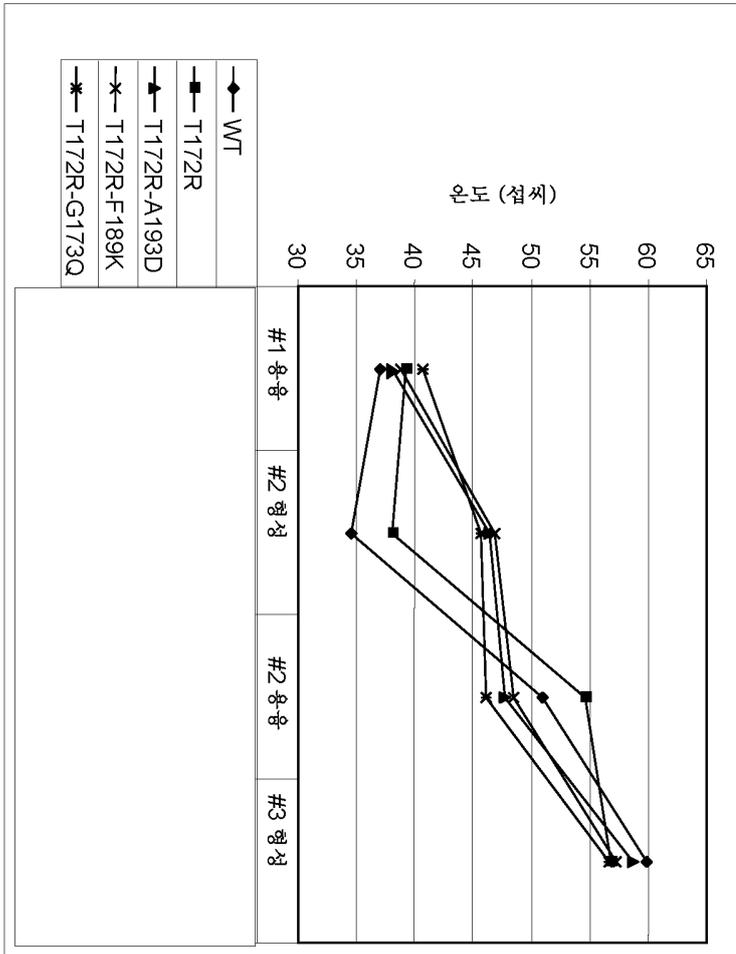
도면30



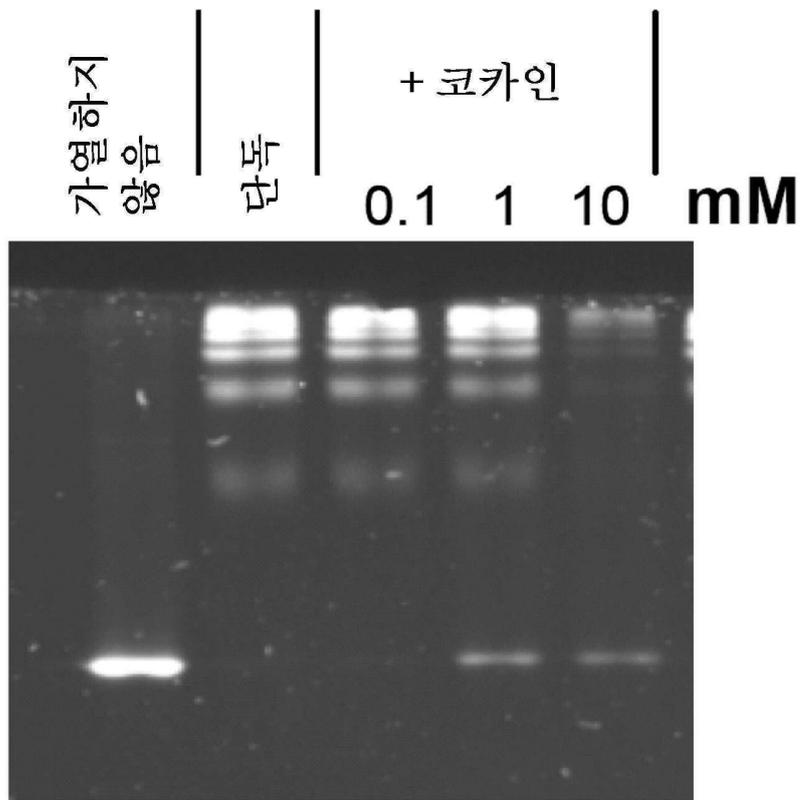
도면31



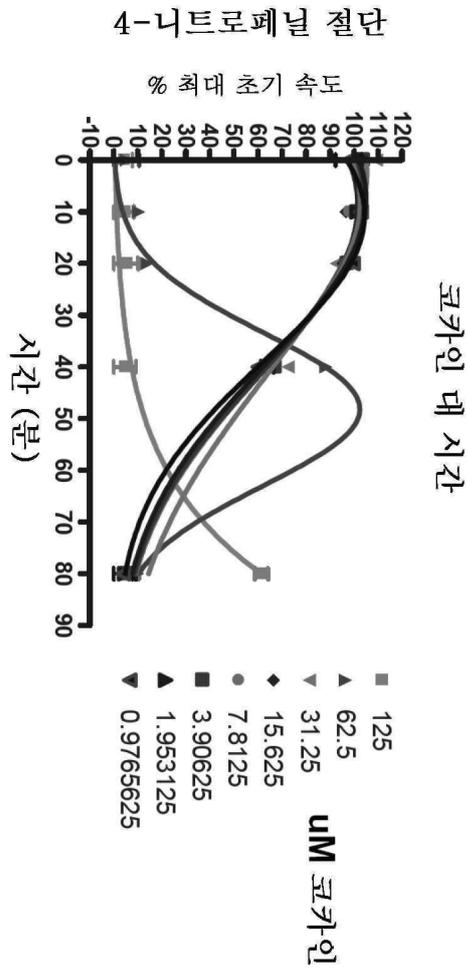
도면32



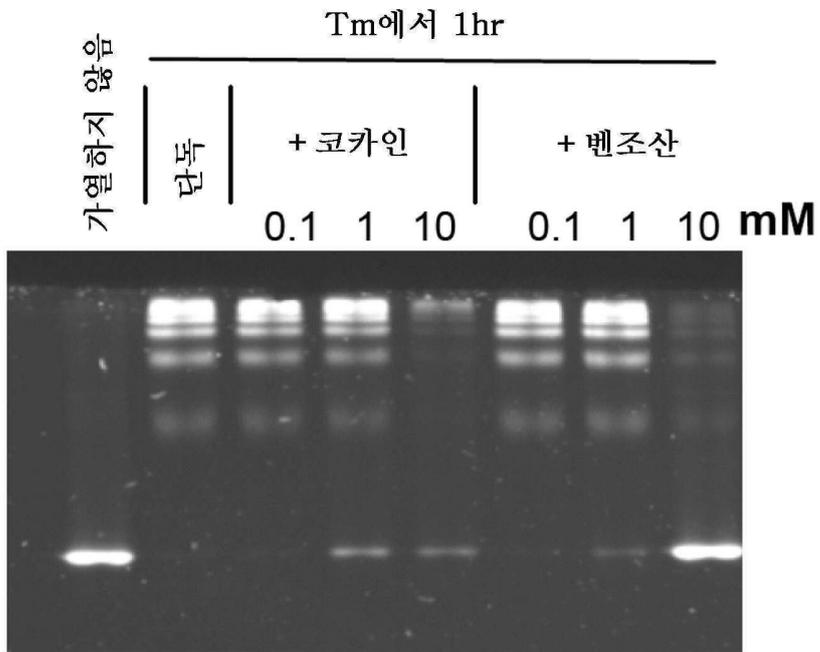
도면33



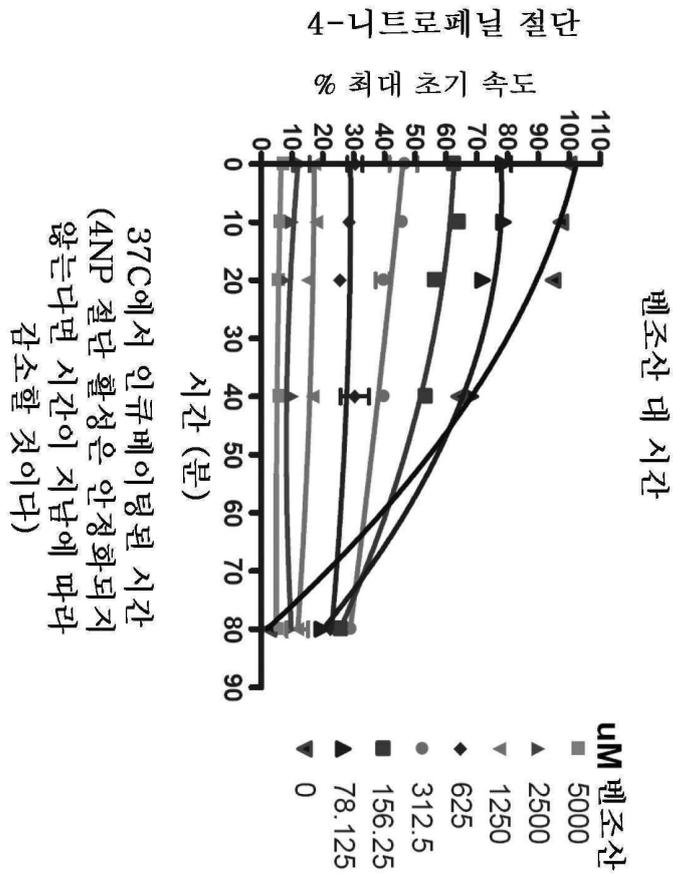
도면34



도면35



도면36



서열목록

SEQUENCE LISTING

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

<120> ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND TREATMENT

<130> 88800730-0003

<140> PCTUS0715762
 <141> 2007-08-03
 <150> 60/819,569
 <151> 2006-07-10
 <160> 47
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 574
 <212> PRT

<213> Rhodococcus sp. MB1

<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 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	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> 2

<211> 2692

<212> DNA

<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 ttcgcgtggt 180
 cgacgcagtc gacaaactgg cttgagtctg tgcgtgatgg ctatgccgtg gtcattcaag 240
 acacgcgtgg cttgttcgca tcggaaggtg agttcgtccc gcacgttgac gacgaagctg 300
 acgccgagga tacgttgagc tggattctgg aacaagcgtg gtgcgacggc aatgtgggca 360

tgttcggcgt ttcgtacttg ggtgtgacct agtggcaggc cgccgtatcc ggcgttggtg 420
 ggctgaaggc gatcgcgccg tccatggcgt cggcggactt gtaccgccc ccgtggtacg 480
 gccctgggtg tgcctttca gtcgaggcgc tgttgggctg gtcagctctc ataggtactg 540
 ggctcatcac gtcgaggctt gacccccggc ccgaagacgc agccgacttc gtccaactcg 600
 cagcaattct caatgacgtc gctggcgcgg cgtcgggtcac gcccttgccc gagcaaccgc 660
 tctgggccc actgattccg tgggtgatcg atcaggttgt cgatcacccc gacaacgatg 720
 aatcatggca gtccattagc ttgtttgaac gactcggcgg gttggcaaca ccggccttga 780

 tcacggctgg gtggtacgac gggttcgtcg gcgaatcgtt gcgcacttcc gttcgggtca 840
 aggacaatgc cgacgcacgt ttggttgcg gcccttgagag tcacagcaac ctactggtc 900
 ggaatgcgga ccggaagtcc ggcatcgcc cgacctacc gattcaagaa gccaccacga 960
 tgcacaaggc attcttcgac cggcacctcc gcggcgagac cgatgcactc gcaggcgtcc 1020
 ccaaagtgcg gctgttcgta atgggcatcg atgagtggcg tgacgaaacg gactggccac 1080
 tgccggacac ggcgtatagc ccttctatc ttggaggtag cggggctgcg aataactcca 1140
 cgggtgggtg aacactgtcg acgtcgattt ccggaactga atctgctgac acctacctgt 1200

 atgatccggc cgatcccgtg ccttcgctcg gggggacgct gctgttcac aacggagaca 1260
 acggaccgcg cgaccaactg cccattcatg accgggacga cgtgttgtgt tacagcactg 1320
 aggtattgac cgaccgggtg gaagtaaccg gcaccgtctc cgcccggctg ttcgtgtcgt 1380
 catcagcgtt ggacactgat ttcaccgcca aacttgcga cgtatttccc gacggtcgcg 1440
 cgatcgcgct gtgtgacggg atcgtgcgga tgcggtaccg cgagacgttg gtcaatcaa 1500
 ccttgatcga agcgggcgaa atctacgagg ttgctatcga catgcttga acctcgaatg 1560
 tattcctgcc agggcatcgc atcatggtcc aagtatcaag tagcaacttc ccgaaatag 1620

 accgcaattc gaataccggc ggagtaatcg cacgggaaca gctcgaagag atgtgcaccg 1680
 ccgtgaaccg cattaccga ggacctgagc atcccagcca cattgtgctg ccgattatca 1740
 agcgatagtt ttcggtgcag ccgcgcctgg ctgacgctgc agctcaaacc caatggctcg 1800
 gcaaccggtg cgcgctgcc gccctgcaact tccaccatg cgtaggtcgt cagcggccga 1860
 ctgaaggcgg gattgcatcc cgaccggcgc acctaggtc aggcgaattg tccgaatgc 1920
 agcggctcatg taattcccga ggttgagcgg ttcgtcggtc acgtaattcc tcaccctgcc 1980
 gtcacgtagt tccccacct gggcgtgtcg gtcggggtgc ggggtgctgct gcaggttcgc 2040

 cccctcccaa ggtccacctg ggggaaggggc ccgacggtgg caaggagaac gtggacgatg 2100
 accgatctga cgataccga tctgatggag ttcttccggc actggcatgc cggcgttctg 2160
 caggttcaga tctaccggc gtttgggatc gaccgcaaaa cctgacttgc acaagttgac 2220

ggcggtttcc ggactcggct gacatttgcg caagtagaag gccccgcggg ttcgggattt 2280
 ggcgcaactaa cgggtcggta aaatctggcg agtggcggcg tacattcgca aggtcaggac 2340
 cgcatcgggg ggcaccgagg tgcagatcgc cgtcaagcag ggacgtcgcg acaaggtgcg 2400
 tcgagcacct cggttccgca cacaccgaca gcgagcttgc tgcgctactg caggccgccc 2460

aggagaagct gcaggtcggg cagtaggaac tcgacctcga cctcggcggg agcggggatc 2520
 gaggtcggg gatcgccggc aagcgggtccc gctggttgat cgaggcgcgc gagaccggat 2580
 gacggcggct cggcttcgac gtgatcgacg acgaggtgtt catctaactg gtgatcgcca 2640
 ggctcgtcga accgacctcg atgagcgaca cggccgggga atcgccgaga tc 2692

<210> 3

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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 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 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

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 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

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> 5

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223

> Mutant CocE polypeptide

<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
 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

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 Glu 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

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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<400> 7

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

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> 8

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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
 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
 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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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

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 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 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
 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
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Mutant CocE polypeptide
 <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
 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
 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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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

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 Ala 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	

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

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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><

223> Mutant CocE polypeptide

<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
 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
 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> 14

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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
 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 Ala 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

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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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
 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
 565 570

<210> 16

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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
 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 Ala 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
 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> 17

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<400> 17

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

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
 565 570

 <210> 18
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Mutant CocE polypeptide
 <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
 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
 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
 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> 19

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<400> 19

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

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
 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

565 570

<210> 21

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><

223> Mutant CocE polypeptide

<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

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 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
 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

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 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 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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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

100 105 110

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

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> 24

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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
 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

 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> 25

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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

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
 565 570

 <210> 26
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Mutant CocE polypeptide
 <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
 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
 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 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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<400> 27

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			
	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
 565 570

<210> 28

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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
 100 105 110
 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 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

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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><

223> Mutant CocE polypeptide

<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

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 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
 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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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
 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

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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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

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

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> 32

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<400> 32

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
 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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

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

 <210> 34
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Mutant CocE polypeptide
 <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
 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
 305 310 315 320
 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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 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

 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
 565 570

<210> 36

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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
 100 105 110
 Met Phe Gly Val Ser Tyr Ala 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

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> 37

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><

223> Mutant CocE polypeptide

<400> 37

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
 305 310 315 320

 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> 38

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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
 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

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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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

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

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
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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

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 Lys Leu
 565 570 575

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

<210> 41

<211> 587

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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

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 Ala 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

<210> 42

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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

100 105 110

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 Lys 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> 43
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Mutant CocE polypeptide
 <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

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

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> 45

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<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

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
 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

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutant CocE polypeptide

<400> 46

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
 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

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 Lys 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

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