

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 510 551**

51 Int. Cl.:

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2008 E 08781619 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 2170373**

54 Título: **Termoestabilización de proteínas**

30 Prioridad:

10.07.2007 US 948976 P

13.11.2007 US 987661 P

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

21.10.2014

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (50.0%)
535 West 116th Street 412 Low Memorial Library
New York, NY 10027, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WOODS, JAMES H.;
LANDRY, DONALD;
MACDONALD, JOANNE;
STOJANOVIC, MILAN N.;
SUNAHARA, ROGER K.;
NARASIMHAN, DIWAHAR;
TESMER, JOHN J. G. y
BRIM, REMY L.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 510 551 T3

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

DESCRIPCIÓN

Termoestabilización de proteínas

Campo

La presente solicitud generalmente se refiere a terapéuticas anticocaína.

5 Antecedentes

El abuso de la cocaína es un problema social y médico intratable y resistente a los remedios con farmacoterapia. La cocaína actúa bloqueando la recaptación de monoaminas, dopamina, nroepinefrina y serotonina, de modo que prolonga y aumenta los efectos de estos neurotransmisores en el sistema nervioso central (Benowitz, 1993). La toxicidad de la cocaína está marcada por convulsiones y por disfunción cardíaca (p. ej., infarto de miocardio, arritmias cardíacas, hipertensión arterial, ictus o aneurisma diseccionante, e incremento de la demanda miocárdica de oxígeno) debido a los efectos sobre los sistemas neurotransmisores y bloqueo de los canales de sodio del miocardio (Bauman y DiDomenico, 2002; Wilson y Shelat, 2003; Knuepfer, 2003). Dado que la capacidad de la cocaína para atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica y sus extendidos efectos sobre los sistemas nerviosos central y periférico, la sobredosis puede producir muerte súbita (véase una revisión en Bauman y DiDomenico, 2002).

Aunque el mecanismo de acción de la cocaína se conoce bien, esta información todavía no ha dado lugar al desarrollo de un antagonista eficaz de la cocaína que podría usarse en situaciones de abuso y sobredosis. Los rápidos y pleiotrópicos efectos de la cocaína presentan un problema complejo para el tratamiento de la toxicidad aguda de la cocaína (Carroll y Kuhar, 1999). Los dos tipos de terapias disponibles para el tratamiento del abuso de opioides, el antagonismo (p. ej., naltrexona) y la sustitución (p. ej., metadona) no tienen equivalentes en el caso de la cocaína, aunque se están considerando intentos con el último (p. ej., Grabowski et al., 2004). Un abordaje es prevenir o reducir que la cocaína llegue a los sitios de acción administrando esterases endógenas, anticuerpos específicos de la cocaína o un anticuerpo catalítico.

La cocaína de origen natural es hidrolizada en el éster de benzoilo por la butirilcolinesterasa (BChE) sérica en éster metílico de ecgonina no tóxico y ácido benzoico. En el hígado, la caboxilesterasa hCE-2 hidroliza el éster metílico, dando benzoilecgonina y metanol. La semivida de eliminación en sangre varía de 0,5 a 1,5 horas (Inaba, 1989). Se han producido algunos intentos de usar la BChE de origen natural o BChE modificada genéticamente para aumentar la degradación de la cocaína (Véase, por ejemplo, Carmona et al., 2000; Xie et al., 1999; Sun et al., 2002a; Sun et al., 2002b; Duysen et al., 2002; Gao and Brimijoin S, 2004; Gao et al., 2005). Otros investigadores han usado un anticuerpo monoclonal, Mab 15A10, como anticuerpo catalítico contra la cocaína (véase, por ejemplo, Landry et al., 1993; Mets et al., 1998), mientras que otros están explorando el uso de vacunas contra la cocaína (véase, por ejemplo, Kosten et al., 2002).

Una bacteria, *Rhodococcus sp.* MB 1, autóctona del suelo que rodea a la planta de coca, ha desarrollado la capacidad para usar cocaína como su única fuente de carbono y de nitrógeno. La bacteria expresa una cocaína esterasa (CocE) que actúa de modo similar a BChE hidrolizando el éster de benzoilo de la cocaína y dando éster metílico de ecgonina y ácido benzoico (FIG. 1) Bresler et al., 2000; Turner et al., 2002; Larsen et al., 2002). El gen para CocE se ha aislado y clonado (Bresler et al., 2000), y se ha determinado la estructura cristalina de CocE (Turner et al., 2002; Larsen et al., 2002).

La enzima purificada (PM ~65 kDa) cataliza la cocaína con mucha eficiencia con una cinética de Michaelis-Menten $k_{cat} = 7,2 \text{ s}^{-1}$ y $K_m = 640 \text{ nM}$ (Turner et al., 2002; Larsen et al., 2002), casi tres órdenes de magnitud superior a las esterases endógenas y, muy probablemente, actuaría lo bastante rápido como para destoxificar a los seres humanos con sobredosis de cocaína (Landry et al., 1993; Mets et al., 1998). Adicionalmente, la esterasa también metaboliza el cocaetileno, un potente metabolito de la cocaína y el alcohol, casi con la misma eficiencia con la que metaboliza la cocaína ($k_{cat} = 9,4 \text{ s}^{-1}$ y $K_m = 1600 \text{ nM}$) (Turner et al., 2002; Larsen et al., 2002).

Un aspecto de la CocE de *Rhodococciis* que limita su utilidad es su baja termoestabilidad, su $t_{1/2}$ a 37° C es de aproximadamente 15 minutos, mientras que su $t_{1/2}$ a 4° C es >6 meses (solicitud de patente PCT PCT/US2007/015762). La termoestabilidad se modificó genéticamente en CocE, teniendo varias proteínas mutantes una mayor $t_{1/2}$ a 37° C de hasta ~ 326 min (*Id.*).

Existe la necesidad de procedimientos u composiciones adicionales para la termoestabilización de CocE. La presente invención aborda dicha necesidad.

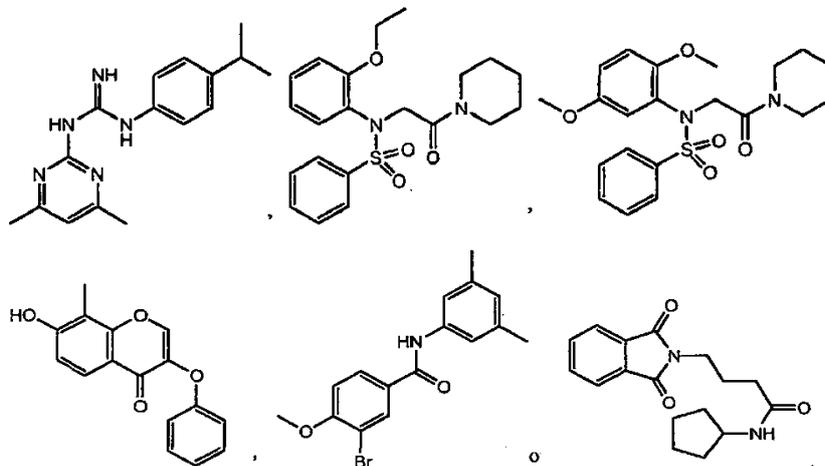
Compendio

Los inventores han descubierto que determinados compuestos termoestabilizan la CocE silvestre también termoestabilizan las CocE mutantes que ya eran más termoestables que la CocE silvestre.

Por tanto, la solicitud está dirigida a composiciones que comprenden una cocaína esterasa (CocE) y un compuesto, en el que la CocE en presencia del compuesto es más termoestable que la CocE en ausencia del compuesto; y el uno o más

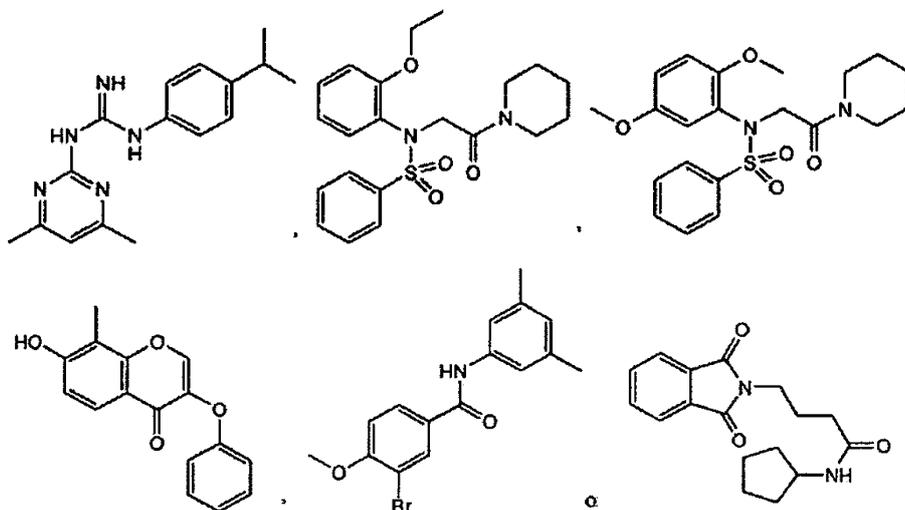
compuestos termoestabilizantes se seleccionan de:

5



10

La solicitud está dirigida adicionalmente a un método ex vivo de termoestabilización de una cocaína esterasa (CocE), comprendiendo el procedimiento combinar un polipéptido de CocE con uno o más compuestos de termoestabilización seleccionados de:



15

La solicitud también está dirigida al uso de las composiciones anteriores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección inducida por cocaína.

La solicitud está dirigida adicionalmente a las composiciones anteriores para el uso en el tratamiento de una afección inducida por cocaína.

20

También se ha descubierto que el mutante de CocE L169K/G173Q tiene un grado inesperadamente alto de termoestabilidad. Véase el Ejemplo 5.

Por tanto, la solicitud dirigida adicionalmente a un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de CocE que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85% con el

polipéptido de la SEC ID N° 1, en el que el polipéptido de CocE codificado tiene (a) las sustituciones L169K y G173Q, y (b) la actividad esterasa con mayor termoestabilidad a 37°C en comparación con la CocE silvestre.

5 La solicitud también dirigida al polipéptido de CocE que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85% con el polipéptido de la SEC ID N° 1, en el que el polipéptido de CocE codificado tiene las sustituciones L169K y G173Q, y la actividad esterasa con mayor termoestabilidad a 37°C en comparación con la CocE silvestre. También se proporcionan composiciones que comprenden el polipéptido en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de las figuras

- 10 La FIG. 1 muestra el metabolismo de la cocaína catalizada por la cocaína esterasa de *Rhodococcus* (CocE).
- La FIG. 2 son gráficos de la desnaturalización de la cocaína con el tiempo en presencia y ausencia de CocE.
- La FIG. 3 muestra el metabolismo del acetato de 4-nitrofenilo (4NPA) catalizado por la CocE y los gráficos de la desnaturalización de 4NPA con el tiempo en presencia y ausencia de CocE.
- La FIG. 4 es una fotografía de un gel no desnaturalizante que muestra la agregación de CocE tras 1 hora de incubación en varias condiciones y en presencia o ausencia de sustratos o productos.
- 15 La FIG. 5 es un gráfico de un análisis espectrofotométrico de la estabilización de la cocaína durante la escisión de 4NPA en presencia de varias concentraciones de cocaína.
- La FIG. 6 son gráficos que muestran un análisis espectrofotométrico cinético de la estabilización de CocE con ácido benzoico, éster metílico de ecgonina o acetato sódico.
- 20 La FIG. 7 son gráficos, estructuras químicas, un diagrama de una reacción enzimática y una fotografía de un gel no desnaturalizante que muestra la termoestabilización de CocE mediante ácido fenilborónico (PBA).
- La FIG. 8 es un gráfico que muestra termoestabilización con ácido benzoico de CocE.
- La FIG. 9 es un gráfico que muestra los resultados de una detección selectiva de 40 compuestos de la capacidad para termoestabilizar la CocE junto con las estructuras químicas de los compuestos más eficaces.
- 25 La FIG. 10 son gráficos y la estructura del compuesto 6031818 que muestra los resultados de estudios sobre la capacidad de dicho compuesto para inhibir la CocE.
- La FIG. 11 son gráficos y la estructura del compuesto 6031818 que muestra la capacidad de dicho compuesto para termoestabilizar la CocE cuando se usan 4NPA o cocaína como sustratos.
- La FIG. 12 son gráficos y la estructura del compuesto 6169221 que muestra los resultados de estudios sobre la capacidad de dicho compuesto para inhibir la CocE.
- 30 La FIG. 13 son gráficos y la estructura del compuesto 6169221 que muestra la capacidad de dicho compuesto para termoestabilizar la CocE cuando se usan 4NPA o cocaína como sustratos.
- La FIG. 14 son gráficos y la estructura del compuesto 5804236 que muestra los resultados de estudios sobre la capacidad de dicho compuesto para inhibir la CocE.
- 35 La FIG. 15 son gráficos y la estructura del compuesto 5804236 que muestra la capacidad de dicho compuesto para termoestabilizar la CocE cuando se usan 4NPA o cocaína como sustratos.
- La FIG. 16 son gráficos que caracterizan adicionalmente mediante dicroísmo circular, la estabilidad de la CocE silvestre y T172R mutante.
- La FIG. 17 son gráficos que caracterizan adicionalmente, mediante dicroísmo circular, la estabilidad de la CocE silvestre en presencia de ácido benzoico o ácido fenilborónico.
- 40 La FIG. 18 son gráficos que caracterizan adicionalmente, mediante dicroísmo circular, la estabilidad de la CocE mutante L169K en ausencia o presencia de ácido fenilborónico.
- La FIG. 19 son gráficos que caracterizan adicionalmente, mediante dicroísmo circular, la estabilidad de la CocE silvestre en presencia o ausencia del compuesto 6031818.
- 45 La FIG. 20 son fotografías de geles no desnaturalizantes que muestran los resultados de un análisis de CocE silvestre y de la CocE mutante L169K en presencia de varias moléculas pequeñas tras la incubación a 37 °C para varios puntos de tiempo.

La FIG. 21 es un gráfico y una tabla que muestran los resultados de un análisis de la semivida por densitometría puntual de los geles mostrados en la FIG. 20.

La FIG. 22 son diagramas que muestran la estructura de la cocaína esterasa. Panel A. La cocaína esterasa está compuesta por tres dominios distintos como está indicado. Panel B. Mutaciones puntuales predichas por métodos computacionales superpuestas sobre la estructura cristalina de wt-CocE. Las coordenadas se obtuvieron de la base de datos RCSB(pdb:1JU4) de Larsen et al (2002). Se generaron modelos de estructuras y se produjeron con PyMol (DeLano Scientific, Palo Alto, CA).

La FIG. 23 es un gráfico que muestra el deterioro de la actividad de la CocE a 37 °C. 50 ng/ml de CocE silvestre y los mutantes se incubaron a 37°C y la actividad se midió (Xie et al., 1999) en el tiempo. Las semividas se midieron a partir de las curvas resultantes. La CocE silvestre, T172R, L169K y T172R/G173Q mostraron las semividas a 12 min, 46 min, 274 min y 326 min, respectivamente.

La FIG. 24 es un gráfico que muestra que DTT inhibe la wt-CocE de un modo dependiente de la concentración con una $CI_{50} \sim 390 \mu\text{M}$.

La FIG. 25 es un gráfico que muestra que la presencia de DTT (10 mM) acorta la T_{inact} en la wt-CocE.

La FIG. 26 es un gráfico que muestra el deterioro dependiente de la temperatura de la actividad de la esterasa. 50 ng/ml de CocE silvestre y los mutantes se incubaron previamente durante 30 minutos a las temperaturas indicadas (°C) y se midió la actividad (Xie et al., 1999). Se ilustra la actividad de cada mutante restante (como porcentaje de la actividad máxima, V_{max} , sin incubación previa) tras la incubación previa. La CocE silvestre (barras abiertas) parece inactivarse entre 30 - 35° C, mientras que T172R/G173Q (barras sombreadas) y L169K (sólidas) muestran ambas una estabilidad térmica potenciada (inactivación a 40 - 45° C).

La FIG. 27 es un gráfico que muestra efectos protectores de CocE contra la toxicidad inducida por la cocaína. Se administró CocE (1 mg) por vía intravenosa 1 minuto antes de la administración de cocaína (mg/kg, i.p.). Se representaron las curvas de respuesta a la dosis de la letalidad inducida por cocaína en ausencia o presencia de CocE o mutantes. Cada punto de datos representa el porcentaje de ratones ($n=6$ para cada condición de dosis) que exhibe letalidad inducida por cocaína.

La FIG. 28 son gráficos que muestran el curso de tiempo de los efectos protectores de CocE contra la toxicidad de la cocaína. Cada punto de datos representa el porcentaje de ratones ($n=6$ para cada condición de dosis) que exhibe letalidad inducida por cocaína. CocE o mutantes (0,1 mg, 0,3 mg, 1 mg i.v.) se administraron a diferentes puntos de tiempo antes de la administración de la cocaína (180 mg/kg, i.p.).

La FIG. 29 es un gráfico que muestra la duración estimada de la protección para una letalidad del 50%. El tiempo necesario para alcanzar una letalidad del 50% para CocE y cada mutante se midió a partir de los datos en la FIG. 28 y se representó frente a la dosis.

La FIG. 30 es un diagrama que muestra una visión general de CocE y mutaciones termoestabilizantes. Las hélices H2 y H3 de CocE se muestran como boninas y el resto de la CocE como una superficie molecular. La molécula de DTT observada unida en las estructuras cristalinas indica la posición relativa del sitio activo en una cavidad adyacente a la hélice H2. Se indican las tres mutaciones estabilizantes identificadas. La mutación T172R conduce a interacciones de van der Waals entre R172 (hélice H2) y F189 (hélice H3). La mutación G173Q une la hendidura del sitio activo con un nuevo puente de hidrógeno (líneas discontinuas). La mutación L169K afecta al sitio activo. Se observan DTT y glicerol en el sitio activo en esta estructura cristalina, exhibiendo K169 múltiples conformaciones y formando puentes de hidrógeno con glicerol. Obsérvese que L169 está poco ordenada en la estructura nativa. K169 forma contactos directos adicionales con Y44. El glicerol se une donde cabe esperar que se una el anillo tropano de la cocaína, mientras que DTT ocupa el sitio de unión del resto bencilo. Se generó un modelo de estructura y se produjo con PyMol (DeLano Scientific, Palo Alto, CA).

La FIG. 31 son diagramas que muestran la estructura de los mutantes termoestables. Las estructuras de cristal de alta resolución de T172R (B), G173Q (D) y L169K (F) se comparan con las estructuras de wt-CocE (A, C y C, respectivamente). El efecto global de los mutantes parece ser el resultado de interacciones potenciadas entre las hélices 1 y 2 del dominio II (R172 y F189) o interacciones entre dominios (Q173 con P44 y K169 con el sitio activo). Las estructuras de L169K en comparación con wt-CocE en presencia de carbonato de 2-oxodioxolanobutirilo (DBC) en el sitio activo ilustra y potencia la interacción del residuo de lisina con el agua y el sitio activo. Las densidades de electrones $2F_oF_c$ se contornearon a 1 sigma.

La FIG. 32 es un diagrama que muestra la estabilización del bucle H1-H2 en el dominio II por R172. La sustitución de arginina por treonina en el residuo 172 estabiliza la hélice 1 y la hélice 2 a través de interacciones de potenciación con F189. Aunque las conformaciones "in" (oscuras) y "out" (claras) se pueden encontrar en las estructuras wt-CocE, solo la conformación "out" se encuentra con T172R.

La FIG. 33 son diagramas que muestran una comparación de DBC y ácido fenilborónico en el sitio activo de wt-CocE. Se encontró que DBC se unía covalentemente a la serina 117 del sitio activo de los cristales cultivados a

partir de proteínas aisladas con DTT. Un mapa de omisión de la molécula de DBC (izquierda) muestra la densidad de carbono a 5 sigma, la densidad de oxígeno a 12 sigma y la densidad de azufre a 20 sigma. El panel derecho representa el sitio de unión previamente notificado del análogo en estado de transición del ácido fenilborónico (pdb:1JU3), que es análogo del sitio de unión a DBC. Se muestra la densidad del mapa de omisión para el mutante L169K, que coordina una molécula de agua cuyo hidrógeno se une al anillo de DBC.

La FIG. 34 es un gráfico y una tabla que muestran parámetros catalíticos de wt-CocE y dos mutantes dobles.

La FIG. 35 son gráficos que muestran la pérdida de actividad *in vitro* de wt-CocE, dos mutantes de CocE (T172R y L169K) y un doble mutante que combina las dos mutaciones sencillas.

La FIG. 36 es un gráfico que muestra la protección de ratones frente a una dosis letal de cocaína por la mutante de CocE L169K/G173Q.

La FIG. 37 son gráficos que muestran un curso de tiempo de la protección de ratones frente a una dosis letal de cocaína por la mutante de CocE L169K/G173Q.

Descripción detallada

Los inventores han descubierto que determinados compuestos termoestabilizan la CocE silvestre también termoestabilizan las CocE mutantes que ya eran más termoestables que la CocE silvestre. Véanse los Ejemplos 1 – 3.

Por tanto, la solicitud está dirigida a composiciones que comprenden una cocaína esterasa (CocE) y un compuesto, en el que la CocE en presencia del compuesto es más termoestable que la CocE en ausencia del compuesto.

El incremento resultante de la termoestabilidad de la CocE en presencia del compuesto aumenta la semivida de la enzima a 37°C al menos aproximadamente 5 minutos, preferentemente al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 minutos, o más.

La termoestabilidad de un polipéptido dado se puede evaluar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, medición por espectroscopia con dicroísmo circular (DC) (como en, por ejemplo, el Ejemplo 2, más adelante) o calorimetría diferencial de barrido. Véase también la solicitud de patente PCT PCT/US2007/015762, publicada como el documento WO/2008/008358. Preferentemente, la termoestabilidad se determina midiendo la actividad enzimática en el tiempo a una temperatura alta baja con y in el compuesto, para determinar si, y en qué medida, el compuesto hace que la enzima mantenga la actividad enzimática a la temperatura más alta más que sin el compuesto. Una temperatura baja preferida es la temperatura ambiente (es decir, ~25° C); una temperatura alta preferida es 37°C. No obstante, se puede usar cualquier intervalo de temperaturas. El experto en la técnica podría determinar el mejor intervalo de temperaturas para cualquier aplicación concreta sin experimentación indebida.

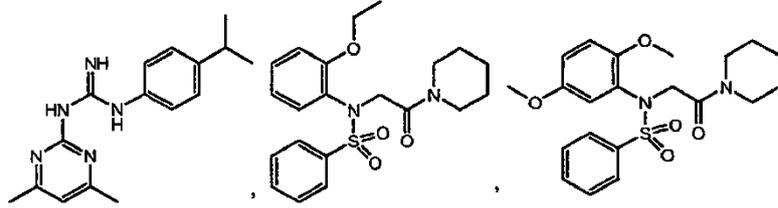
Como se usa en el presente documento, una CocE es una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80% idéntica a la SEC ID N° 1 y es capaz de catalizar específicamente la escisión de la cocaína en éster metílico de ecgonina y ácido benzoico. Preferentemente, la CocE tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90%, más preferentemente un 95%, incluso más preferentemente un 99 % idéntica a la SEC ID N° 1. En algunas realizaciones preferidas, la CocE tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEC ID N° 1.

En otras realizaciones, la CocE tiene una mutación, como las descritas en la solicitud de patente PCT PCT/US2007/015762, incluyendo mutantes que tienen una termoestabilidad incrementada sobre la silvestre (SEC ID N° 1) y los mutantes que no la tienen. Mutantes preferidos son aquellos en los que CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1 a excepción de la sustitución L163V, V225I, I218L, A310D, A149S, S159A, S265A, S56G, W220A, S140A, F189L, A193D, T254R, N42V, V262L, L508G, Y152H, V160A, T172R, Y532F, T74S, W285T, L146P, D533S, A194R, G173Q, C477T, K531A, R41I, L119A, K46A, F84Y, T172R/G173Q, L169K, F189A, N197K, R182K, F189K, V190K, Q191K, o A194K, o cualquier combinación de estos residuos de aminoácidos mutados. En algunas de estas realizaciones, la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 a excepción de la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q. En otras de estas realizaciones, la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 a excepción de la sustitución L169K/G173Q.

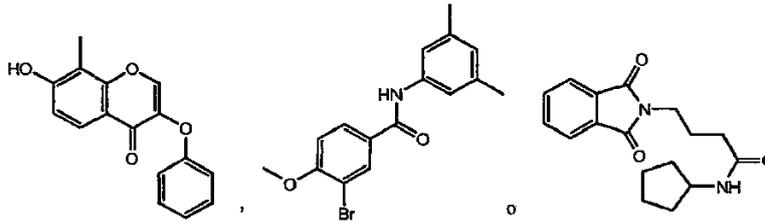
Un compuesto dentro del alcance de estas realizaciones puede aumentar la termoestabilidad de la CocE silvestre y/o mutante descritos anteriormente.

La CocE también puede estar pegilada o, de otro modo, tratada para aumentar la duración de la acción, la estabilidad al calor y/o la disminución de la inmunogenicidad. La pegilación puede aumentar adicionalmente la termoestabilidad de las composiciones del compuesto-CocE y, cuando se usan in vivo, incrementar la semivida en suero disminuyendo el aclaramiento renal, la proteólisis, la captación por los macrófagos y la respuesta inmunológica.

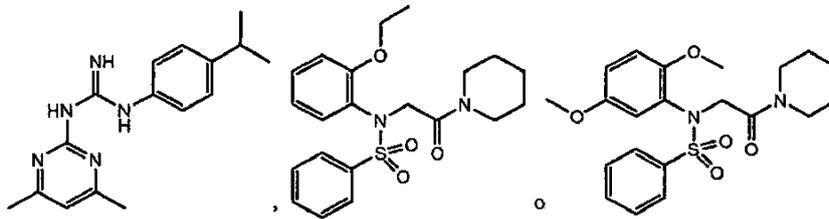
Las composiciones del compuesto-CocE se pueden encapsular en eritrocitos (RBC) para aumentar la duración de la acción y la estabilidad térmica y disminuir la inmunogenicidad. En composiciones preferidas, el compuesto es:



5

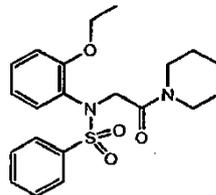


Más preferentemente, el compuesto es



10

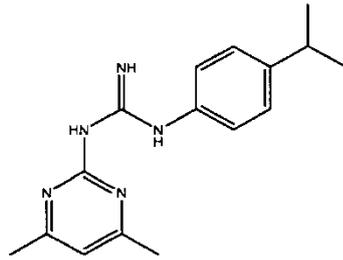
Incluso más preferentemente, el compuesto es



(6031818).

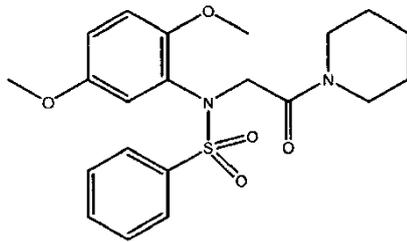
15

El compuesto también puede ser



(5804236).

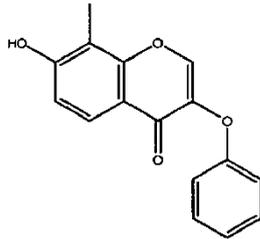
El compuesto puede ser adicionalmente



5

(6169221).

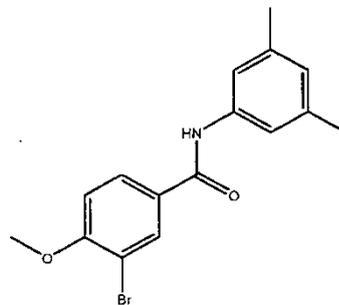
Adicionalmente, el compuesto puede ser



(F6 460).

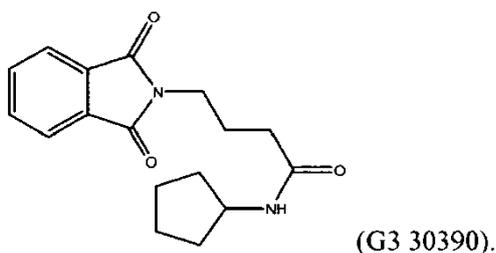
10

Adicionalmente, el compuesto puede ser



(G2 30460).

15 El compuesto también puede ser



Las composiciones de la presente invención pueden comprender más de uno de cualquiera de los compuestos identificados anteriormente que termoestabilizan la CocE.

- 5 En algunas realizaciones de estas composiciones, en particular cuando se usan para fines terapéuticos, la composición está en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

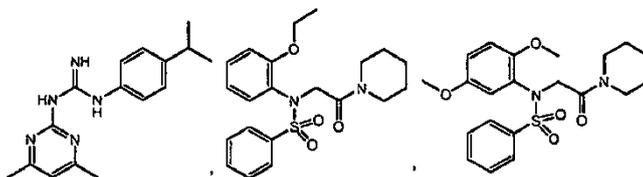
Las composiciones del compuesto CocE descritas en el presente documento se puede formular mediante cualquier modo convencional usando uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables (véase, por ejemplo, Gennaro (2005) Remington the Science and Practice of Pharmacy 21st ed. Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781746736). Dichas formulaciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones del compuesto CocE, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para una administración adecuada al sujeto. La formulación debe adaptarse al modo de administración. Las composiciones del compuesto CocE de uso con la solicitud actual se pueden formular mediante procedimientos conocidos para administrar a un sujeto usando varias vías, que incluyen, entre otras, parenteral, pulmonar, oral, tópica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oftálmica, bucal y rectal. Las composiciones del compuesto CocE también se pueden administrar en combinación con uno o más agentes adicionales divulgados en el presente documento y/o junto con otros agentes biológicamente activos o biológicamente inertes. Dichos agentes biológicamente activos o biológicamente inertes pueden estar en comunicación fluida o mecánica con el o los agentes o unidos a el o los agentes mediante enlaces iónico, covalente, fuerzas de Van der Waals, hidrofóbicas, hidrofílicas u otras físicas.

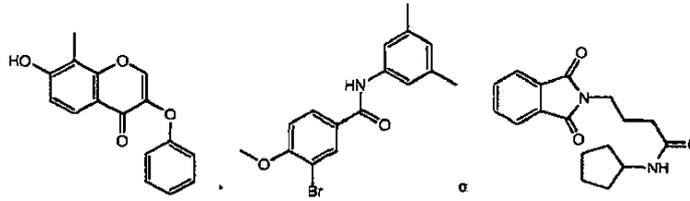
Las composiciones del compuesto CocE descritas en el presente documento se pueden administrar por vía parenteral, incluyendo inyecciones intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal. En las formulaciones de biomoléculas también se pueden incluir excipientes, de uso habitual en la liberación parenteral de moléculas farmacológicas pequeñas, incluyendo potenciadores de la solubilidad, agentes osmóticos, tampones y conservantes. La inclusión de agentes antiagregantes y antiadsorción, tales como tensioactivos y albúmina, al formular y liberar biomoléculas puede añadir una estabilidad aumentada y disminuir el riesgo de que la biomolécula activa interactúe con una interfaz, lo que puede conducir a desplegamiento, agregación y/o precipitación. Las composiciones del compuesto CocE se pueden liofilizar para añadir estabilidad durante el almacenamiento y reprocesar antes de la administración parenteral.

30 También se contempla la liberación pulmonar de las composiciones del compuesto CocE. Adicionalmente, se pueden formular preparaciones de liberación controlada (o de liberación sostenida) para extender la actividad del polipéptido de CocE mutante y reducir la frecuencia de la dosis, como se conoce en la técnica.

Las composiciones del compuesto CocE se pueden encapsular y administrar en diversos sistemas de liberación en vehículo. Ejemplos de sistemas de liberación en vehículo para usar con los polipéptidos de CocE mutantes descritos en el presente documento incluyen microesferas (véase, por ejemplo, Varde & Pack (2004) Expert Opin. Biol. 4(1) 35 - 51), hidrogeles (véase, en general, Sakiyama et al. (2001) FASEB J. 15, 1300 - 1302), implantes poliméricos (véase, en general, Teng et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 3024 - 3029), vehículos poliméricos inteligentes (véase, en general, Stayton et al. (2005) Orthod Craniofacial Res 8, 219 - 225; Wu et al. (2005) Nature Biotech (2005) 23(9), 1137 - 1146), y liposomas (véase, p. ej., Galovic et al. (2002) Eur. J. Pharm. Sci. 1 5.441 - 448; Wagner et al. (2002) J. Liposome Res. 1 2.259 - 270).

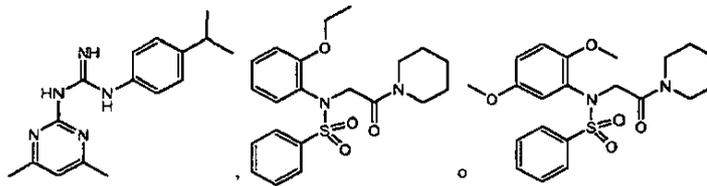
La solicitud también está dirigida a procedimientos ex vivo de termoestabilizar una cocaína esterasa (CocE). Los procedimientos comprenden combinar la CocE con el compuesto





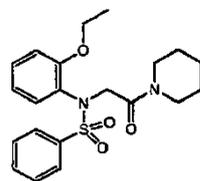
Preferentemente, el compuesto es

5



Más preferentemente, el compuesto es

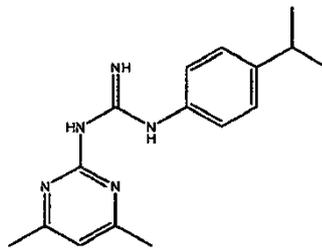
10



(6031818).

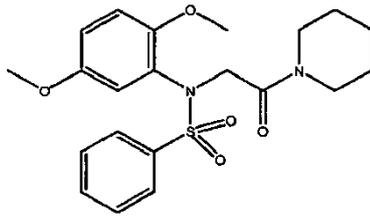
El compuesto también puede ser

15

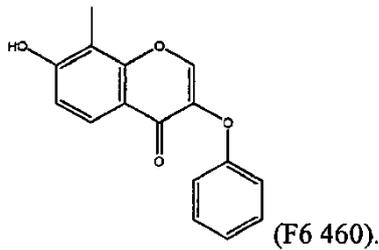


(5804236).

El compuesto puede ser adicionalmente

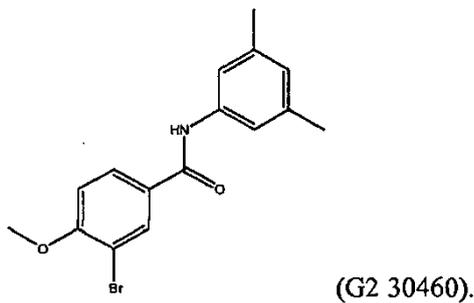


Adicionalmente, el compuesto puede ser



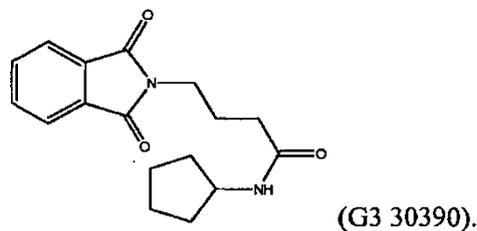
5

Adicionalmente, el compuesto puede ser



10

El compuesto también puede ser



15 En estos métodos, la CocE se puede combinar con más de un compuesto termoestabilizante, por ejemplo uno de los compuestos descritos anteriormente, o con cualquier otro compuesto.

Preferentemente, la CocE comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N° 1; más preferentemente, al menos un 95% idéntica a la SEC ID N° 1; incluso más preferentemente al menos un 99 % idéntica a la SEC ID N° 1. En otras realizaciones, la CocE comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1. En realizaciones adicionales, la CocE es un mutante termoestable de una CocE silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1. Ejemplos preferidos de dichos mutantes termoestables es la CocE que tiene la

20

secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 a excepción de la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q o T172R/G173Q. Adicionalmente, la CocE puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 a excepción de la sustitución L169K/G173Q.

5 Los métodos de estas realizaciones se pueden realizar cuando la CocE está *in vitro*, por ejemplo para termoestabilizar la CocE tras la purificación o durante el almacenamiento.

La solicitud está dirigida adicionalmente a una composición de la invención para usar en el tratamiento de un mamífero que sufre una afección inducida por cocaína. La composición del compuesto – CocE descrita anteriormente, polipéptido o ácido nucleico debe administrarse al mamífero de un modo suficiente para reducir los efectos de la afección inducida por cocaína en el mamífero.

10 Una determinación de la necesidad de tratamiento normalmente se evaluará mediante los antecedentes y una exploración física consistente con la afección inducida por cocaína. La afección inducida por cocaína se selecciona del grupo que consiste en: sobredosis de cocaína, toxicidad de la cocaína y dependencia y/o adicción a la cocaína. El diagnóstico de dichas afecciones está dentro de la experiencia en la materia. Por ejemplo, el diagnóstico de toxicidad de la cocaína puede incluir evaluación de convulsiones, crisis de grand mal, parada cardíaca, infarto de miocardio, arritmias cardíacas, hipertensión arterial, ictus, psicosis inducida por fármacos, aneurisma diseccionante y aumento de la demanda miocárdica de oxígeno. Como otro ejemplo, en el caso de dependencia y/o adicción a la cocaína, los síntomas de abstinencia incluyen sensaciones subjetivas de disforia leve o grave, depresión, ansiedad o irritabilidad. Los sujetos con una necesidad identificada de terapia incluyen aquellos con una afección inducida por cocaína diagnosticada, una indicación de una afección inducida por cocaína, y sujetos que han sido tratados, se están tratando o se tratarán por una afección inducida por cocaína. Las composiciones se pueden usar para tratar a cualquier mamífero, incluyendo, entre otros, roedores, conejos, cobayas, caballos, vacas, perros, gatos, ovejas y cerdos, y, lo más preferentemente, seres humanos.

25 Una cantidad eficaz de las composiciones del compuesto – CocE descritas en el presente documento es, en general, aquella que puede reducir la toxicidad por cocaína o la gravedad de una afección inducida por cocaína. La reducción de la gravedad incluye, por ejemplo, una detención o disminución de los síntomas, indicadores fisiológicos, marcadores bioquímicos o indicadores metabólicos. Cuando se usan en la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones del compuesto – CocE descritas en el presente documento se puede emplear en forma pura o, cuando existen dichas formas, en forma de sal farmacéuticamente aceptable y con o sin un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las composiciones del compuesto – CocE se pueden administrar en una proporción beneficios/riesgos razonable a cualquier tratamiento médico, en una cantidad suficiente para reducir sustancialmente la concentración de cocaína en la sangre y/o los tejidos del sujeto.

30 La eficacia terapéutica y la toxicidad de las composiciones del compuesto-CocE se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) u otros parámetros.

35 La cantidad de las composiciones del compuesto-CocE que se puede combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una única forma de dosificación variará en función del huésped tratado, y el modo de administración concreto. Los expertos en la técnica apreciarán que el contenido unitario del agente en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita constituir por sí mismo una cantidad terapéuticamente eficaz, ya que la cantidad terapéuticamente eficaz necesaria podría alcanzarse mediante la administración de una serie de dosis individuales. La administración de la composición del compuesto-CocE se puede producir como un único acontecimiento o en un curso de tiempo del tratamiento. Por ejemplo, una composición del compuesto-CocE se puede administrar a diario, semanalmente, bisemanalmente o mensualmente. Para algunas afecciones, el tratamiento podría extenderse desde varias semanas a varios meses o incluso un año o más.

40 El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto concreto dependerá de varios factores, incluyendo la afección inducida por cocaína que se está tratando y la gravedad de la afección inducida por cocaína; la actividad del polipéptido de CocE mutante usado; la composición específica usada; a edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la semivida en plasma del polipéptido de CocE mutante; la velocidad de excreción del polipéptido de CocE mutante usado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o a la vez con el polipéptido de CocE mutante empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas (véase, por ejemplo, Koda-Kimble et al. (2004) Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781748453; Winter (2003) Basic Clinical Pharmacokinetics, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781741475; Sharqel (2004) Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, McGraw-Hill/Appleton & Lange, ISBN 0071375503). Un practicante experto entenderá que el uso diario total de las composiciones de compuesto-CocE para uso en realizaciones de la invención divulgadas en el presente documento se puede decidir sin experimentación indebida por el médico encargado de la atención dentro del alcance del juicio médico sólido.

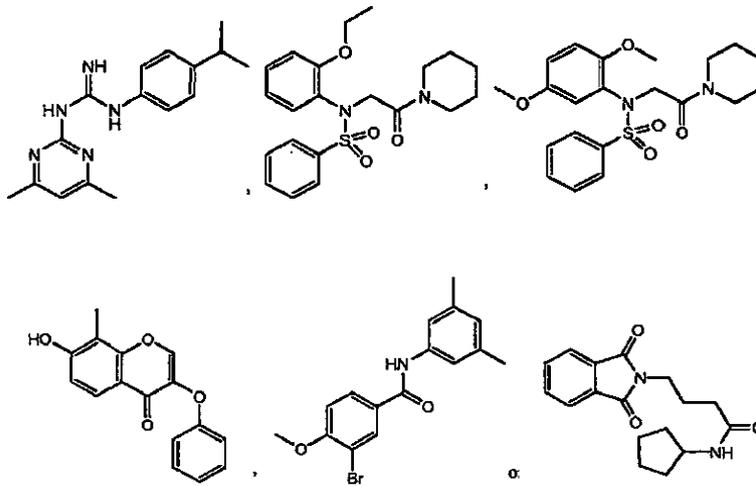
45 Las composiciones de compuesto-CocE descritas en el presente documento también se pueden usar en combinación con otras modalidades terapéuticas. Por tanto, además de las terapias descritas en el presente

documento, también se pueden proporcionar al sujeto otras terapias conocidas que son eficaces para afecciones inducidas por cocaína concretas.

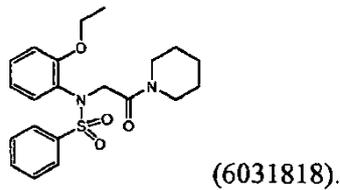
Por tanto, en algunas realizaciones de estos procedimientos, el mamífero es adicto a la cocaína. En otras realizaciones, el mamífero está sufriendo una sobredosis de cocaína.

5 La CocE para estos aspectos puede ser una mutante termoestable de una CocE silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1. Estas mutantes preferidas tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1, excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, T172R/G173Q, o L169K/G173Q. Los mutantes de la CocE que tienen más de una mutación, preferentemente más de una mutación termoestabilizante, también son útiles para estos procedimientos de tratamiento.

10 El compuesto que se va a usar es

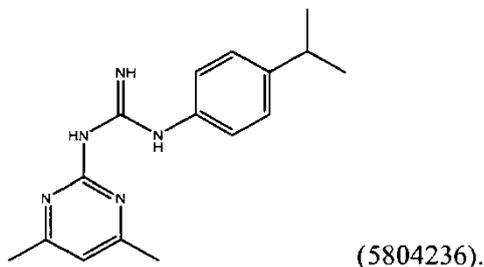


15 Más preferentemente, el compuesto es

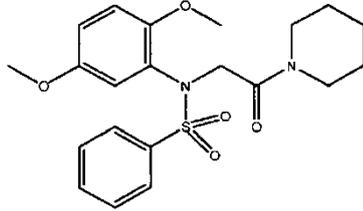


El compuesto también puede ser

20

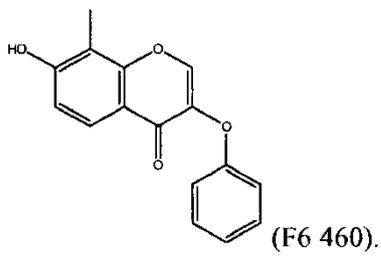


El compuesto puede ser adicionalmente

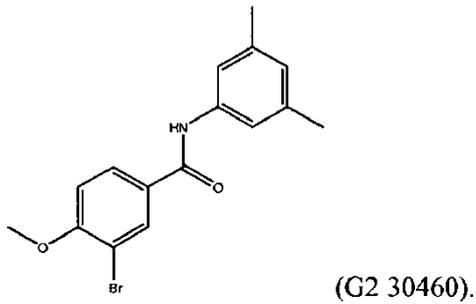


5

Adicionalmente, el compuesto puede ser

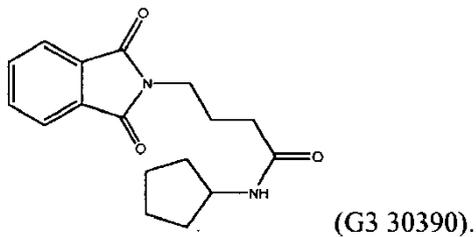


10 Adicionalmente, el compuesto puede ser



El compuesto también puede ser

15



En estos métodos, la CocE se puede combinar con más de un compuesto termoestabilizante, por ejemplo uno de los compuestos descritos anteriormente, o con cualquier otro compuesto.

La solicitud dirigida adicionalmente a un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de CocE que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85% con el polipéptido de la SEC ID N° 1. En estas realizaciones, el polipéptido de CocE codificado tiene (a) las sustituciones L169K y G173Q, y (b) la actividad esterasa con mayor termoestabilidad a 37°C en comparación con la CocE silvestre. Véase el ejemplo 5, en el que se establece que este polipéptido tiene una semivida de aproximadamente 72 horas a 37°C, que es más de 300 veces más largo que la enzima silvestre que tiene la secuencia SEC ID N° 1. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % con el polipéptido de SEC ID N° 1. Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos un 95% con el polipéptido de SEC ID N° 1. Incluso más preferentemente, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos un 99% con el polipéptido de SEC ID N° 1. En las realizaciones más preferidas, el ácido nucleico codifica un polipéptido de CocE que tiene la secuencia de la SEC ID N° 1. En las realizaciones más preferidas, el ácido nucleico codifica un polipéptido de CocE que tiene la secuencia de la SEC ID N° 1, a excepción de las sustituciones L169K y G173Q.

La solicitud también está dirigida a los polipéptidos de CocE codificados por cualquiera de los ácidos nucleicos anteriores que codifican un polipéptido de CocE que tiene las sustituciones L169K y G173Q. En algunas realizaciones, el polipéptido de CocE está en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición de polipéptido o de ácido nucleico también se puede usar en los aspectos terapéuticos de la invención como se ha descrito anteriormente.

Realizaciones preferidas de la invención se describen en los ejemplos siguientes.

20 Ejemplo 1. Compuestos que termoestabilizan la CocE.

La cocaína esterasa es una proteína que se expresa en bacterias que cataliza la escisión de la cocaína en dos subproductos inactivos: éster metílico de ecgonina y ácido benzoico. Teóricamente, la proteína podría usarse *in vivo* para el tratamiento de la sobredosis y la adicción de la cocaína, aunque la proteína silvestre no es estable a 37°C.

El análisis de la acción de la CocE sobre la escisión de la cocaína se realiza usando las propiedades espectroscópicas de la cocaína, que absorbe un máximo de luz a una longitud de onda de 240 nm. La actividad de CocE se mide monitorizando la disminución de la señal a A240 usando varias concentraciones de cocaína y determinando la velocidad inicial de la disminución. A partir de estos valores se puede determinar la V_{max} de la enzima. Mediante la incubación previa de la enzima a 37°C a varios tiempos antes de monitorizar la actividad se puede calcular la semivida de CocE a 37° C.

En un esfuerzo constante de mejorar la termoestabilidad de CocE, se han producido varias mutantes de la proteína y se ha analizado la semivida *in vitro*. El análisis posterior usando electroforesis en gel mostró que en condiciones nativas, se pudo observar que las proteínas se agregan tras la incubación previa a 37°C a varios tiempos (publicación PCT WO/2008/008358). La desaparición del producto inicial se puede medir mediante análisis densitométrico y este análisis respaldó los datos espectroscópicos de que los mutantes tenían una semivida *in vitro* mejorada sobre la WT y la S167A mutante.

Mientras que la incubación previa a varios tiempos indica que la CocE silvestre tenía una semivida corta a 37° C (5 minutos), también se observó que si las mediciones espectrofotométricas se realizaban a 37°C, la CocE silvestre seguiría escindiendo a una velocidad lineal durante más de 60 minutos (FIG. 2, centro) o hasta agotar el sustrato de la cocaína (FIG. 2, abajo). Esto sugirió que la enzima silvestre se estaba estabilizando en presencia de cocaína o sus subproductos.

La CocE también puede escindir otro sustrato, el acetato de 4-nitrofenilo (FIG. 3). La escisión se monitoriza mediante la detección de la aparición del producto de la reacción 4-nitrofenol, que absorbe a 400 nm. El análisis de la escisión de este sustrato a 37°C muestra que el producto se produce inicialmente rápido, pero la reacción se ralentiza con el tiempo (FIG. 3, centro y abajo). Esto indica que el acetato de 4-nitrofenilo y los productos probablemente no están estabilizando la enzima, o al menos no en la medida en que lo hace la reacción de la cocaína.

Para analizar la estabilización de la CocE silvestre por los sustratos y productos, la capacidad de cada compuesto para inhibir la formación de agregados de la proteína CocE se analizó tras la incubación durante 1 hora a 37°C. Tanto la cocaína como el ácido benzoico inhibieron la formación de agregados a ciertas concentraciones, pero el éster metílico de ecognina y acetato sódico no pudieron (FIG. 4).

Se realizó otro análisis espectrofotométrico de la estabilización de la cocaína, analizando la capacidad de la CocE para escindir el acetato de 4-nitrofenilo, tras la incubación previa a 37°C durante varios tiempos, en presencia de varias concentraciones de cocaína. Se encontró que la cocaína era un inhibidor de la escisión del acetato de 4-nitrofenilo a concentraciones más altas (62,5 y 125 μ M) (FIG. 5). No se descubrió que concentraciones inferiores fueran estabilizantes a 37°C. No obstante, la incubación previa de CocE a las concentraciones más altas durante varios tiempos a 37°C indicó que la enzima se estabilizaba lo bastante como para poder escindir el sustrato de 4-nitrofenilo (FIG. 5).

El análisis espectrofotométrico cinético de la estabilización con ácido benzoico, éster metílico de ecgonina y acetato sódico de CocE no reveló ninguna estabilización por debajo de 125 μM (FIG. 6). No obstante, se encontró que el ácido benzoico inhibía y estabilizaba a concentraciones más altas.

5 Para estudiar adicionalmente la estabilización de CocE con moléculas pequeñas se consideraron otros inhibidores de la reacción de escisión de CocE. El ácido fenilborónico, un inhibidor irreversible de la CocE, que pudo estabilizar la agregación de la CocE silvestre a 37°C durante 1 hora, con una concentración de estabilización al 50% de aproximadamente 0,2 μM (FIG. 7).

10 Los datos descritos anteriormente indican que la CocE silvestre podía estabilizarse mediante la adición de sustratos, productos o inhibidores de la enzima. No obstante, todas estas moléculas pequeñas inhibían la actividad enzimática hasta determinados grados. Se evaluó si podría existir una molécula pequeña que pudiera prevenir la agregación de la CocE, sin inhibir la actividad enzimática. Dicha molécula podría usarse como estabilizante *in vitro*, por ejemplo durante la preparación enzimática, e *in vivo*. Se diseñó un ensayo para cribar una biblioteca de 20.000 moléculas pequeñas para la estabilización de la CocE. En dicho ensayo, la enzima se mezcla con los compuestos en un formato de placa de 96 pocillos y después se incuba a 37°C durante una hora. Los controles para el ensayo normalmente son el diluyente del compuesto (p. ej., DMSO), enzima sin calentar y enzima mezclada con ácido benzoico 2000 μM . Tras incubar a 37°C, se analizan las mezclas de enzima/compuesto por la capacidad para escindir el acetato de 4-nitrofenilo (FIG. 8). Solo los compuestos estabilizados podrían escindirse después de este periodo de incubación.

20 Primero se analizaron cuarenta compuestos. Los compuestos se analizaron por duplicado con los controles adecuados. Se realizó una placa por duplicado (sin enzima) como control negativo para comprobar los compuestos capaces de producir un incremento de la absorbancia a 400 nm en ausencia de CocE. Se encontró que varios compuestos también aumentaban la absorbancia a 400 nm. Algunos pudieron hacerlo en ausencia de CocE. Estos se descartaron como falsos positivos.

25 La FIG. 9 es un gráfico de la velocidad inicial de la escisión del acetato de 4-nitrofenilo para todos los compuestos, después de restar la escisión "sin enzima" de fondo. Los compuestos con una actividad significativa (2 desviaciones estándar por encima de los controles con solo DMSO) están marcados con un asterisco y se muestran las estructuras químicas de dichos compuestos.

30 El compuesto más eficaz en el ensayo fue el compuesto 6031818 (FIG. 10). Dicho compuesto es un inhibidor débil de la escisión del acetato de 4-nitrofenilo (16 μM ; FIG. 10, gráfico de la izquierda) y no inhibe la escisión de la cocaína en absoluto (FIG. 10, gráfico de la derecha).

El ensayo de estabilización en presencia de concentraciones altas de la enzima indicó que la actividad enzimática comienza a descender tras 60 minutos a 37° C (FIG. 11). Después de este tiempo, 6031818 pudo estabilizar la semivida de la enzima silvestre, de forma que a 20 μM la semivida aumenta de 12 – 14 minutos a 60 - 70 minutos.

35 Otro compuesto eficaz, 6169221, tenía una estructura muy similar a 6031818. Este compuesto tampoco inhibió el acetato de 4-nitrofenilo o la escisión del sustrato de cocaína (FIG. 12). El compuesto 6169221 solo pudo estabilizar débilmente la enzima, incrementando la semivida de 7 - 12 minutos a 13 - 17 minutos.

Otro compuesto termoestabilizante es 5804238. Dicho compuesto tampoco inhibió la escisión de acetato de 4-nitrofenilo o de cocaína (FIG. 14). El 5804238 pudo estabilizar débilmente la enzima, aumentando la semivida de 9 - 10 minutos a 22 - 25 minutos (FIG. 15).

40 Ejemplo 2. Dicroísmo circular de CocE silvestre y mutante.

45 Se realizó una caracterización adicional de la estabilidad de CocE silvestre (WT) y mutantes termoestables mediante dicroísmo circular, que detecta cambios pequeños en la conformación y la estructura de las proteínas. El análisis mediante mediciones CD repetidas a temperaturas crecientes permite el análisis de la termodinámica y la temperatura de fusión (T_M) de la proteína, siempre que la fusión es reversible (es decir, la proteína retoma su conformación original después de enfriar). Por desgracia, la fusión de la CocE WT no es reversible, por lo que no se puede determinar la termodinámica verdadera. No obstante, CD sigue siendo valioso para determinar la temperatura para el desplegamiento. En estos ensayos, CocE WT (FIG. 16, arriba) se funde a aproximadamente 39° C, mientras que el T172R mutante (FIG. 16, abajo) se funde a ~42° C, lo que muestra que la termoestabilidad de este mutante conferida a 37° C se debe a una temperatura de fusión 2 - 3 grados más que la silvestre.

50 La CocE WT en presencia de exceso de ácido benzoico (FIG. 17, arriba) aumentó la temperatura de fusión de la CocE hasta 53° C, 10 grados completos más que la T172R mutante. La molécula de ácido benzoico a esta concentración era ligeramente espectroscópica y afecta a los espectros de la proteína, pero no a la fusión. El análisis de la CocE WT en presencia de ácido fenilborónico 5 molaridad (FIG. 17, abajo) aumentó la temperatura de fusión a 73 °C, es decir, más de 30 grados más que la WT y la T 172R mutante.

El análisis CD de otro mutante de la CocE, L169K, estableció una temperatura de fusión ~65° C sola y una temperatura de fusión ~85° C e presencia de ácido fenilborónico (FIG. 18), es decir, el ácido fenilborónico confirió una fusión adicional de 20°C a la ya elevada temperatura de fusión original para L169K.

5 El análisis CD de la CocE WT en presencia de 6031818 estableció una temperatura de fusión de ~42° C, similar a la de la T172R mutante.

Ejemplo 3. Análisis de la termoestabilidad de varios compuestos con CocE silvestre y mutante.

10 La CocE silvestre o la CocE mutante L169K se incubó en presencia de varias moléculas pequeñas a 37° C durante varios puntos de tiempo, después se sometió a geles no desnaturalizantes. Los resultados se muestran en la FIG. 20. Se usó densitometría puntual para analizar los geles con el fin de determinar la semivida de las enzimas CocE en estas condiciones. Véase la FIG. 21. El ácido fenilborónico fue el que más aumentó la semivida de la CocE, seguido de ácido benzoico. El compuesto 6041818 aumentó la semivida de la enzima silvestre en aproximadamente un 50%.

Ejemplo 4. Identificación de mutantes termoestables de CocE mediante análisis basado en la estructura.

Resumen de ejemplo

15 A pesar de los avances en el desarrollo de terapéuticas dirigidas al transportador de dopamina, la identificación de terapéuticas que combaten el abuso y la sobredosis de cocaína ha sido menos fructífera. Abordajes más clásicos al desarrollo terapéutico contra el abuso y la sobredosis de cocaína tienen desafíos inherentes en cuanto a que los inhibidores competitivos y alostéricos de la unión de la cocaína al transportador exhiben efectos conductuales similares a los de la cocaína: inhibición de la captación de dopamina. El uso de la cocaína esterasa se ha desarrollado como terapia protectora contra la letalidad inducida por cocaína. La aceleración de la digestión mediada por enzimas de la cocaína sistémica mediante la adición de cocaína esterasa exógena representa un cambio de paradigma significativo en la terapia del abuso de cocaína. En el presente documento, se notifica el diseño y la generación de preparaciones enzimáticas significativamente más estables usando abordajes computacionales. Se proporcionan pruebas de estudios *in vitro* e *in vivo* que indican que la enzima modificada muestra una semivida prolongada (hasta 30 veces más) y mejor termoestabilidad que la enzima silvestre. Además, se han obtenidos pruebas de cristalografía de rayos x que proporcionan un fundamento estructural para la mejor estabilidad enzimática.

Introducción

30 Se utilizaron abordajes basados en la estructura y computacionales para generar mutantes de CocE con mayor estabilidad a 37° C. Se usaron la estructura cristalina de CocE (Larsen et al., 2002) y una combinación de modelación molecular, minimizaciones de energía y simulaciones de dinámica molecular (MD) con el programa RosettaDesign (Kirjegan et al., 2005; Kuhlman and Baker, 2000) y el programa AMBER (Case et al., 2004). Los mutantes expresados y purificados se evaluaron para determinar su estabilidad intrínseca mejorada usando ensayos *in vitro*. Es importante el hecho de que tres de 36 sustituciones predichas exhibían una mejora espectacular de la semivida de la enzima evaluada por ensayos *in vitro* y mediante la protección *in vivo* contra la letalidad inducida por cocaína. Las estructuras cristalinas de rayos X de estas mutantes se determinaron para investigar su base estructural para una estabilidad térmica mejorada. En cada caso, las sustituciones aumentan los contactos entre dominios de la enzima. La mejora espectacular de la estabilidad de la CocE mutante *in vivo* ilustra la promesa de tanto este enfoque experimental como el uso de CocE en el abuso y la adición a la cocaína.

40 Materiales y procedimientos

Materiales La cocaína se adquirió en Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO. Todos los demás reactivos son de grado analítico y se obtuvieron en Fisher Biosciences and Sigma-Aldrich Corp.

45 Diseño de mutaciones termoestables. En base a la estructura cristalina de rayos X (código PDB 1JU3) de la cocaína esterasa bacteriana (cocE) (Larson et al., 2002), se construyó un modelo 3D completo de CocE unida a (-)cocaína usando minimizaciones energéticas y simulaciones de la dinámica molecular (MD) cargados con el programa AMBER (Case et al., 2004). Para aumentar la termoestabilidad de la CocE se usó un método computacional implementado en el programa RosettaDesign (Kuhlman and Baker, 2000), que pudo predecir mutaciones termoestabilizantes dentro de un plegamiento dado al tiempo que se minimiza cualquier desplazamiento en la estructura que podría alterar estructuralmente la estructura del sitio activo o inactivar su flexibilidad. El método implementado en el programa RosettaDesign usa una función de energía para evaluar la idoneidad de una secuencia concreta para un pliegue dado y un algoritmo de búsqueda Monte Carlo para el muestreo de espacios de la secuencia. Otros investigadores han usado con éxito el mismo método para aumentar la termoestabilidad de una enzima sin reducción de la eficiencia catalítica (Korkegian et al., 2005; Kuhlman and Baker, 2000). La modelización computacional usando el programa RosettaDesign ha permitido la predicción de un conjunto de mutaciones que potencialmente pueden disminuir la energía y, por tanto, aumentar la mayor termoestabilidad de la CocE. Como primera ronda del diseño racional, la computación se simplificó considerando únicamente las posibles mutaciones en los residuos de aminoácidos que tienen una distancia de 6 - 25 Å desde la cocaína.

Mutagénesis dirigida a sitio. Se generaron mutaciones puntuales usando ADNc de CocE clonado en el vector de expresión bacteriana pET-22b(+) como molde usando un protocolo de mutagénesis modificado QuickChange (Stratagene) y cebadores de un solo oligonucleótido. Para la generación de dobles mutantes se usaron ADNc con mutaciones puntuales sencillas como moldes para una segunda ronda de mutagénesis. Todos los mutantes se secuenciaron en ambas direcciones en la totalidad de la región de codificación. Los mutantes de CocE y silvestre se expresaron como proteínas marcadas con 6 His en su extremo C en células de *E. coli* BL-21 Gold (DE3) cultivadas a 37° C. La expresión de proteínas se indujo con isopropil- β -tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG, Fisher) durante 12 horas a 18° C.

Purificación de la cocaína esterasa y mutantes. Las células se sedimentaron, resuspendieron en Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM con inhibidores de la proteasa (3 μ g/ml de cada uno de leupeptina e inhibidor de la tripsina de soja o de garrofón) y se lisaron usando una prensa francesa (Thermo Fisher Scientific Corp, EE.UU.). La CocE silvestre o mutante se enriqueció usando cromatografía por afinidad de metales Talon (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View CA), se purificó usando cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose, GE Healthcare, Piscataway NJ) La CocE se eluyó de la columna Q-Sepharose con tampones en gradiente lineal de NaCl 150 - 450 mM que contienen Hepes 20 mM, pH 8,0, MgCl₂ 2 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 Mm. Las fracciones máximas se combinaron y concentraron mediante Centricon-30 (Millipore), se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C.

Cinética de Michaelis-Menten de la hidrólisis de la cocaína Se usó un ensayo espectrofotométrico en tiempo real de la hidrólisis de cocaína para monitorizar la hidrólisis de cocaína (Landry et al., 1993). Las velocidades iniciales (de la degradación) se determinaron siguiendo el cambio en la absorbancia intrínseca de la cocaína a 240 nm (6700 M⁻¹ cm⁻¹) (Xie et al., 1999) usando un lector de placas SpectraMax Plus 384 UV (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) usando el software SOFTmax Pro (Versión 3.1.2). La reacción se inició añadiendo 100 μ l de una solución enzimática 2X (tampón fosfato 100 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM) hasta 100 μ l de una solución de cocaína 2X (50 μ g/ml de enzima, tampón fosfato 100 mM, pH 7,4 y NaCl 300 mM). Todos los ensayos se realizaron con DTT 100 μ M a menos que se indique lo contrario. Las concentraciones finales de cocaína fueron las siguientes: 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81, 3,91, 1,95 y 0,977 μ M. Los valores de V_{max} y K_{in} se calcularon usando Prism (GraphPad Software, San Diego). Para las mediciones de estabilidad, las enzimas silvestre y mutantes se diluyeron a una concentración 2 X y se incubaron a 37° C para los tiempos indicados. Al final de cada punto de tiempo se retiró un alícuota y se observó la cinética como se ha indicado anteriormente.

Protección in vivo contra la letalidad de la cocaína. Ratones NIH-Swiss macho (25 - 32 g) se obtuvieron de Harlan Inc. (Indianápolis, IN) y se alojaron en grupos de 6 ratones por jaula. Se dejó que todos los ratones tuvieran acceso *ad libitum* a alimentos y agua y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de oscuridad-luz, con luces encendidas a las 6:30 de la mañana y la temperatura se mantuvo a 21 - 22°C. Se realizaron experimentos de acuerdo con la Guía Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the National Institutes of Health. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el University Committee on the Use and Care of Animals at the University of Michigan.

La toxicidad inducida por cocaína se caracterizó por la aparición de letalidad, definida como el cese de movimientos y respiración observados. Se introdujeron a los ratones individualmente en cámaras de observación de plexiglás (16 x 28 x 20 cm de altura) para su habituación durante 15 minutos antes de la administración del fármaco. Tras la administración intraperitoneal (i.p.) de cocaína, se introdujo al ratón individualmente en la misma cámara para su observación. La presencia o ausencia de letalidad se registró durante 60 minutos tras la administración de cocaína. Se introdujo al ratón en una cámara de restricción pequeña (diámetro del tubo externo: 30 mm; diámetro del tubo interno: 24 mm) que dejaba la cola expuesta. La cola se limpió con un paño con alcohol y se insertó una aguja deslizante de precisión de 30G1/2 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) en una de las venas laterales para una infusión. El volumen de inyección i.v. de CocE o CocE mutante fue de 0,2 ml por ratón. Se aplicaron una gasa estéril y presión en el sitio de la inyección para contener la hemorragia.

La potencia de las CocE mutante para proteger contra la toxicidad inducida por cocaína se evaluó tras la administración i.v. de la enzima (0,3 o 1 mg) 1 min antes de la administración de varias dosis de cocaína i.p. (180, 320, 560, y1000 mg/kg, n=8/dosis). Las curvas de respuesta a la dosis de la letalidad inducida por cocaína en ausencia o presencia de una única dosis de la enzima se determinaron para demostrar los efectos protectores *in vivo* de CocE mutantes.

La duración de la protección contra la toxicidad de la cocaína proporcionada por CocE y CocE mutantes se evaluó a través de la monitorización de la letalidad tras la administración i.v. de la enzima (0,1, 0,3, y1 mg) antes de la administración i.p. de cocaína (DL₁₀₀, 180 mg/kg). La letalidad se monitorizó tras la inyección a 1, 5, 10, o 30 min, o tras 1, 2, 3, 4, 5 horas de la administración de la enzima. Cada tratamiento usó 8 ratones para evaluar el porcentaje de letalidad (es decir, protección) en ratones tratados previamente con una única dosis de una esterasa en un único punto de tiempo.

En el estudio de potencia, se calculó un valor de la DL₅₀ del grupo mediante regresión por mínimos cuadrados usando la porción de la curva de respuesta a la dosis que abarca el 50% de aparición de letalidad. Estos valores se usaron para comparar el grado de desplazamientos a la derecha de la curva de respuesta a la dosis de la cocaína

en ausencia o presencia de pretratamiento enzimático. En el tiempo del estudio, un punto de tiempo para la duración de la protección (es decir, 50% de letalidad) se estimó usando cada curva de cada curso de tiempo que cruza el 50% de la aparición de letalidad.

5 El hidrocloreuro de cocaína (Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO) se disolvió en agua estéril y se administró por vía intraperitoneal a un volumen de 0,01 ml/g. CocE o CocE mutante se diluyeron hasta diferentes concentraciones en solución salina tamponada con fosfato y se administraron por vía intravenosa a un volumen de 0,2 ml/ratón.

10 Cristalización y determinación de la estructura. Los cristales se sembraron mediante el método de difusión por vapor o gota colgante como se ha descrito anteriormente (Larsen et al., 2002). Para la recolección, a cada gota pendiente se añadieron 2 μ l de crioprotector (Tris 5 mM a pH 7,0, sulfato amónico 1,5 M, HEPES 10 mM a pH 7,5, $MgCl_2$ 2 mM, EDTA 1 mM, NaCl 825 mM, 25 % de glicerol y DTT 1 mM cuando esté indicado) y, después, los cristales se transfirieron a 100% de crioprotector y se congelaron de forma ultrarrápida en nitrógeno líquido. Los cristales se recolectaron en 3 días tras el establecimiento de la bandeja.

15 Las intensidades de la difracción se recogieron en el Advanced Photon Source con haces soportados por GM/CA- y LS-CAT y después se redujeron y escalaron usando HKL2000 (Otwinowski et al., 1997). Las fases iniciales procedían de una sustitución molecular directa usando estructuras publicadas anteriormente de CocE (Larsen et al., 2002). Se usó REFMAC5 para el refinado de la probabilidad máxima y la generación de modelo y la adición de agua se realizó con O y COOT. Para todas las cadenas laterales mutadas había una densidad no ambigua. Se recogieron veintitrés conjuntos de datos totales con múltiples conjuntos de datos para cada tipo de cristal, por lo que podría compararse el comportamiento del bucle H2-H3. Las figuras se generaron con PyMol [<http://www.pymol.org>]. Las coordenadas y los factores de la estructura se depositan en el PDB con los códigos de acceso 2QAY (T172R), 2QAX (G173Q), 2QAW (T172R/G173Q), 2QAV (L169K), 2QAT (silvestre sin ligando) y 2QAU (silvestre con el aducto DTT).

Resultados

25 Diseño de mutaciones termoestables. La cocaína esterasa contiene tres dominios distintos. El dominio I (residuos 1 - 144 y 241 - 354) componen el pliegue canónico de la α/β -hidrolasa canónica. El dominio II (residuos 145 - 240) es una serie de 7 hélices α entre las hebras $\beta 6$ - $\beta 7$ del dominio I. El dominio III (355 - 574) consiste principalmente en láminas β y comprende una topología de tipo rodillo gelatinoso global (FIG. 22A). Se realizaron estudios computacionales, incluyendo simulación MD y el posterior análisis energético para identificar las sustituciones dentro de la cubierta de 6-25 Å que rodea al sitio activo que estabilizaría la CocE. Este diseño basado en la estructura y el mecanismo de las CocE mutantes combinó el uso de minimizaciones de la energía y simulaciones MD usando AMBER (Case et al., 2004) y estudios de modelización adicionales usando el programa Rosetta Design (Kuhlman and Baker, 2000). Aunque la CocE es un dímero en solución y en cristales, la modelización se realizó con un monómero. Los datos resumidos en la Tabla 1 sugieren que las siguientes mutaciones podrían estabilizar termodinámicamente la estructura de la CocE.: R41I, N42V, K46A, S56G, T74S, F84Y, L119A, V121D, T122A, Q123E, S140A, L146P, A149S, Y152H, S159A, L163V, V160A, S167A, T172R, G173Q, F189L, A193D, A194R, I218L, W220A, V225I, T254R, V262L, S265A, W285T, A310D, C477T, L508G, K531A, Y532F, y D533S. Las posiciones de las mutaciones sobre la estructura de la CocE se muestran en la FIG. 22A. Cada una de estas mutaciones únicas se ha predicho que estabilizan la estructura de la CocE en 2,1 a 4,5 kcal/mol, lo que sugiere que el tiempo de semivida de la proteína debería ser de aproximadamente 30 a 1000 veces más largo a temperatura ambiente (Tabla 1). Para comprobar estas predicciones, los ADNc que codifican las mutaciones en CocE se expresaron en *E. coli* y las proteínas resultantes se caracterizaron mediante ensayos cinéticos y de estabilidad. De los 36 mutantes analizados, tres mutaciones agrupadas alrededor de la hélice 2 del dominio II parecieron mejorar la estabilidad de la enzima a 37°C sin una reducción significativa de la eficiencia catalítica, como se describe más adelante.

45 Tabla 1. CocE mutante que muestra una estabilidad potenciada tras la incubación a 37°C. Los $T_{1/2}$ se determinaron mediante preincubación de la enzima a 37°C para tiempos variables. Las mediciones de la actividad se determinaron a temperatura ambiente (25 °C). Las enzimas mutantes con $T_{1/2}$ de 12 minutos (es decir, los $T_{1/2}$ de la CocE silvestre [wt] o menos se consideraron no térmicamente estables. Esta tabla también se encuentra en el documento WO/2008/008358.

Mutante	Estabilidad a 37 ($t_{1/2}$)
T122A	No
Q123E	No
S159A	No

ES 2 510 551 T3

Mutante	Estabilidad a 37 (t _{1/2})
S140A	No
S167A/W52L	No
T172R	~46 min
V121D	No
L163V	No
F189A	No
F189A/T172R	~40 min (similar a T172R)
C107S	No
W220A	No
F189L	No
A193D	No
T172R/A193D	~40 min (a T172R)
G173Q	~25 min
T254R	No
N42V	No
<i>T172R/G173Q</i>	<i>~ 326 min</i>
G171Q/T172R/G173Q	No
G171A	No
G173A	No
wt-I175-G-D185	No
wt-T176-G-G-D185	No
T172R/G173Q-I175-G-D185	
T172R/G173Q-1175-G-G-A186	~75 min
T172R/G173Q-T176-G-G-D185	~75 min
S177Q	No
D45R	No
F47R	No

Mutante	Estabilidad a 37 ($t_{1/2}$)
L169K	~ 274 min
L174R	No
A181K	No
S179R	No
F189K	25 min
V190K	No
A194K	No
R182K	No

5 Ensayos de cinética *in vitro*. Para evaluar la actividad enzimática de las CocE silvestre y mutante, la hidrólisis de la cocaína se midió directamente a 37 °C usando un ensayo espectrofotométrico (Xie et al., 1999). Después se usaron las velocidades iniciales para determinar los parámetros de Michaelis-Menten. Para evaluar la estabilidad térmica, las preparaciones enzimáticas se preincubaron a 37°C para varios periodos de tiempo, antes de la medición de las actividades residuales (Tabla 1 y FIG. 23). La inactivación a 37° C se produce en una degradación dependiente del tiempo. En ausencia de DTT, la preincubación de la CocE silvestre a 37° C disminuye la actividad enzimática exponencialmente con una semivida de inactivación T_{inact} . de aproximadamente 25 minutos. Tres de 36 de los mutantes predichos aumentaron la estabilidad enzimática de CocE. T172R (T_{inact} = 46 min), G173Q (T_{inact} = 35 min; datos no mostrados) y L169K (T_{inact} ~ 274 min). Mientras que los mutantes T172R y G173Q no parecían afectar de forma perjudicial a la eficiencia catalítica de la enzima (k_{cat} ~ 1×10^8 y 2×10^8 , respectivamente), la k_{cat} de L169K de redujo, en gran medida como resultado del incremento ~5 veces en su K_m por la cocaína esterasa (Tabla 2). Es interesante el hecho de que los mutantes que parecen mostrar una estabilidad significativa a 37°C, todos residen en la hélice 2 del dominio II (FIG. 22B). El dominio II también se localiza en el sitio activo y puede, al menos en el caso de L169K, justificar los efectos en la k_{cat} . También es destacable la observación de que la incubación de la enzima con DTT parece acelerar el deterioro para la enzima silvestre, pero no para T172R/G173Q y L169K (FIG. 24). También se determinó que DTT puede inhibir la hidrólisis de la cocaína con una K_i ~ 380 μ M (FIG. 25) de un modo que parece mezclar las formas competitivas y no competitivas (no mostrado). No se observaron efectos de DTT cuando se combinan las mutaciones parece potenciar adicionalmente la estabilidad de la enzima a 37° C (no mostrado).

15 Tabla 2. Comportamiento cinético de las CocE silvestre y mutantes rediseñadas. El metabolismo de la cocaína mediante preparaciones purificadas de wt-CocE, T172R, T172R/G173Q o L169K se midió como se describe en la sección Métodos. La constante de Michaelis K_M y la K_{cat} se estimaron usando Prism (Graphpad, San Diego, CA).

Enzima	$t_{1/2}$ (min)	K_{cat} ($\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)	K_m (M)	Eficiencia catalítica $K_{cat}/K_m(\text{s}^{-1})$
wt-CocE	12,2	2323	0,021	1,11 E+08
T172R	46,8	2502	0,024	1,05 E+08
T 172R/G 173Q	326	2247	0,024	9,40 E+07
L169K	274	3104	0,105	2,90 E+07

25 La actividad de T172R/ G173Q, sensibles a la incubación a 37°C, muestra una estabilidad potenciada y se deteriora a T_{inact} ~ 326 min. No obstante, la actividad catalítica observada alcanza una meseta a aproximadamente el 35% de su velocidad catalítica máxima (es decir, a $t = 10$ horas). Este perfil de inactivación fue diferente cualitativa y cuantitativamente del comportamiento de los mutantes sencillos T172R y G173Q y de wt-CocE, pero similar al de

L169K. Sorprendentemente, la mutante triple (L169K/G173Q/T172R) no mostró una estabilización potenciada (datos no mostrados).

Para analizar su la estabilidad enzimática mejorada a 37° C representa mejor estabilidad térmica del plegamiento proteico, se evaluó la capacidad de la CocE a temperaturas progresivamente más altas (FIG. 26). La actividad de wt CocE se desploma precipitadamente tras 30 minutos a aproximadamente 30 - 35° C. Tanto L169K como T172R/G173Q se inactivan a una temperatura más alta (40 - 45° C). El análisis de diroísmo circular (análisis en el UV cercano) a temperaturas variables compara wt-CocE y T172R/G173Q que tienen temperaturas de fusión de acuerdo con la pérdida de actividad catalítica.

Ensayos *in vivo*. El pretratamiento con wt-CocE, L169K, T 172R, o T172R-G173Q 1 minuto antes de la administración de cocaína protegió a los ratones contra la letalidad inducida por cocaína (FIG. 27). La protección enzimática (a 0,3 mg, o 9 mg/kg) alteró el valor de la DL₅₀ de la cocaína de 100 mg/kg, para el grupo tratado con vehículo, hasta 560 y 670 mg/kg para wt-CocE, T172R, o T172R-G173Q (FIG. 28). L169K fue ligeramente menos eficaz y requirió dosis más grandes (1 mg, o 30 mg/kg) para producir un desplazamiento a la derecha similar de 6 - 7 veces en la curva de la respuesta a la dosis de cocaína, consistente con la menor eficiencia catalítica observada en los ensayos *in vitro*.

Aunque el pretratamiento (mayor de 30 minutos) con dosis bajas de cualquiera de las enzimas (0,1 mg) fue ineficaz contra los efectos letales de la cocaína, dosis más altas (0,3 mg y 1 mg) parecieron ser eficaces, cuyas duraciones dependían de la mutación (FIG. 28 y resumido en la FIG. 29). A las dosis más altas analizadas (1 mg), el tiempo de pretratamiento enzimático necesario para proteger la letalidad del 50%, TL₅₀, para wt-CocE fue de aproximadamente 14 minutos. Se observaron TL₅₀ considerablemente más largos para T172R (TL₅₀~1,8 h), L169K (TL₅₀~3,3 h) y T172R-G173Q (TL₅₀~4,5 h), consistente con los datos *in vitro*.

Análisis estructural de los mutantes estabilizantes. Se determinaron las estructuras cristalinas de rayos de alta resolución de wt-CocE (1,5Å), así como lis mutantes termoestables L169K (1,6 Å), T172R (2,0 Å), G173Q (2,5 Å), y T172R/G173Q (2,0 Å). En la FIG. 30 se resumen algunos de los resultados. La delineación de la estructura de la wt-CocE sin ligar no se ha notificado anteriormente y fue necesaria para la comparación en el estudio de los inventores.

Las estructuras de L169K, T172R, G173Q, y T172R/G173Q todas ellas muestran una densidad bien ordenada para sus cadenas laterales mutadas (FIG. 31). En cada caso, las sustituciones parecen aumentar le número de contactos/área de superficie enterrada entre los dominios de CocE. La elongación de la cadena alquilo del grupo lateral y la adición del resto de guanidinio a través de la sustitución de arginina en T172R genera tanto contactos de van der Waals con el anillo aromático de F189 en la hélice H3 como puentes de hidrógeno entre el resto de guanidinio y el oxígeno de la estructura de F189 (FIG. 31A, B). La cadena lateral de guanidino también se empaqueta contra la cadena lateral 1205 donada por la subunidad relacionada con el dímero. La cadena lateral de G173Q forma un transdominio de puente de hidrógeno con el carbonilo estructural de P43 en el dominio I y contactos de van der Waals con Y44, cuyo hidroxilo contribuye al orificio para el oxianión del sitio activo (FIG. 31C,D). La sustitución L169K también forma contactos con el anillo fenilo de Y44 en el dominio I (FIG. 31E,F). La cadena lateral más larga de lisina podría afectar al sitio de unión del anillo de tropano de la cocaína, lo que quizá justifique la K_m más alta exhibida por este mutante.

En estructuras notificadas previamente (1JU3 y 1JU4) y en las de los inventores, los inventores observaron múltiples conformaciones distintas para una región que abarca el extremo C de H2 y el bucle H2-H3 (residuos 171 - 183, como se ilustra en la FIG. 32). Estas dos conformaciones están, probablemente, en equilibrio en solución, pero la población de estos dos estados parece estar afectada por las mutaciones en H2. Dado que los mutantes estabilizantes se encuentran en la hélice H2, se postuló la hipótesis de que los mutantes pueden ayudar a reducir la flexibilidad conformacional de esta región y, por tanto, proteger térmicamente al plegamiento de la enzima. Para este análisis, la conformación "out" de esta región se definió como la tipificada por la estructura cristalina del aducto de ácido fenilborónico 1JU3, en la que esta región se dobla alejándose de las hélices H5-H6 del dominio I en hasta 3,3 Å en comparación con la conformación "in", triplicada por la estructura cristalina del ácido benzoico 1JU4. También se observó una tercera conformación de esta región bucle, que es similar a la de 1JU4 a excepción de los residuos 178 - 181 tienen una conformación única.

La flexibilidad global aparente de H2-H3 requiere distintas conformaciones de la cadena lateral dentro de cada hélice. Por ejemplo, en la conformación "out", 1175 se mueve hacia H3, forzando F189 hacia fuera de la interfaz hidrofóbica entre H2 y H3, mientras que la conformación "in" permite que F189 esté fuera o dentro de esta interfaz.

La estructura del mutante T172R revela una tendencia de F189 a adoptar una posición "out" a través de los contactos estrechos de las cadenas laterales de R172 y F189, una tendencia que es más prevalente en el mutante T172R/G173Q. Estos datos sugerirían que el cierre de la conformación planar de F189 puede contribuir a los efectos estabilizantes térmicos de la sustitución T172R. La sustitución de alanina por fenilalanina en 189 no revela ninguna potenciación o disminución de la estabilidad térmica en el T172R o el básico silvestre. Por tanto, las interacciones de R172 con la hélice H3 o quizá con la subunidad relacionada con el dímero parecen responsables de la potenciación de la estabilidad.

Formación de un aducto DTT-carbonato en el sitio activo de CocE. La complicación de estos estudios fue una densidad excepcionalmente fuerte en el sitio activo que parecía corresponder a un aducto covalente con la serina catalítica de CocE (Ser1 17). Dicha densidad no se notificó previamente (FIG. 33) (Larsen et al., 2002). La densidad de electrones correspondió a un anillo de cinco miembros con dos ramas sustituyentes. Mapas de Fourier con diferencias anómalas conformaron la presencia de azufre en cada una de las ramas y mapas de omisión $2F_o-F_c$ contorneados a niveles diferentes identificaron los átomos de oxígeno en el aducto (FIG. 33). Por tanto, se concluyó que la densidad corresponde a DTT, que se incluyó en las soluciones de cristalización y de recolección (a 10mM), que se hicieron reaccionar con bicarbonato en el sitio activo. El anillo de 2-oxo-dioxolano parece atrapado como un complejo de extremo muerto del intermedio tetraédrico con uno de los oxígenos tetraédricos ocupando el orificio del oxianión que forma el aducto, carbonato de 2-oxo-dioxolano butirilo o DBC. En la estructura de resolución más alta (L169K), el carbono supuestamente donado por el carbonato en el anillo dioxolano está a $\sim 1,6$ Å (la distancia no se restringió en el refinado de las estructuras de la resolución alta) desde el γ -oxígeno S117, el oxígeno en el orificio del oxianión y a 1,4 - 1,5 Å del oxígeno en el orificio del oxianión y los dos átomos de oxígeno donados por el DTT, muy consistente con los enlaces covalentes. La densidad de electrones de este carbono tetraédrico es más débil que la de los demás carbonos en el ligando DTT, lo que sugiere retirada de electrones. El aducto de 2-oxo-dioxolano adopta una conformación similar a la del aducto de 2-fenilboronato con CocE (Larsen et al., 2002), a excepción de que el centro tetraédrico está rotado.

Para confirmar que la formación de este complejo de aductos no era una consecuencia de los mutantes estabilizantes de los inventores, la estructura de la wt-CocE se determinó en presencia y ausencia de DTT, y las estructuras de los mutantes estabilizantes de CocE también se determinaron en ausencia de DTT. En todos los casos en los que DTT se cocrystalizó con CocE, se observó el aducto y la posición del inserto H2-H3 era esencialmente la misma con o sin DTT. En las condiciones *in vitro* analizadas en el presente documento, es decir tiempos de incubación relativamente cortos con DTT (<60 min), DTT inhibe la actividad de CocE competitivamente con el sustrato. Obsérvese que las condiciones de cultivo de los cristales son considerablemente diferentes con tiempos de incubación de días a semanas, una escala de tiempo que podría permitir de forma concebible la formación del aducto DBC. La formación de aductos también mostraría patrones de inhibición marcadamente diferentes y aparece como inhibidor no competitivo. Los cristales cultivados sin DTT o cultivados con DTT y empapados después en el análogo de la cocaína atropina que parecían desplazar el aducto, mostraron en su lugar una molécula de agua cerca de S117 y factores B altos para los residuos del sitio activo, incluyendo S 117 y H287 de la tríada catalítica.

Discusión

Hasta la fecha, la CocE es el catalizador más eficiente para la hidrólisis de la cocaína y para disminuir los niveles de cocaína *in vivo* y proteger contra la letalidad inducida por cocaína en ratones y ratas (Turner et al., 2002; Ko et al., 2007; Cooper et al., 2006; Garrera et al., 2005; Gasior et al., 2000; Daniels et al., 2006; documento WO/2008/08358). La eficacia de este "antídoto" para la toxicidad de la cocaína en roedores indica que la CocE es una potencial terapéutica en seres humanos. No obstante, wt-CocE muestra una inestabilidad considerable dado que su semivida eficaz en la corriente sanguínea es ~ 10 min. En comparación, el BchE tetramérico permanece en el plasma de ratones durante 16 horas y activo durante hasta 7 horas después de la inyección (Duysen et al., 2002), mientras que el Ab anti-cocaína permanece en la circulación del ratón durante 8,1 días (Norman et al., 2007). Incluso así, el potencial clínico de wt-CocE sugiere que su duración de la protección es, probablemente, suficiente en los casos de sobredosis aguda, tales como los debidos a inhalación o inyección (Landry et al., 1993).

En los casos que implican sobredosis masivas, como es el caso para las "mulas de cocaína", en los que se liberarán cantidades grandes de cocaína en la circulación sanguínea durante un largo periodo de tiempo, se desea una CocE de acción más prolongada. La corta semivida en plasma eficaz de CocE representa, por consiguiente, un obstáculo principal en el desarrollo de esta terapéutica basada en proteínas para el tratamiento agudo de la letalidad inducida por cocaína y para el tratamiento crónico del abuso de cocaína.

En el presente documento, se proporcionan datos *in vitro* que demuestran que la semivida relativamente corta *in vivo* puede ser un resultado de la inactivación térmica de la CocE observada fácilmente *in vitro*. La sensibilidad térmica de CocE puede reflejar el hecho de que *Rhodococcus sp.*, el microorganismo del que se aisló CocE, crece en el suelo debajo de las plantas de coca a temperaturas moderadas de aproximadamente 20° C (Mackay, 1886; Martin, 1952), mucho menor que la temperatura corporal en roedores (37 - 38° C).

De los 36 mutantes predichos por ordenador, tres mutaciones mostraron una estabilidad térmica potenciada. Una serie de mutantes no eran estables y no se pudieron sobre expresar y purificar como enzima funcional (Tabla 1). Combinando dos de los mutantes puntuales termoestables se creó una mutante bastante termoestable de ose, G173Q/T172R, que extiende la T_{inact} *in vitro* a 37° C desde 10 minutos a 4 - 1/2 horas o aproximadamente por 27. El análisis *in vivo* de los mutantes en roedores, como una función de su capacidad para proteger contra la letalidad aguda inducida por cocaína, concordaban con los ensayos *in vitro*.

Los resultados de los estudios de modelización computacional fueron sorprendentes en cuanto a que se identificaron varios mutantes estables en una enzima de 574 residuos de aminoácidos. Por desgracia, la resolución de estos métodos no fue suficiente para dilucidar el mecanismo preciso subyacente a los efectos termoestabilizantes de los

mutantes. En combinación con cristalografía en rayos X, fue posible determinar un modelo razonable para representar la estabilidad potenciada en una resolución atómica. En general, la sustitución de residuos más grandes o cargados, tales como glutamina (por glicina), lisina (por leucina) o arginina (por treonina), ayudó a estabilizar las interacciones dominio-dominio. El dominio más térmicamente estable en la enzima se identificó como Dominio II, que contiene las hélices H2 y H3.

La localización de las sustituciones térmicamente estables en las hélices H2 - H3 y la heterogeneidad estructural del propio bucle H2-H3 sugieren que la región helical H2-H3 es inherentemente inestable y, en último término, puede nuclear o al menos contribuir considerablemente a la agregación o desplegamiento de la CocE. Los ortólogos de CocE de *Listeria* y *Pseudomonas sp.*, ambas capaces de sobrevivir a 37°C, tienen hélices H2 y H3 significativamente más cortas y, por tanto, un dominio 2 potencialmente más estable (códigos de acceso en Genbank ZP 01928677 y YP 660510, respectivamente). El truncamiento o eliminación completa del bucle entre las hélices H2 y H3 en CocE, inactivó la enzima (véase la Tabla 1).

La presencia del aducto DTT-carbonato en el sitio activo de CocE está aparentemente catalizado por la enzima. Otros carbonatos, tales como carbonato de propileno (4-metil-2-oxo-1,3-dioxolano), se ha notificado que se descomponen en propilenglicol y CO₂ en agua. Por tanto, se puede concebir la síntesis inversa desde DTT, un diol vecino, y CO₂. El aducto de DTT parece estar unido covalentemente al S117 catalítico gran parte globalmente como el ácido fenilborónico (Larsen et al., 2002), aunque su longitud de unión de 1,6 Å (frente a la distancia prevista de ~1,43 Å) sugiere un carácter covalente parcial. El plano del anillo dioxolano de DBC solapa con el plano del anillo fenilo de las formas de CocE unidas por ácido fenilborónico y ácido benzoico (Larsen et al., 2002). Dado que la conformación de los residuos del sitio activo de wt-CocE unido a DBC difiere muy poco de la forma unida al ácido fenilborónico, es posible que el aducto no se observe en la estructura cristalina por Larson et al. (2002) debido a la unión mutuamente excluyente de ácido benzoico o boronato de fenilo.

La estructura cristalina de CocE sugiere que la enzima existe como dímero, y los estudios preliminares sugieren que el dímero es lo bastante estable a concentraciones bajas para su resolución mediante filtración en gel, aunque el tratamiento previo a 37 °C induce agregación proteica y elusión de una columna de exclusión por tamaño en el vacío de la columna. Es interesante el hecho de que el análisis cuidadoso de la cinética de activación de T172R/G173Q y L169K revela que la actividad disminuye exponencialmente en la primera fase de la actividad, pero parece alcanzar una meseta a aproximadamente un 35% de su actividad máxima. Esta actividad permanece incluso después de más de 8 horas, en contraste con wt-CocE, G 173Q y T 172R, en las que la actividad decae a menos del 10% de la actividad en 90 minutos. Una posible explicación de esta conducta (de T172R/G173Q y L169K) es que sigue quedando una porción térmicamente sensible de la enzima que no produce una inactivación completa de la enzima. La región térmicamente sensible se puede localizar en la interfaz del dímero, cuya alteración podría conducir a agregación. Los datos de cromatografía por filtración en gel mencionados anteriormente coincidirían con esta idea. De hecho, otros estudios y la caracterización de mutantes adicionales dentro de la interfaz del dímero están en marcha.

Quizá el efecto más espectacular de las mutaciones se revela por su capacidad *in vivo* para proteger contra la letalidad inducida por cocaína. El efecto de las mutaciones equivalía a los datos *in vitro* de los inventores prolongando la duración del pretratamiento que la enzima es capaz de aguantar. EN el caso de T172R/G173Q, la duración del pretratamiento en el que la enzima seguía siendo capaz de proteger contra la letalidad inducida por cocaína en un 50% se prolongó en más de 20 veces o hasta 4,5 horas. Esto sugiere fuertemente que la causa de la inestabilidad *in vivo* de CocE es la misma que la observada para la enzima *in vitro*.

En resumen, el presente trabajo muestra que un abordaje de varias ramas que combina análisis computacionales, bioquímicos y estructurales se puede usar para desarrollar racionalmente variantes de CocE que son significativamente más estables que la enzima nativa.

Ejemplo 5. Mutante de CocE L169K/G173Q

Se creó un mutante de CocE, L169K/G173Q y se caracterizó del siguiente modo.

Diseño de mutaciones termoestables. En base a la estructura cristalina de rayos X (código PDB 1JU3) de la cocaína esterasa bacteriana (CocE) (Larsen et al., 2002), se construyó un modelo 3D completo de CocE unida a (-)cocaína usando minimizaciones energéticas y simulaciones de la dinámica molecular (MD) cargados con el programa AMBER (Case et al., 2004) (véase el Ejemplo 4 anterior). Para aumentar la estabilidad térmica de CocE se usó un método computacional implementado en el programa RosettaDesign (Kuhlman and Baker, 2000; Korkegian et al., 2005). Este método pudo predecir las mutaciones termoestabilizantes dentro de un plegamiento dado al tiempo que se minimiza cualquier desplazamiento en la estructura que podría alterar estructuralmente la estructura del sitio o inactivar su flexibilidad. El método implementado en el programa RosettaDesign usa una función de energía para evaluar la idoneidad de una secuencia concreta para un pliegue dado y un algoritmo de búsqueda Monte Carlo para el muestreo de espacios de la secuencia. Otros investigadores han usado con éxito el mismo método para aumentar la termoestabilidad de una enzima sin reducción de la eficiencia catalítica (Kuhlman and Baker, 2000; Korkegian et al., 2005). La modelización computacional usando el programa RosettaDesign ha permitido la predicción de un conjunto de mutaciones que potencialmente pueden disminuir la energía y, por tanto, aumentar la mayor

termoestabilidad de la CocE. Como primera ronda del diseño racional, la computación se simplificó considerando únicamente las posibles mutaciones en los residuos de aminoácidos que tienen una distancia de 6 - 25 Å desde el sitio catalítico.

5 Mutagénesis dirigida a sitio. Se introdujeron mutaciones puntuales en las posiciones 169 y 173 en el ADNc de la CocE clonado en el vector de expresión bacteriana pET-22b(+). Se generaron mutaciones usando un protocolo de mutagénesis modificado QuickChange (Stratagene) y cebadores de un oligonucleótido. Para la generación del mutante doble, se usaron ADNc con la mutación puntual sencilla G173Q como molde para la segunda ronda de la mutagénesis para introducir L169K. El mutante se secuenció en ambas direcciones en la totalidad de la región de codificación. Los mutantes de CocE y silvestre se expresaron como proteínas marcadas con 6 His en su extremo C en células de *E. coli* BL-21 Gold (DE3) cultivadas a 37° C. La expresión de proteínas se indujo con isopropil-β-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG, Fisher) durante 12 horas a 18° C.

10 Purificación de la cocaína esterasa y mutantes. Las células se sedimentaron, resuspendieron en Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM con inhibidores de la proteasa (3 µg/ml de cada uno de leupeptina e inhibidor de la tripsina de soja o de garrofón) y se lisaron usando una prensa francesa (Thermo Fisher Scientific Corp, EE.UU.). La CocE silvestre o mutante se enriqueció usando cromatografía por afinidad de metales Talon (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View CA), seguido de cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose, GE Healthcare, Piscataway NJ) La CocE se eluyó de la columna Q-Sepharose con tampones en gradiente lineal de NaCl 150 - 450 mM que contienen Hepes 20 mM, pH 8,0, MgCl₂ 2 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 Mm. Las fracciones máximas se combinaron y concentraron mediante Centricon-30 (Millipore), se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C.

15 Determinación de la eficiencia catalítica. Para determinar la actividad catalítica se realizó un ensayo espectrofotométrico. Se añadieron muestras de L169K/G173Q CocE a una placa de 96 pocillos permeable a UV que contiene concentraciones crecientes de cocaína (0,5, 2,5, 5, 12,5, 25, 50, 100, y 150 µM), para dar una concentración final de 10 ng/ml de CocE en un volumen final de 200 µl. El cambio en la absorbancia a 240 nm se midió en 20 minutos con lecturas cada 10 segundos mediante un lector de placas SpectraMax Plus 384 UV (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) usando el software SOFTmax Pro (Versión 3,1.2). El cambio en la absorbancia se convirtió en el cambio en la concentración y, adicionalmente, se determina la velocidad de deterioro por mol de enzima (K_{cat}). Las K_{cat} y K_m de la enzima se determinan usando Prism (GraphPad software, San Diego). La mutación L169K/G173Q permite que cada molécula de la enzima convierta aproximadamente 6000 moléculas de cocaína por minuto en metabolitos inactivos. El incremento de la K_{cat} sobre la silvestre y la mutación previa T172R/G173Q se acompaña de un incremento en la K_m , que tiene como resultado una eficiencia catalítica similar a la de la silvestre y la mutación T172R/G173Q (FIG. 34).

20 Determinación de la semivida *in vitro*. Para simular la temperatura del cuerpo y la concentración enzimática en el ratón NIH Swiss se incubó la CocE en un baño de agua a 37°C a una concentración de 60 µg/ml en plasma humano o en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4. Las muestras se añadieron al agua a 37°C directamente desde el almacenamiento a -80° C a varios tiempos (0, 24, 48, 77, 96, 120 horas) y todos se analizaron a una concentración final de 10 ng/ml como se ha descrito anteriormente.

25 La sustitución de una lisina por un glutamato en las posiciones 169 y 173 respectivamente extiende la semivida *in vitro* a aproximadamente 72 horas, que es 332 veces más larga que la enzima silvestre y 17 veces más larga que la mutación T172R/G173Q (FIG. 35).

30 Determinación de la potencia *in vivo* EL incremento en la K_{cat} también se ha mostrado *in vivo*. La CocE mutada L169K/G173Q protegió de forma dependiente de la dosis a los ratones de dosis letales crecientes de cocaína (FIG. 36). La CocE se administró i.v. en la vena de la cola de ratones NIH Swiss en un volumen de 0,2 ml. Concentraciones variables de cocaína se liberaron en la cavidad intraperitoneal 1 minuto después. Este mutante ha demostrado ser más potente que los mutantes de CocE previos, manteniendo algún grado de protección a dosis tan bajas como de 0,01 mg. La mayor potencia debería permitir usar menos enzima y, por tanto, debería disminuir las respuestas inmunológicas innatas de los animales a la proteína. El incremento de la potencia también hace que esta enzima sea más eficaz contra dosis extremas de cocaína que se pueden ver en una sobredosis humana, a concentraciones equivalentes a otra mutación enzimática.

35 Evaluación de la semivida *in vivo*. La CocE se administra i.v. en la vena de la cola en un volumen de 0,2 ml. Los animales son expuestos a 180 mg/kg de cocaína liberada por vía intraperitoneal a un tiempo dado tras la administración de CocE. La mutante L169K/G173Q de CocE se analizó a 1 mg contra los demás mutantes porque 1 mg de CocE mostró la mayor separación entre las estabilidades térmicas *in vivo* de diferentes mutantes de *in vivo* en estudios preliminares (datos no mostrados). La mutante L169K/G173Q de CocE (1 mg) protegió al 50% de los ratones NIH Swiss frente a la muerte durante hasta 7,5 horas. Dosis menores de la mutación L169K/G173Q muestran una protección extendida contra la letalidad en comparación también con las mutaciones previas (FIG. 37).

40 SEC ID N° 1 – Secuencia de aminoácidos de la CocE de Rhodococcus

1 mvdgnysvas nvmvpmrdgv rlvdyrpd adgvpvllv npydkfdvf awstqstnwl

61 efvrđgyaw iqdtrglfas egefvpvhvdd eadaedtłsw ileqawcdgn vgmfgvsylg
 121 vtqwqaavsg vggkaiaps masadlyrap wygpggalsv eallgwsali gtglłtsrđd
 181 arpedaadfv qlaailndva gaasvtplae qplłgřlipw vidqvvdhpd ndeswqsisł
 241 ferłgglatp alitagwydđ fvgesłrtfv avkdnadarł wgpwshsnł tđrnadrkfg
 5 301 iaatypiqea ttmhkaffđr hłrgetdala gypkvrřfv m gidewrdetđ wplpđtaytp
 361 fylggsgaan tstgggtłst sigstesadt ylyđpadpvp slggtłłfhn gđngpadqrp
 421 ihđrđđvłcy stevłđpve vtđtvsarłf vsssavđtdf taklvđvfpđ graialcdđi
 481 vrmryretlv nptłieagei yevaidmłat snvřlpgħri mvqvsssnřp kyđrnšntgg
 541 viareqleem ctavnřihrg pehpshivlp iikr

10 **Referencias**

Administration, S.A.a.M.H.S. Drug Abuse Warning Network, 2005: National Estimates of Drug-Related Emergency Department Visits. (ed. Office of Applied Studies, U.D.o.H.a.H.S.) (2005).

15 Baird, T.J., Deng, S.X., Landry, D.W., Winger, G. & Woods, J.H. Natural and artificial enzymes against cocaine. I. Monoclonal antibody 15A10 and the reinforcing effects of cocaine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 1127 - 34 (2000).

Bauman JL and DiDomenico RJ. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 7, 195 - 202 (2002).

Benowitz, N.L. Clinical pharmacology and toxicology of cocaine. *Pharmacol Toxicol* 72, 3 - 12 (1993).

Bresler, M.M., Rosser, S.J., Basran, A. & Bruce, N.C. Gene cloning and nucleotide sequencing and properties of a cocaine esterase from *Rhodococcus* sp. strain MB1. *Appl Environ Microbiol* 66, 904 - 8 (2000).

20 Browne, S.P., Slaughter, E.A., Couch, R.A., Rudnic, E.M. & McLean, A.M. The influence of plasma butyrylcholinesterase concentration on the in vitro hydrolysis of cocaine in human plasma. *Biopharm Drug Dispos* 19, 309 - 14 (1998).

Carmona, G.N. et al. Plasma butyrylcholinesterase activity and cocaine half-life differ significantly in rhesus and squirrel monkeys. *Life Sci* 59, 939 - 43 (1996).

25 Carmona et al. *Drug Metabolism & Disposition* 28, 367 - 371 (2000).

Carrera, M.R., Ashley, J.A., Wirsching, P., Koob, G.F. & Janda, K.D. A second-generation vaccine protects against the psychoactive effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 1988 - 92 (2001).

Carrera, M.R. et al. Treating cocaine addiction with viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10416 - 21 (2004).

30 Carrera, M.R., Trigo, J.M., Wirsching, P., Roberts, A.J. & Janda, K.D. Evaluation of the anticocaine monoclonal antibody GNC92H2 as an immunotherapy for cocaine overdose. *Pharmacol Biochem Behav* 81, 709 - 14 (2005).

Carroll FI, Howell LL and Kuhar M.J. *J Med Chem* 42, 2721 - 2736 (1999).

Case, D.A. et al. AMBER 8. University of California, San Francisco (2004).

The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 760 - 3 (1994).

35 Comer, S.D. et al. Depot naltrexone: long-lasting antagonism of the effects of heroin in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 159, 351 - 60 (2002).

Cooper, Z.D. et al. Rapid and robust protection against cocaine-induced lethality in rats by the bacterial cocaine esterase. *Mol Pharmacol* 70, 1885 - 91 (2006).

40 Daniels, A., Ayala, E., Chen, W., Coop, A. & Matsumoto, R.R. N-[2-(m-methoxyphenyl)ethyl]-N-ethyl-2-(1-pyrrolidinyl)ethylamine (UMB 116) is a novel antagonist for cocaine-induced effects. *Eur J Pharmacol* 542, 61 - 8 (2006).

Deng, S.X., de Prada, P. & Landry, D.W. Anticocaine catalytic antibodies. *J Immunol Methods* 269, 299 - 310 (2002).

- Duysen, E.G., Bartels, C.F. & Lockridge, O. Wild-type and A328W mutant human butyrylcholinesterase tetramers expressed in Chinese hamster ovary cells have a 16-hour half-life in the circulation and protect mice from cocaine toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 751 - 8 (2002).
- 5 Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126 - 32 (2004).
- Gao Y and Brimijoin S. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 310, 1046 - 1052 (2004).
- Gao, Y. et al. Gene transfer of cocaine hydrolase suppresses cardiovascular responses to cocaine in rats. *Mol Pharmacol* 67, 204 - 11 (2005).
- 10 Gasior, M., Ungard, J.T. & Witkin, J.M. Chlormethiazole: effectiveness against toxic effects of cocaine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 153 - 61 (2000).
- Gorelick, D.A. Enhancing cocaine metabolism with butyrylcholinesterase as a treatment strategy. *Drug Alcohol Depend* 48, 159 - 65 (1997).
- Grabowski et al. *Addictive Behaviors* 29, 1439 - 1464 (2004).
- Inaba T. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 67, 1154 - 1157 (1989).
- 15 Kantak, K.M. Anti-cocaine vaccines: antibody protection against relapse. *Expert Opin Pharmacother* 4, 213 - 8 (2003).
- Knuepfer MM. *Pharmacol Ther* 97, 181 - 222 (2003).
- Ko, M.C. et al. Cocaine esterase: interactions with cocaine and immune responses in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 320, 926 - 33 (2007).
- 20 Korkegian, A., Black, M.E., Baker, D. & Stoddard, B.L. Computational thermostabilization of an enzyme. *Science* 308, 857 - 60 (2005).
- Kosten et al. *Vaccine* 20, 1196 - 1204 (2002).
- Krissinel, E. & Henrick, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2256 - 68 (2004).
- 25 Kuhlman, B. & Baker, D. Native protein sequences are close to optimal for their structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10383 - 8 (2000).
- Landry, D.W., Zhao, K., Yang, G.X., Glickman, M. & Georgiadis, T.M. Antibody-catalyzed degradation of cocaine. *Science* 259, 1899 - 901 (1993).
- Larsen, N.A. et al. Crystal structure of a bacterial cocaine esterase. *Nat Struct Biol* 9, 17 - 21 (2002).
- 30 Lynch, T.J. et al. Cocaine detoxification by human plasma butyrylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol* 145, 363 - 71 (1997).
- Mackay, J.B.L. Erythroxyton coca. *Tropical Agricultunist* 6, 249 (1886).
- Martin, L.A. Brief notes on the cultivation of coca. *Agronomia* 17, 77 - 80 (1952).
- 35 Mattes, C.E. et al. Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol* 145, 372 - 80 (1997).
- Meijler, M.M. et al. Fluorescent cocaine probes: a tool for the selection and engineering of therapeutic antibodies. *J Am Chem Soc* 127, 2477 - 84 (2005).
- Mets, B. et al. A catalytic antibody against cocaine prevents cocaine's reinforcing and toxic effects in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10176 - 81 (1998).
- 40 Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240 - 55 (1997).
- Newman, A.H. & Rothman, R.B. *Addiction*, 169 - 192 (Elsevier, Amsterdam, London, 2007).
- Norman, A.B. et al. A chimeric human/murine anticocaine monoclonal antibody inhibits the distribution of cocaine to the brain in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 320, 145 - 53 (2007).

Otwinowski, Z., Minor, W. & Charles W. Carter, Jr. [20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. in *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 276 307 - 326 (Academic Press, 1997).

Rogers, C.J., Mee, J.M., Kaufmann, G.F., Dickerson, T.J. & Janda, K.D. Toward cocaine esterase therapeutics. *J Am Chem Soc* 127, 10016 - 7 (2005).

5 Sun et al. *Molecular Pharmacology* (2002a).

Sun et al. *Pharmacology & Experimental Therapeutics* 302, 710 - 716 (2002b).

Turner, J.M. et al. Biochemical characterization and structural analysis of a highly proficient cocaine esterase. *Biochemistry* 41, 12297 - 307 (2002).

10 Veronese, F.M. & Harris, J.M. Introduction and overview of peptide and protein pegylation. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 453 - 6 (2002).

Wilson LD and Shelat C. *J Toxicol Clin Toxicol* 41, 777 - 788 (2003).

Xie, W. et al. An improved cocaine hydrolase: the A328Y mutant of human butyrylcholinesterase is 4-fold more efficient. *Mol Pharmacol* 55, 83 - 91 (1999).

15 Yang, G. et al. Anti-Cocaine Catalytic Antibodies: A Synthetic Approach to Improved Antibody Diversity. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 5881 - 5890 (1996).

PCT publication WO/2008/008358.

En vista de lo anterior, se comprobará que se logran las distintas ventajas de la invención y se consiguen otras ventajas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

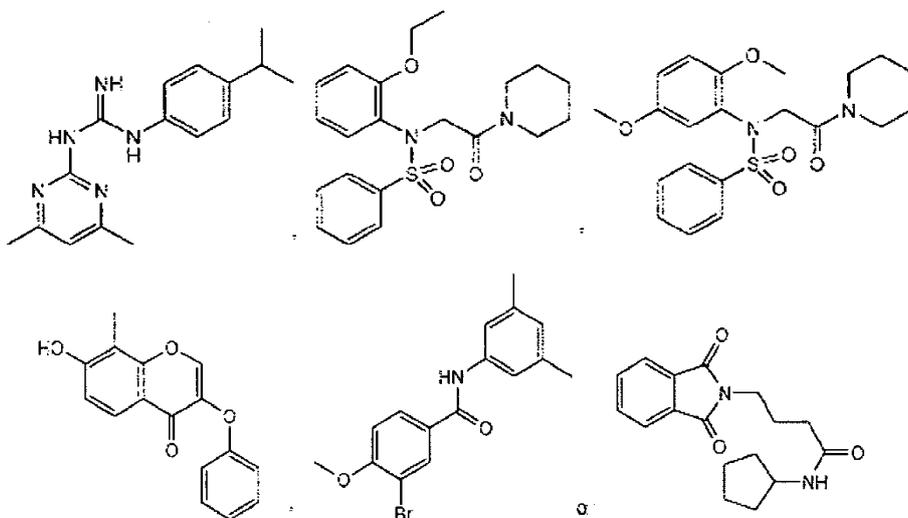
un polipéptido de cocaína esterasa (CocE); y

5 el menos un compuesto de termoestabilización,

en la que

la CocE en presencia del compuesto es más termoestable que la CocE en ausencia del compuesto; y

el uno o más compuestos de termoestabilización se seleccionan de



10

2. La composición de la reivindicación 1, en la que la CocE comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1;

(ii) una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N° 1, que tiene actividad esterasa; o

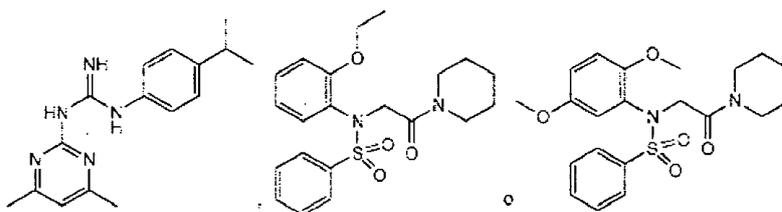
15 (iii) una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N° 1, con una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en L163V, V225I, I218L, A310D, A149S, S159A, S265A, S56G, W220A, S140A, F189L, A193D, T254R, N42V, V262L, L508G, Y152H, V160A, T172R, Y532F, T74S, W285T, L146P, D533S, A194R, G173Q, C477T, K531A, R41I, L119A, K46A, F84Y, T172R/G173Q, L169K, F189A, N197K, R182K, F189K, V190K, Q191K, A194K, y L169K/G173Q, o una combinación de los mismos, y que tienen actividad esterasa.

20 3. La composición de la reivindicación 2, en la que la CocE tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 con una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q y T172R/G173Q.

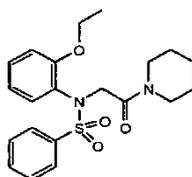
4. La composición de la reivindicación 2, en la que la CocE tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 con la sustitución L169K/G173Q.

25 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que la CocE es una CocE pegilada.

6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en la que el al menos un compuesto de termoestabilización se selecciona de:



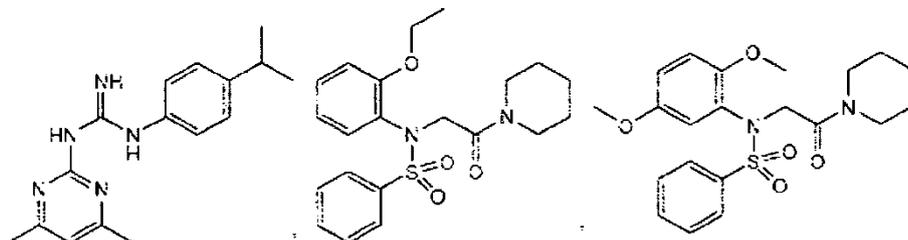
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en la que el al menos un compuesto de es:



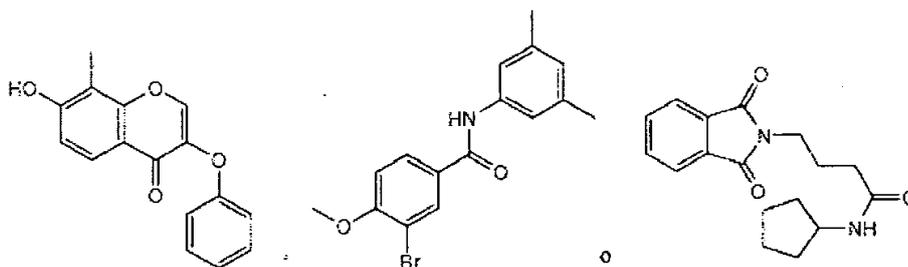
5

8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, que además comprende un vehículo farmacéuticamente activo.

9. Un método *ex vivo* de termoestabilización de una cocaína esterasa (CocE), comprendiendo el procedimiento combinar un polipéptido de CocE con uno o más compuestos de termoestabilización seleccionados de:



10



10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el polipéptido de CocE comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1;

(ii) una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N° 1, que tiene actividad esterasa; o

(iii) una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N° 1, con una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en L163V, V225I, I218L, A310D, A149S, S159A, S265A, S56G, W220A, S140A, F189L, A193D, T254R, N42V, V262L, L508G, Y152H, V160A, T172R, Y532F, T74S, W285T, L146P, D533S, A194R, G173Q, C477T, K531A, R41I, L119A, K46A, F84Y, T172R/G173Q, L169K, F189A, N197K, R182K, F189K, V190K, Q191K, A194K, y L169K/G173Q, o una combinación de los mismos, y que tienen actividad esterasa.

20

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 – 10, en el que la combinación del polipéptido de CocE con uno o más compuestos de termoestabilización se produce *in vitro*, durante la purificación de CocE, durante el almacenamiento de CocE, o una combinación de los mismos.

12. Una composición que comprende:

- 5 (i) un polipéptido de la cocaína esterasa (CocE) aislada, comprendiendo el polipéptido de CocE
- (a) una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, a excepción de las sustituciones L169K y G173Q; o
 - (b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85% con la SEC ID N° 1, en la que el polipéptido de CocE codificado tiene sustituciones L169K y G173Q y actividad esterasa con una termoestabilidad incrementada a 37°C en comparación con la CocE silvestre; o
- 10 (ii) un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de (i); y
- (iii) opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

13. Una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8 o 12, para el uso en el tratamiento de una afección inducida por cocaína seleccionada del grupo que consiste en sobredosis de cocaína, toxicidad por cocaína, adicción a la cocaína o dependencia de la cocaína.

- 15 14. Uso de una composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección inducida por cocaína seleccionada del grupo que consiste en sobredosis de cocaína, toxicidad por cocaína, adicción a la cocaína o dependencia de la cocaína, seleccionada la composición de:
- (i) una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; o
 - (ii) una composición de acuerdo con la reivindicación 12.

- 20 15. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en la que la composición se formula para administración intravenosa o administración mediante minibomba de infusión.

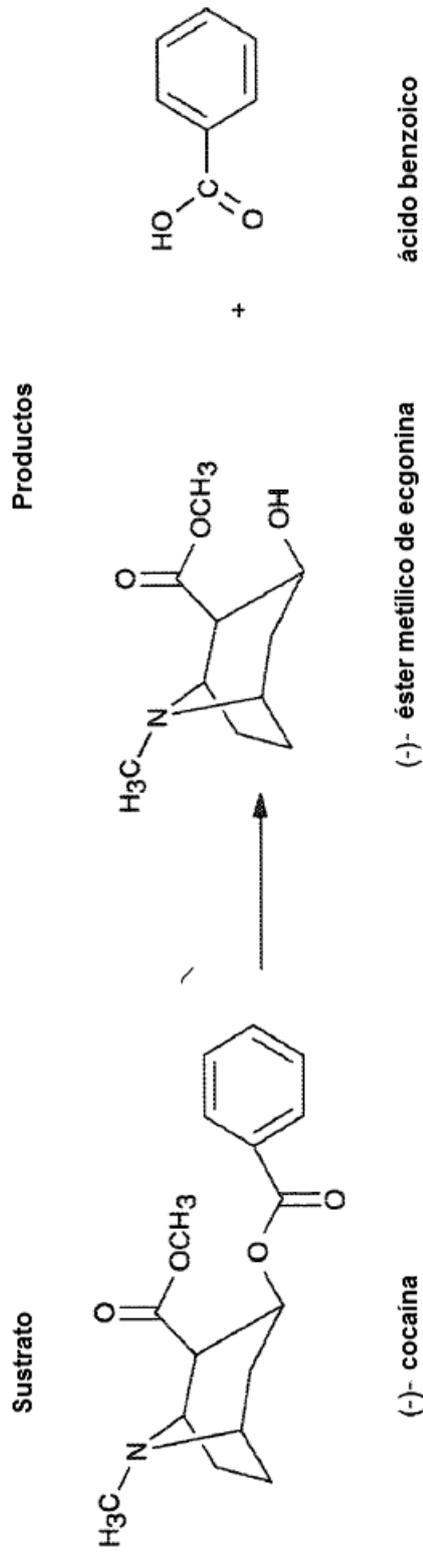


FIG. 1

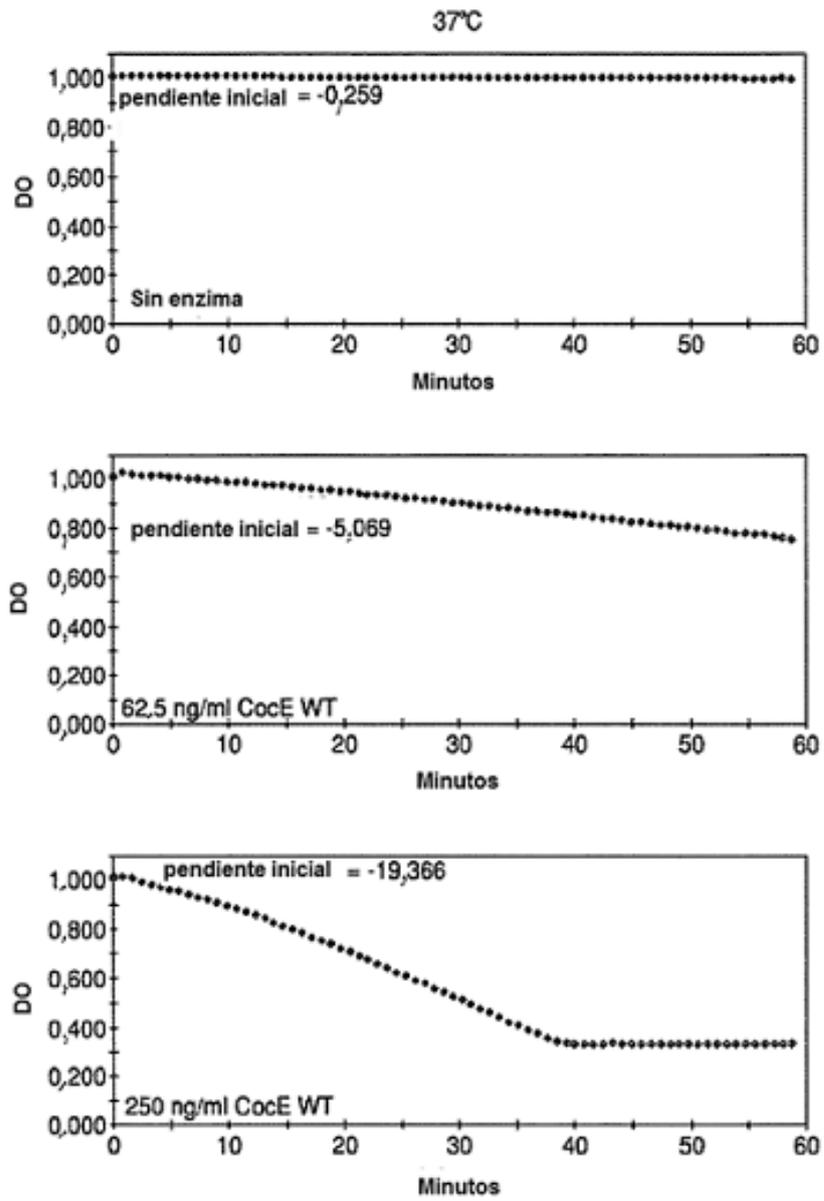


FIG. 2

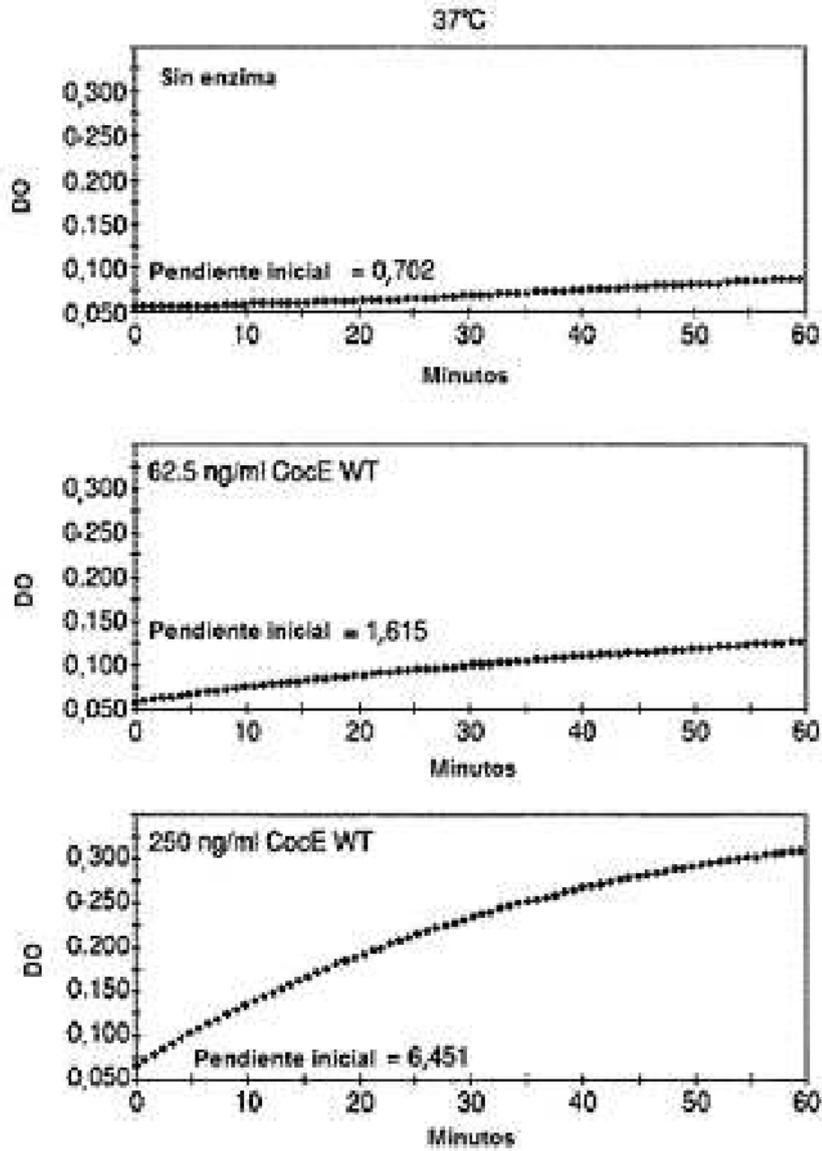
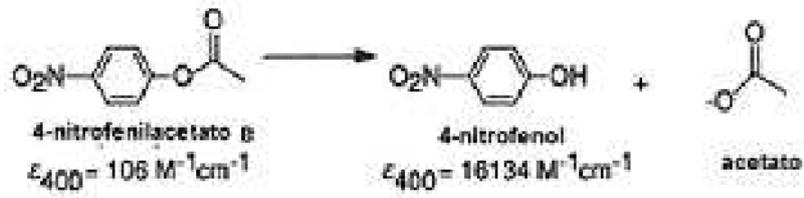


FIG. 3

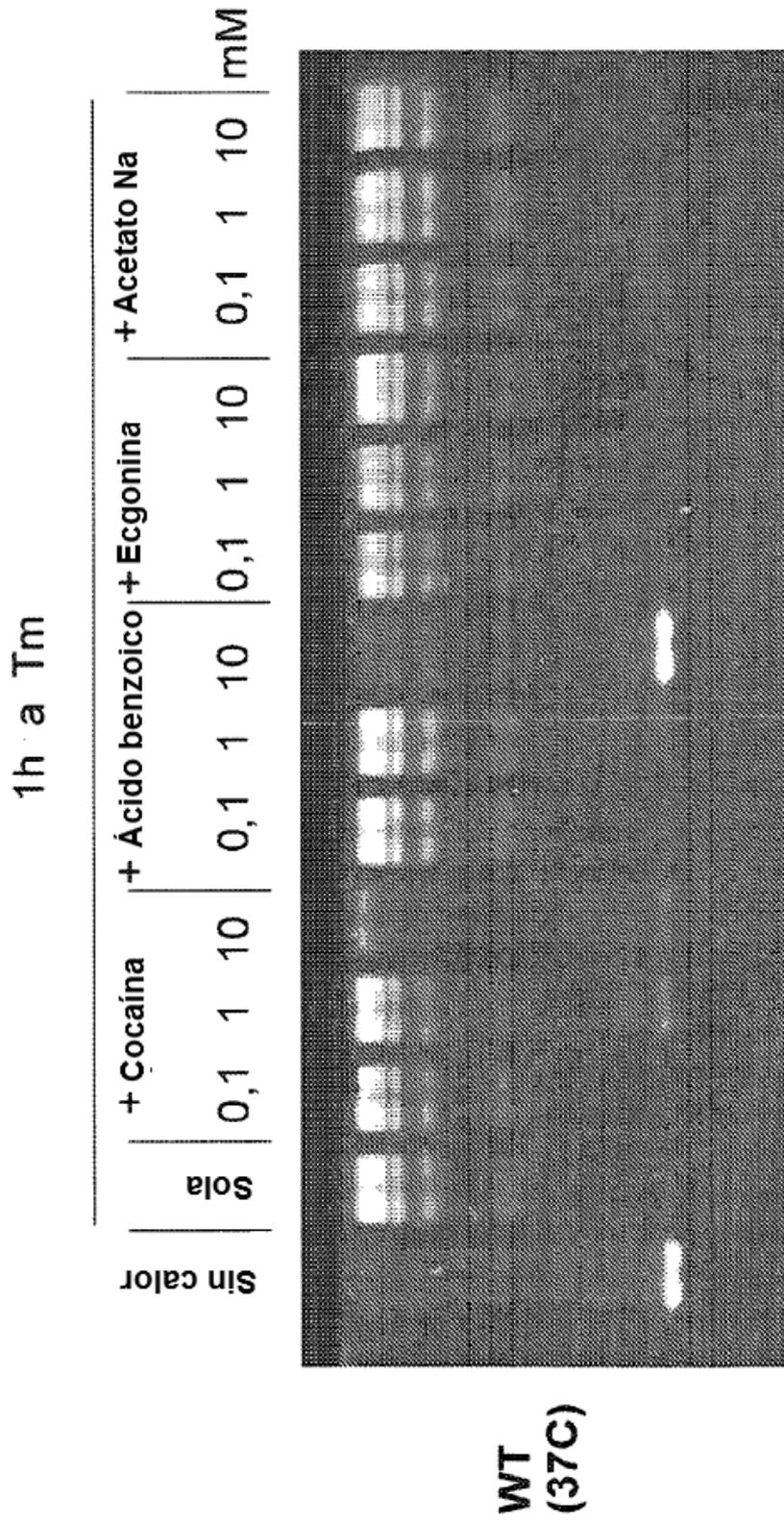


FIG. 4

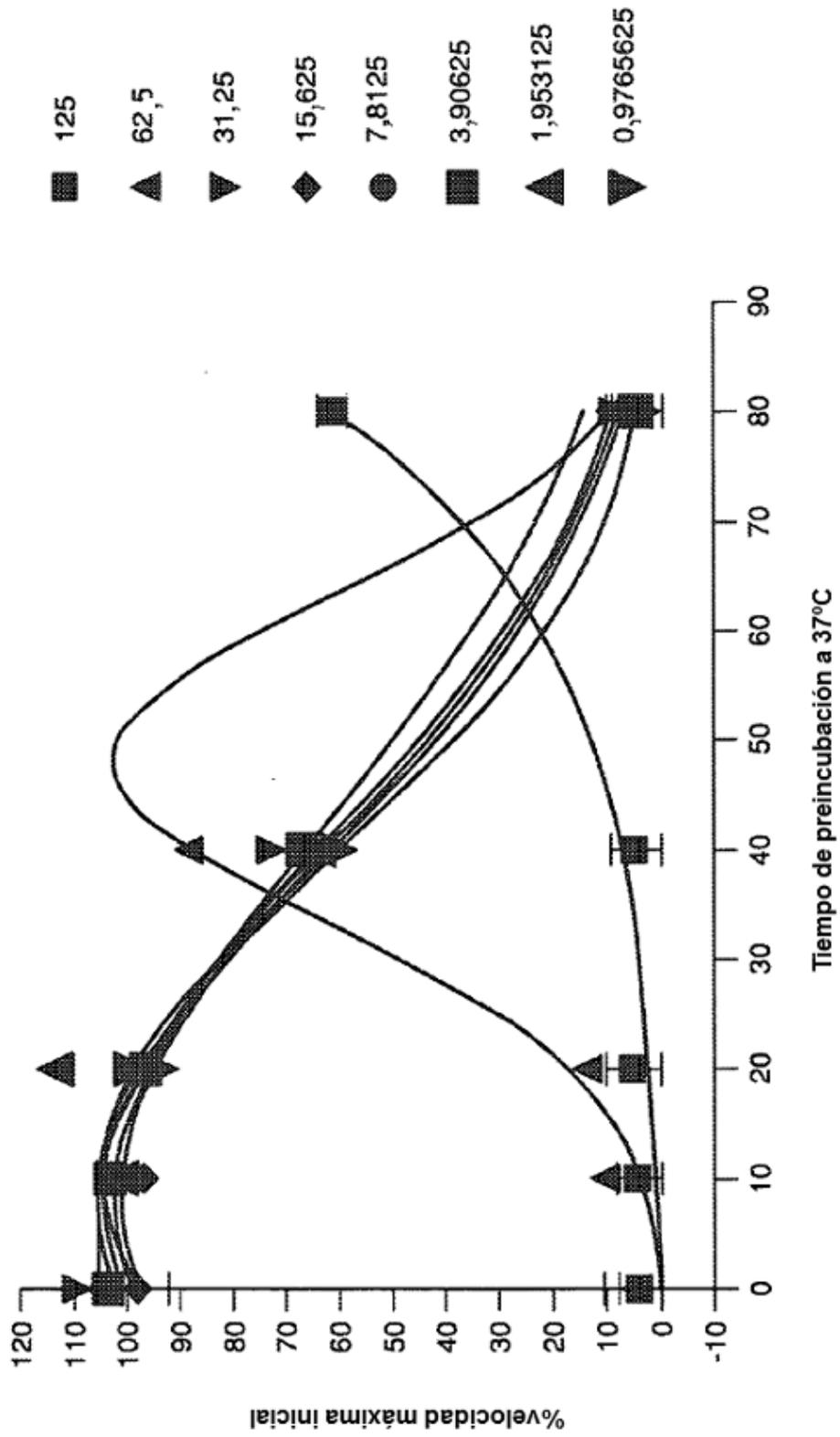
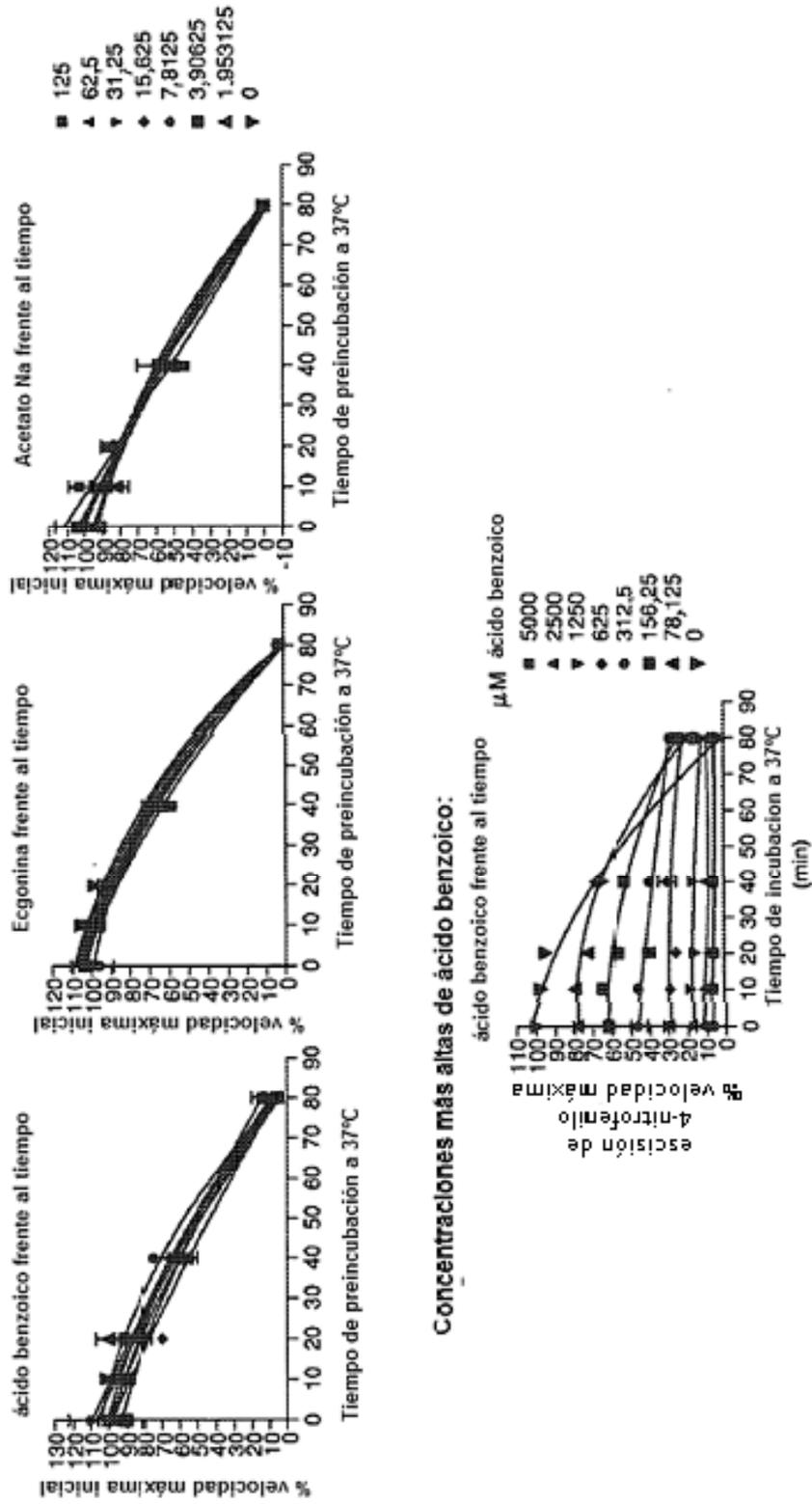


FIG. 5



Concentraciones más altas de ácido benzoico:

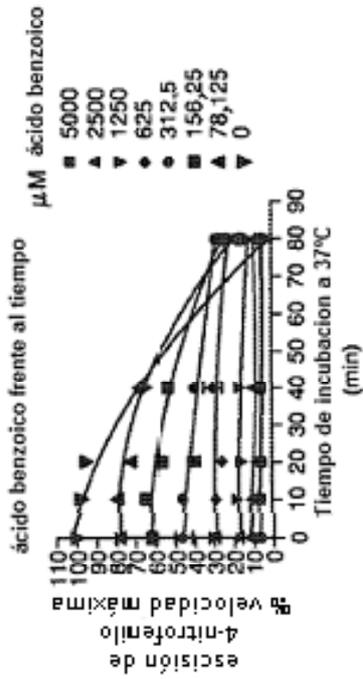


FIG. 6

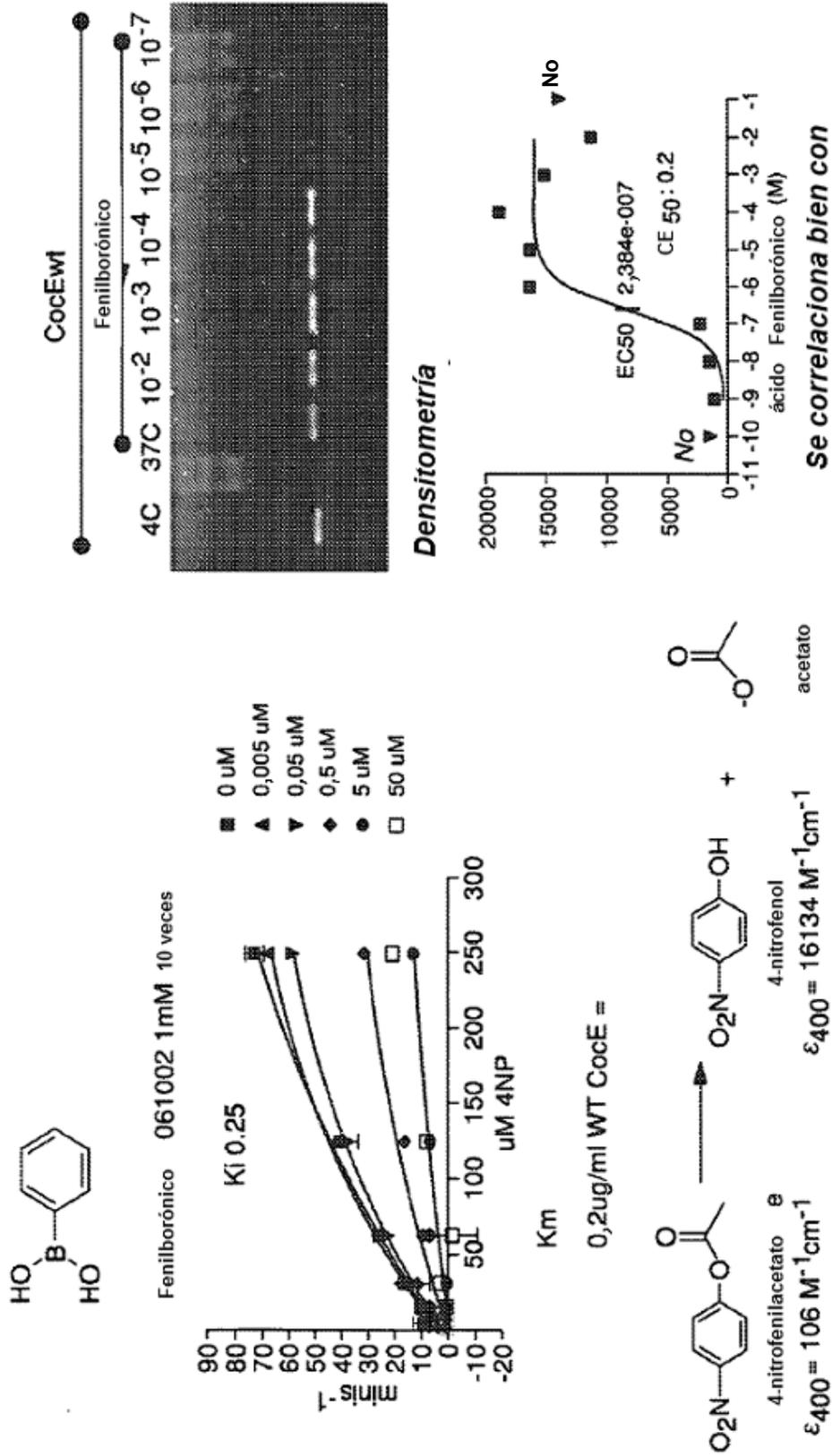


FIG. 7

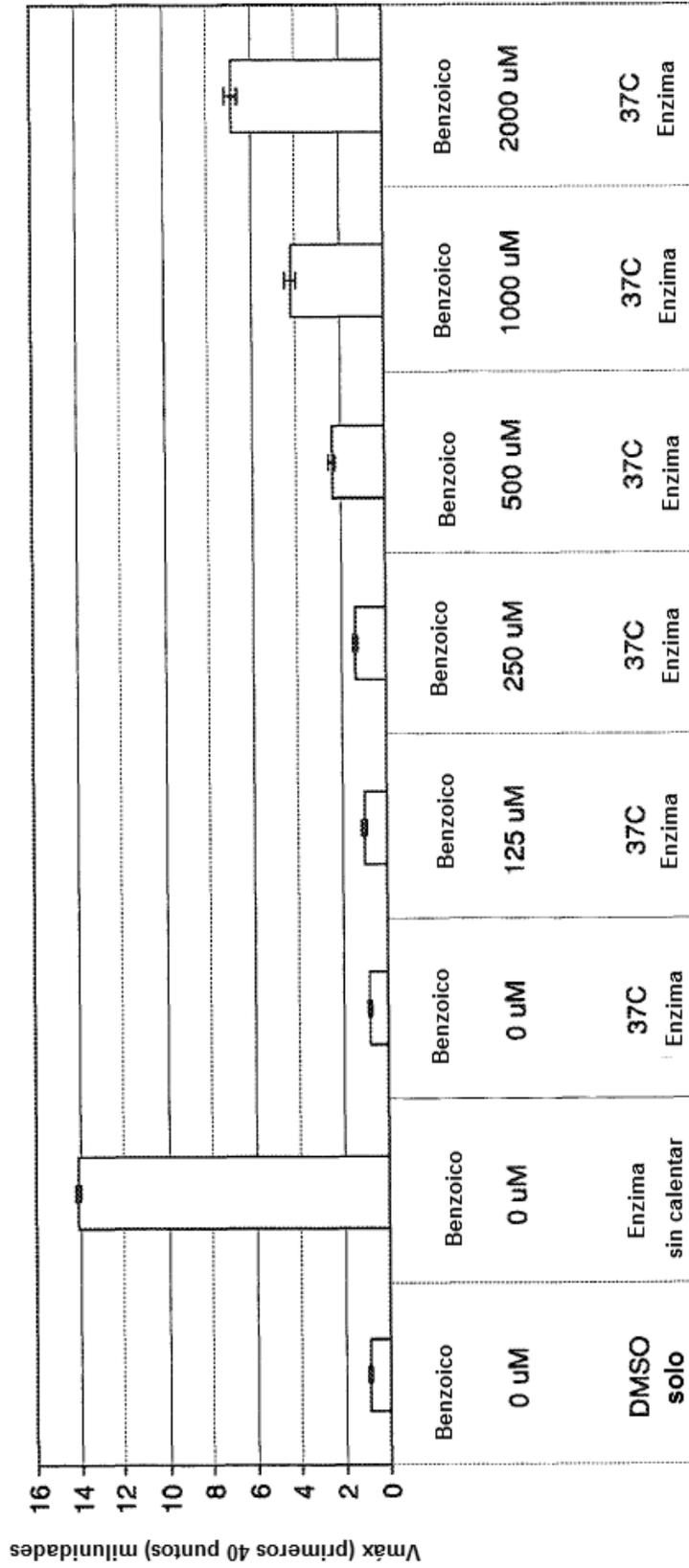
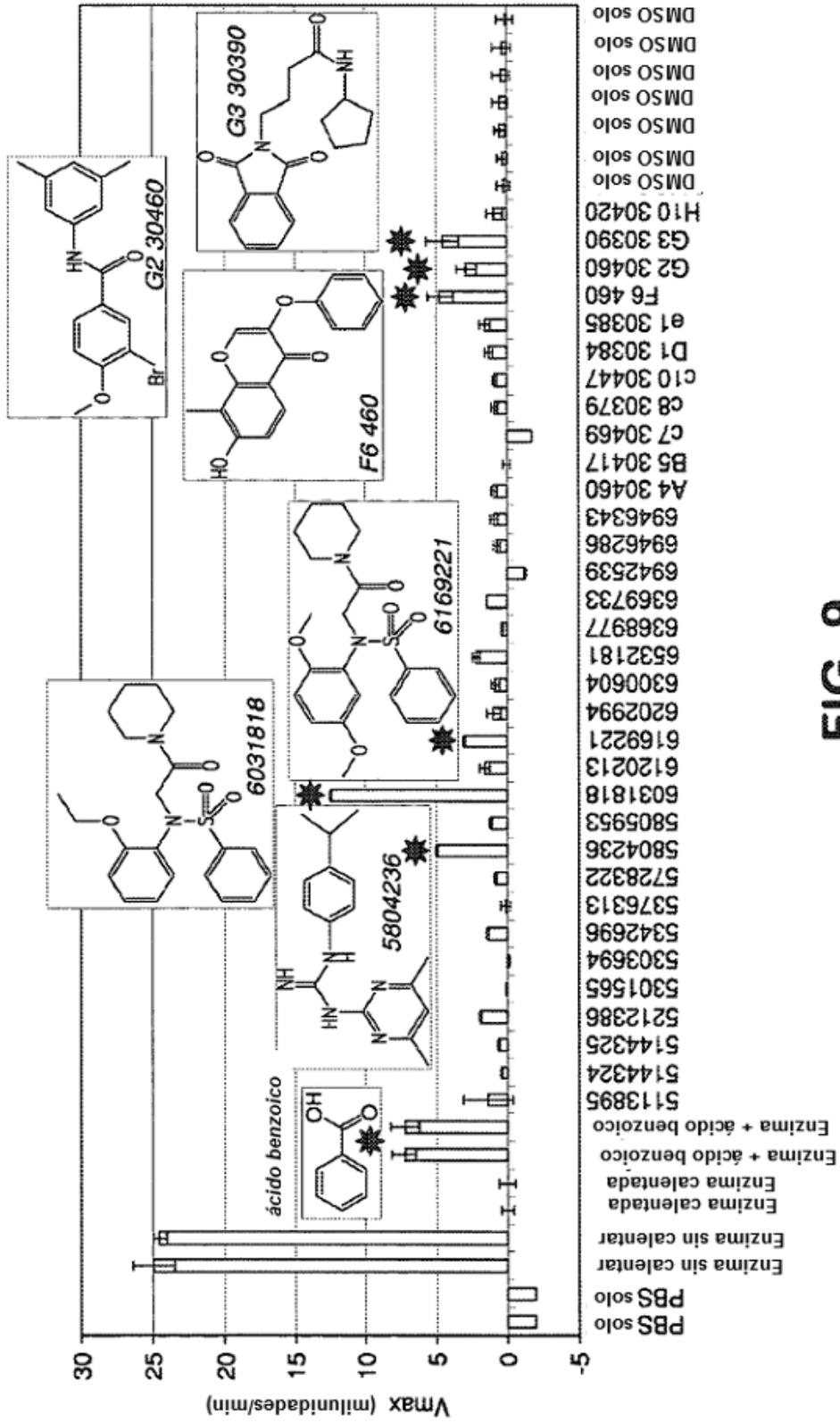


FIG. 8



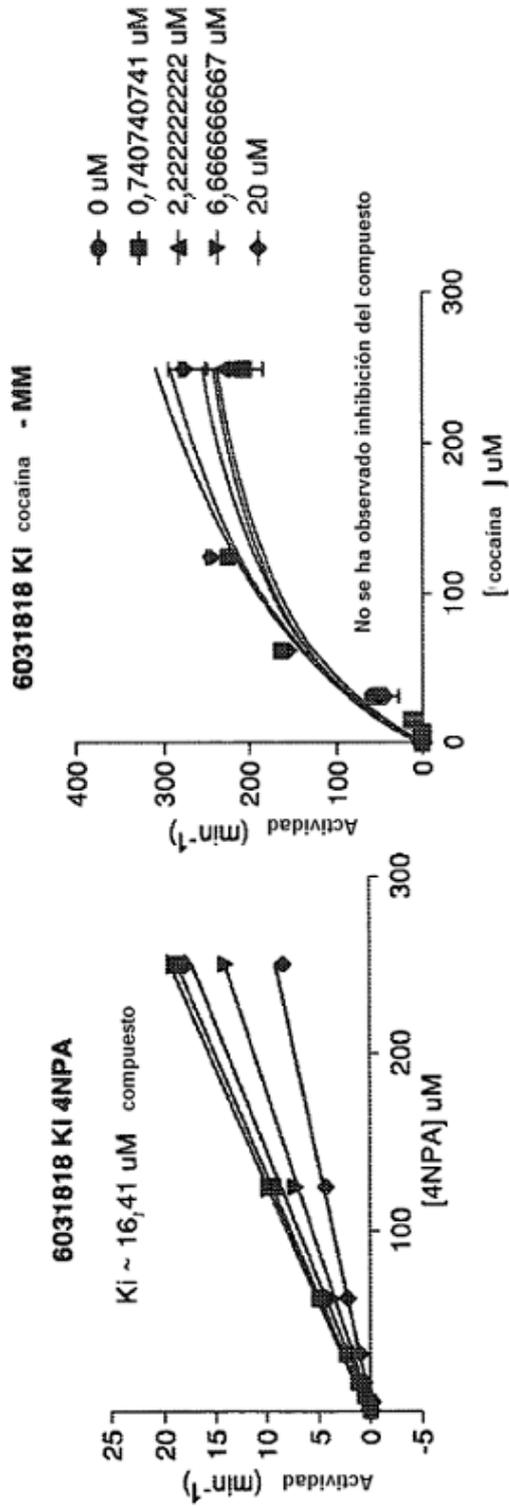
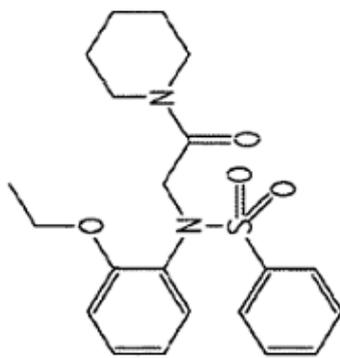


FIG. 10

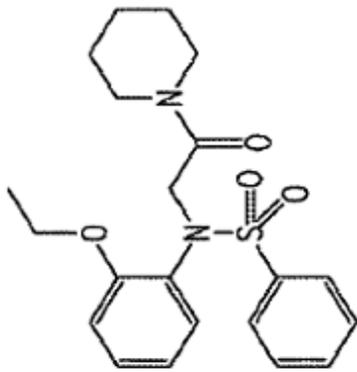
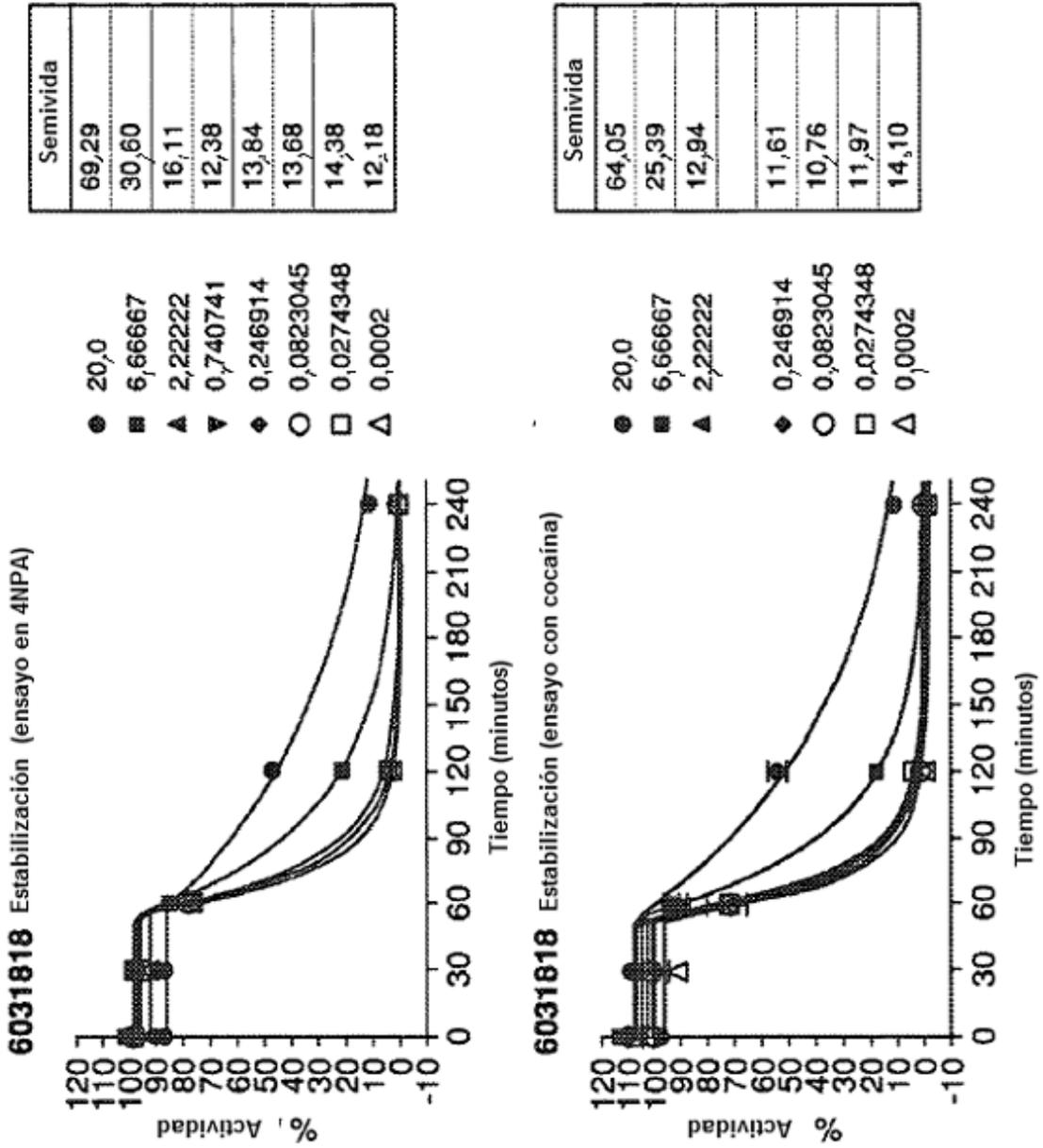
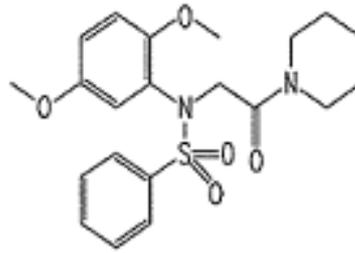


FIG. 11



6169221 KI 4NPA - MM

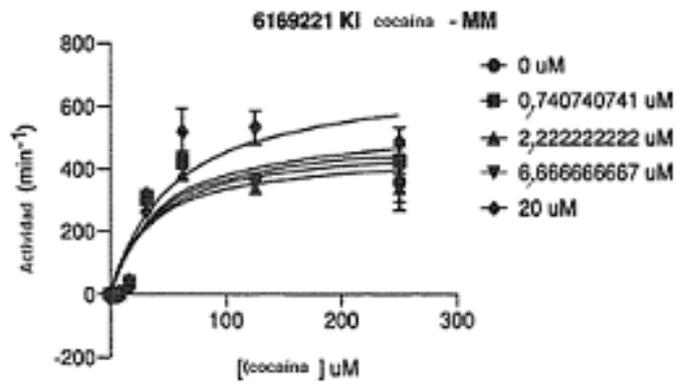
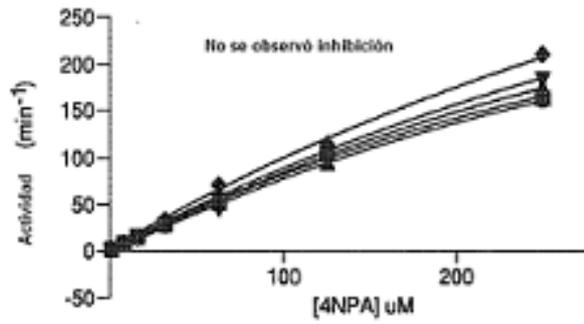
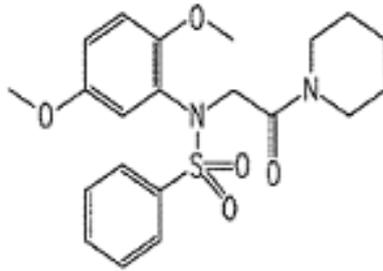
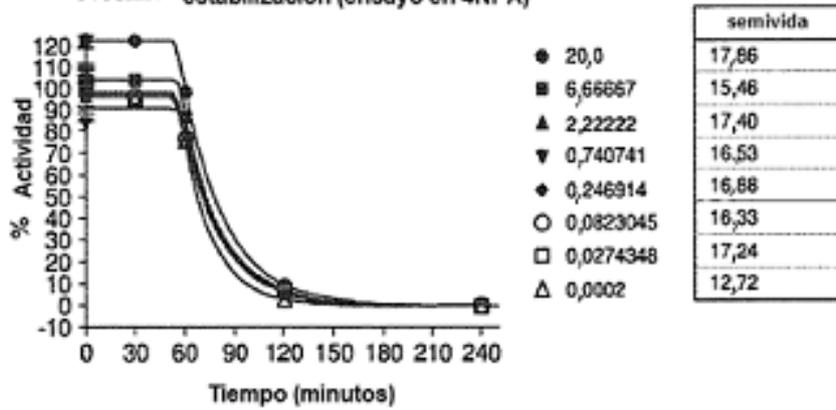


FIG. 12



6169221 estabilización (ensayo en 4NPA)



6169221 estabilización (ensayo con cocaína)

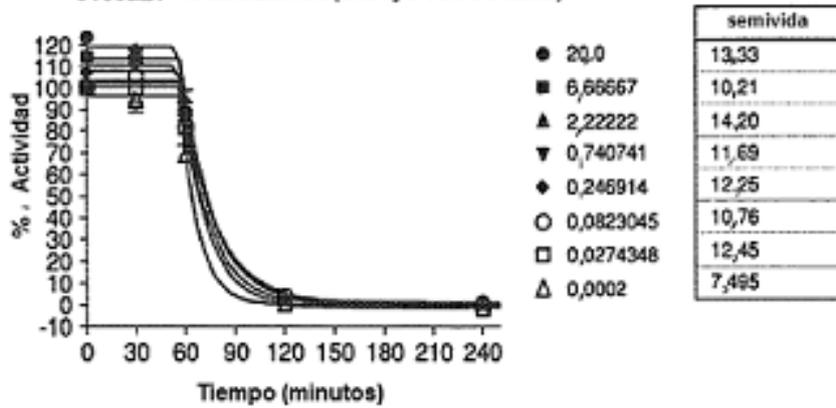


FIG. 13

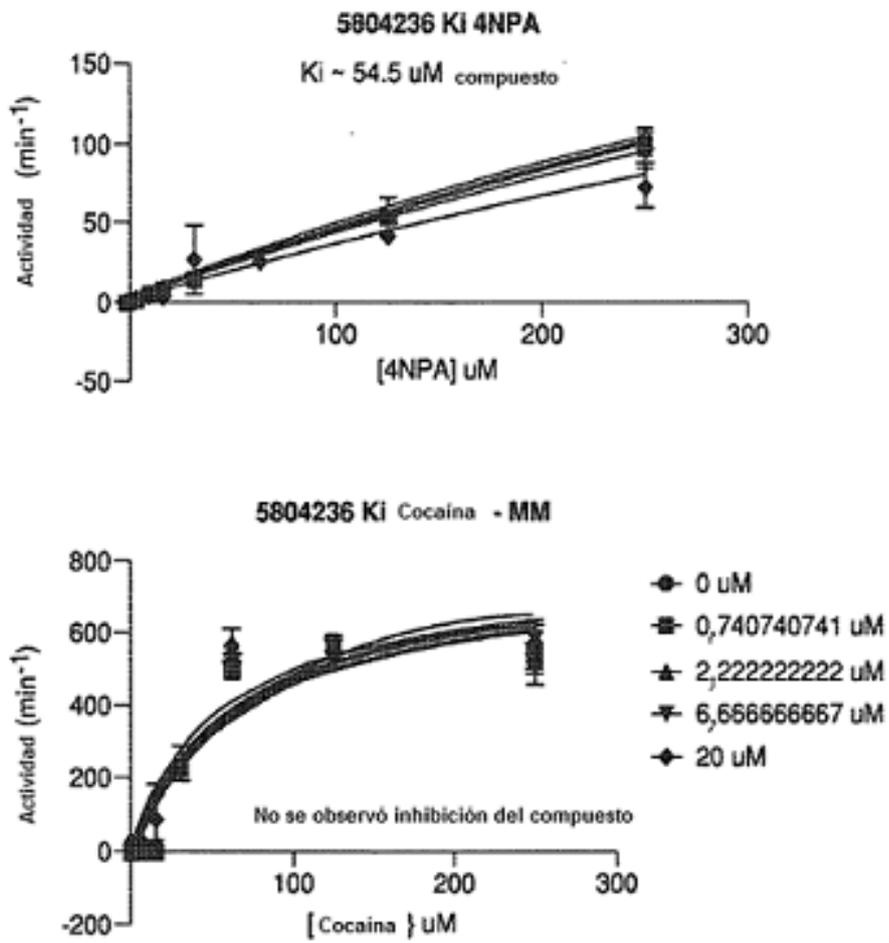
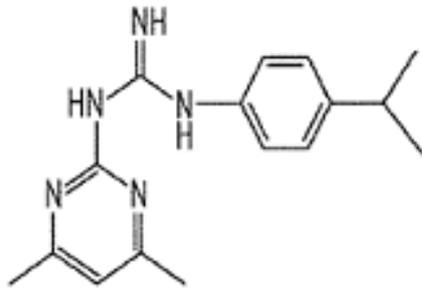


FIG. 14

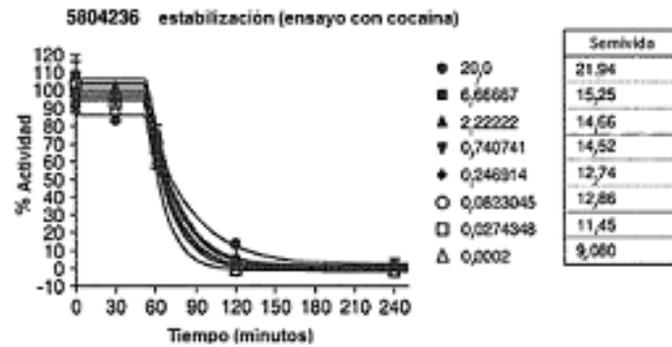
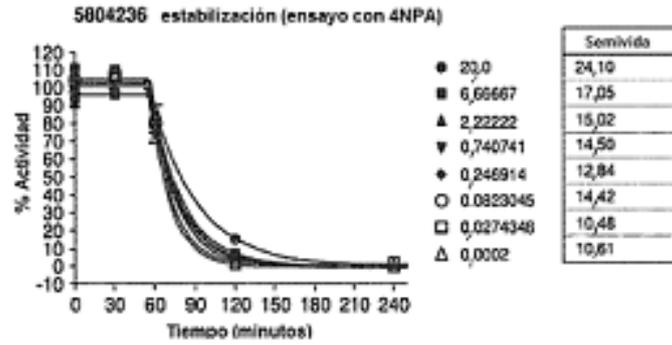
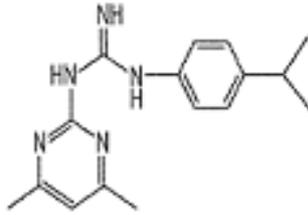


FIG. 15

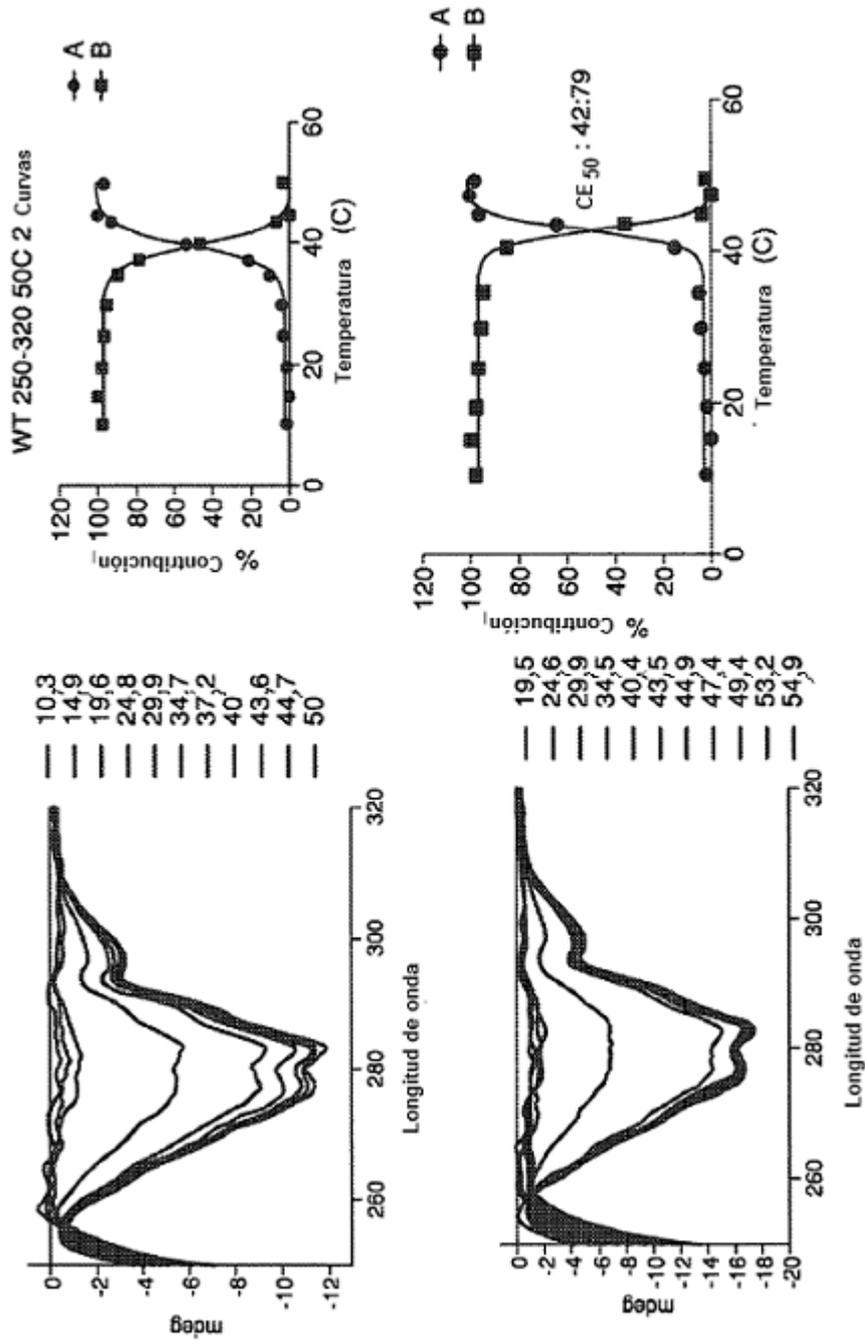


FIG. 16

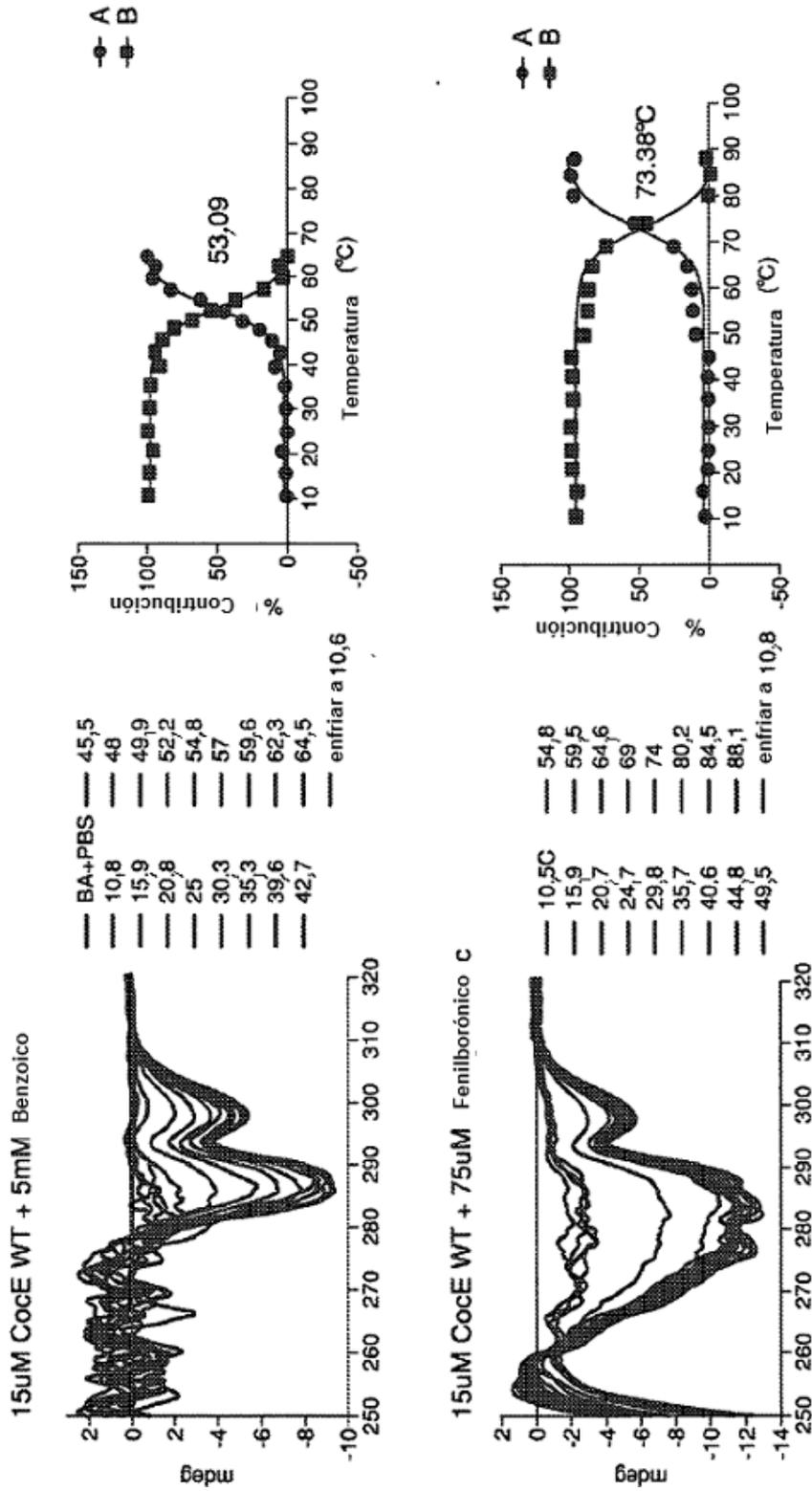


FIG. 17

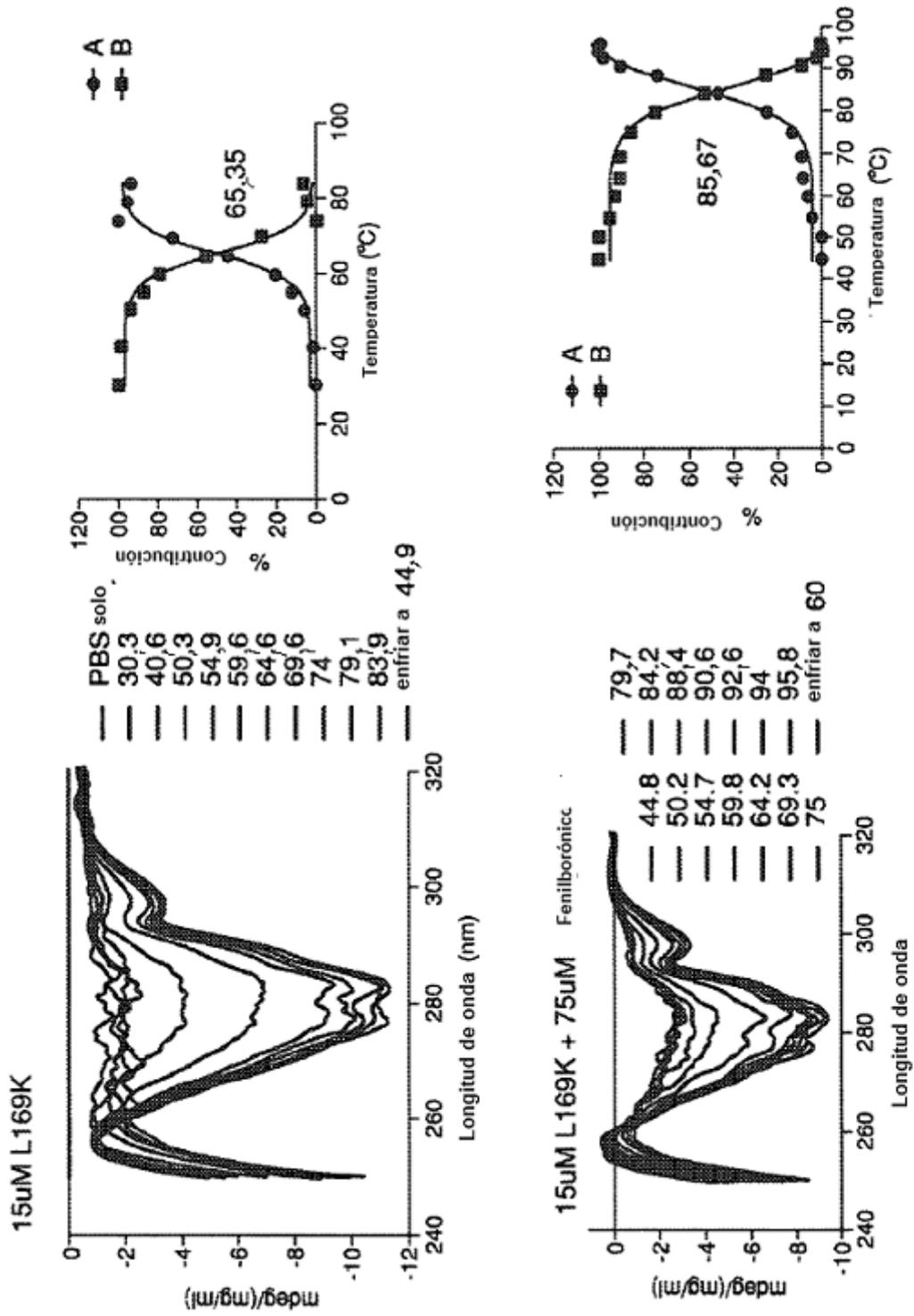


FIG. 18

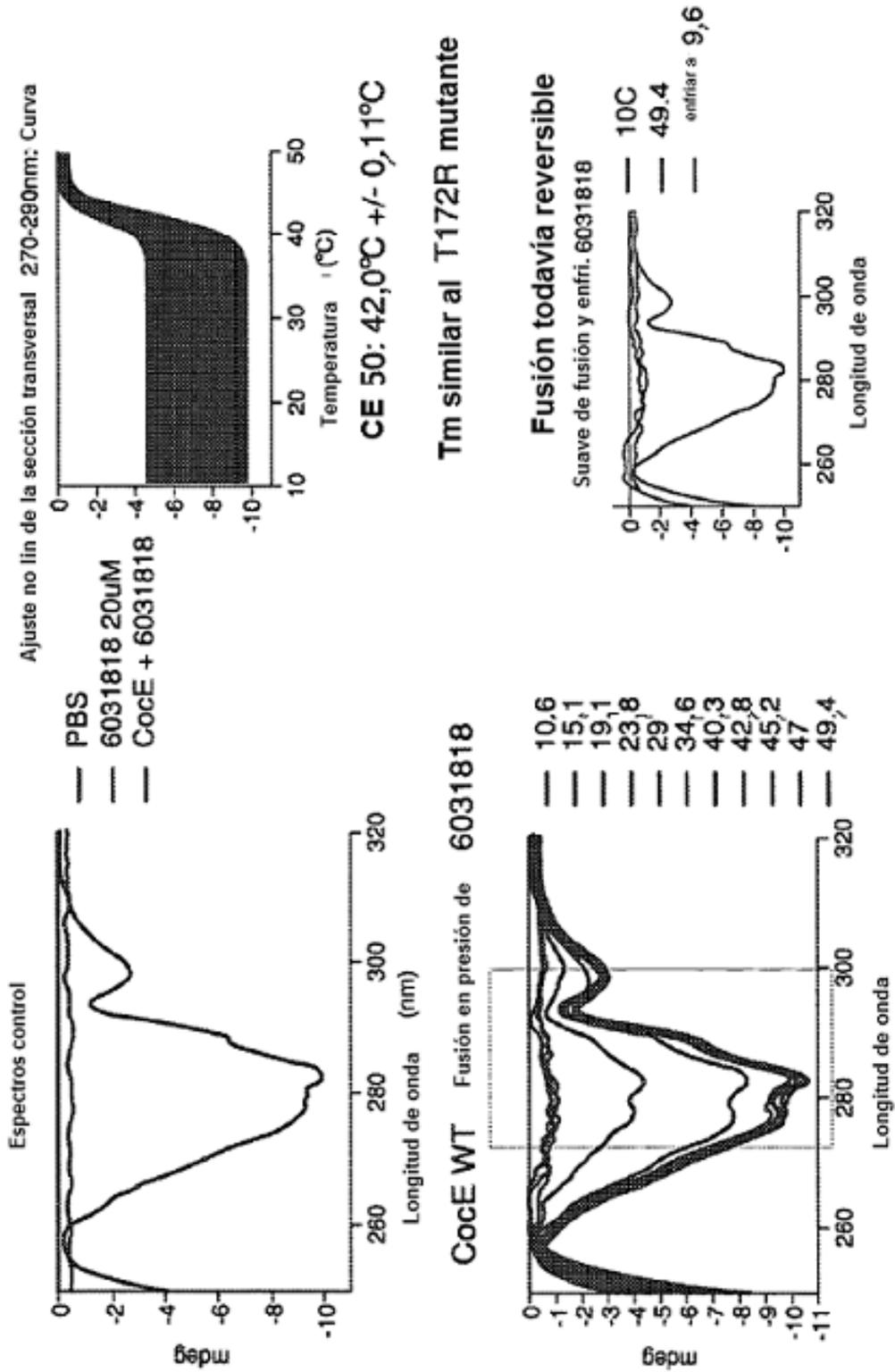


FIG. 19

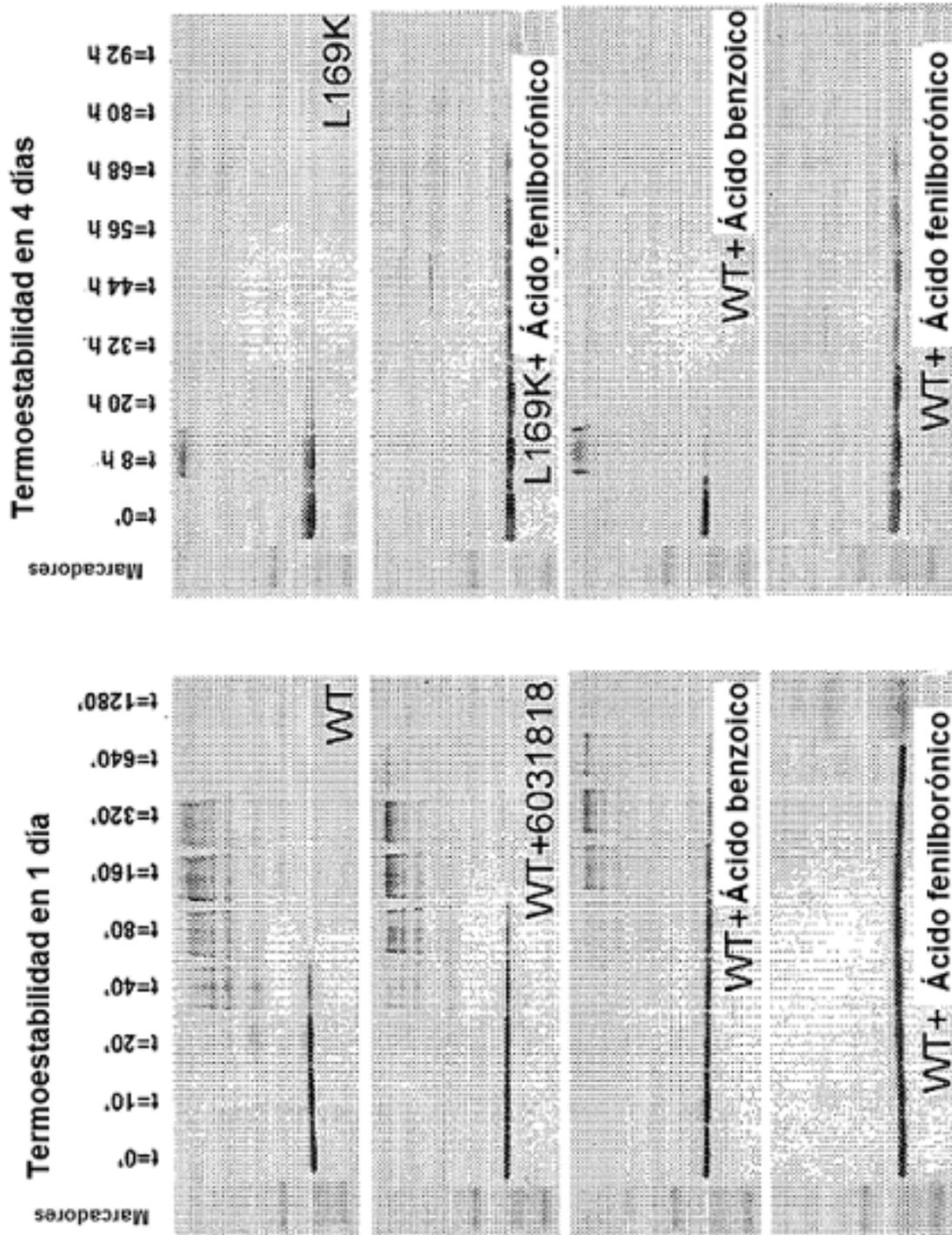


FIG. 20

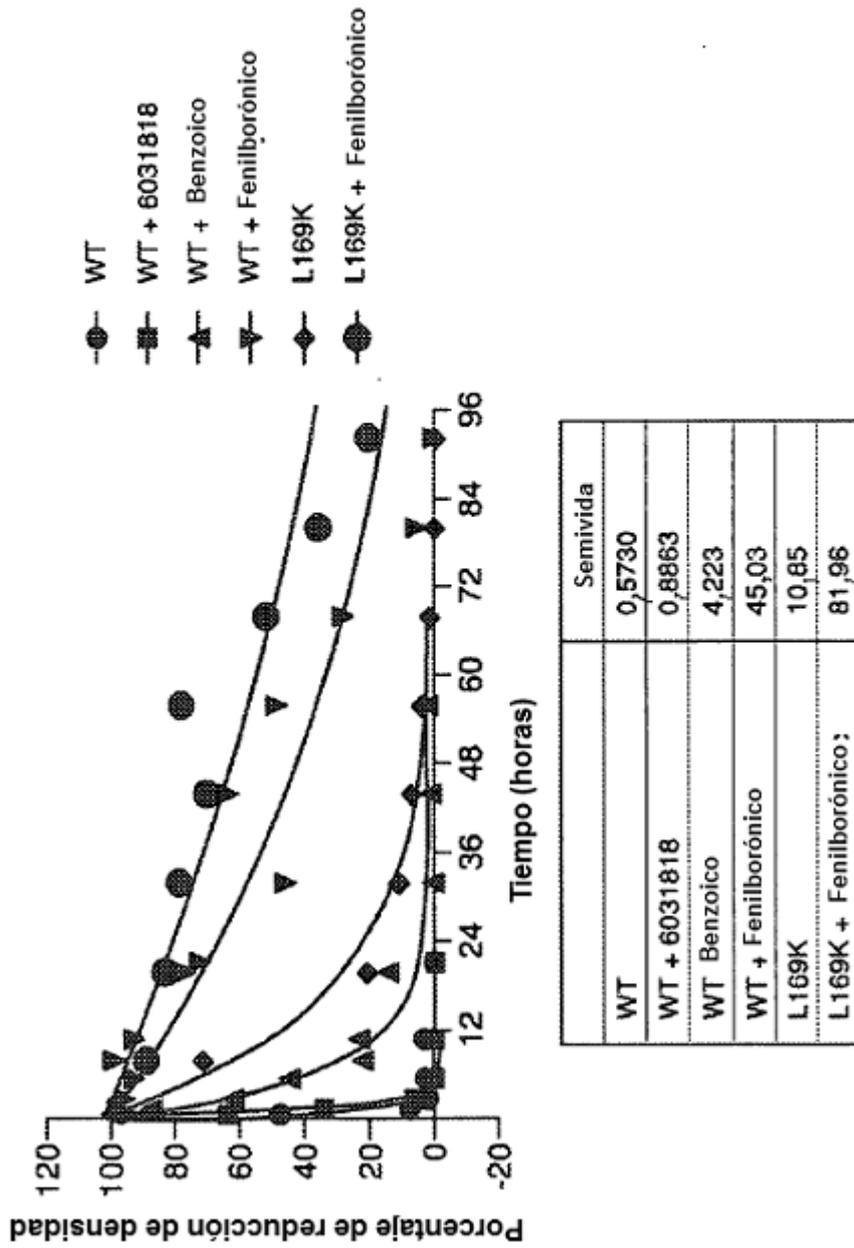


FIG. 21

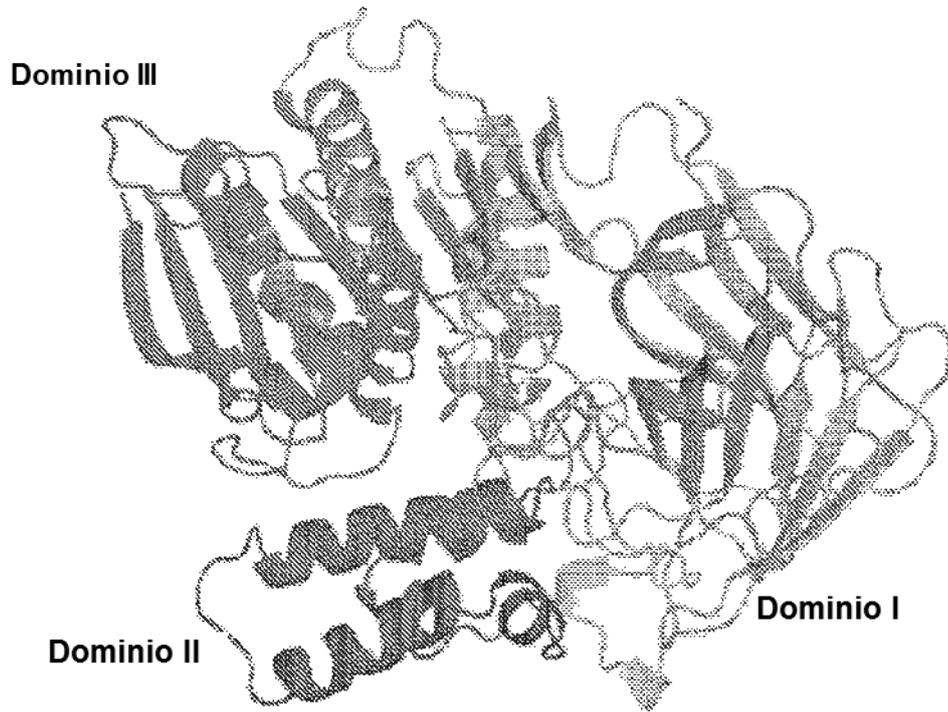


FIG. 22A

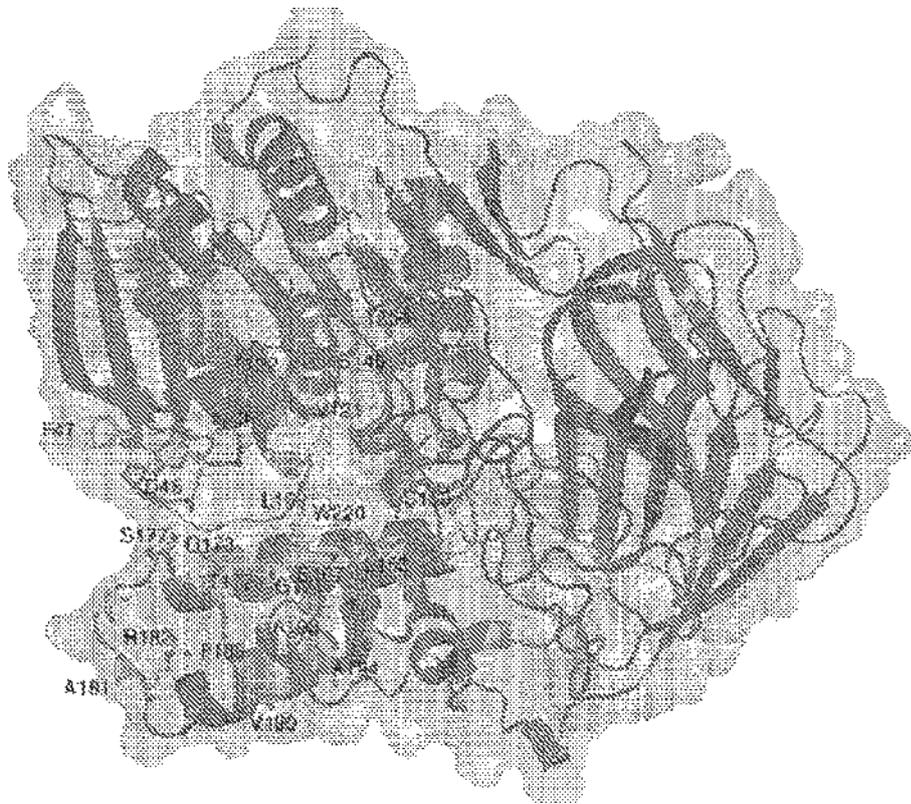


FIG. 22B

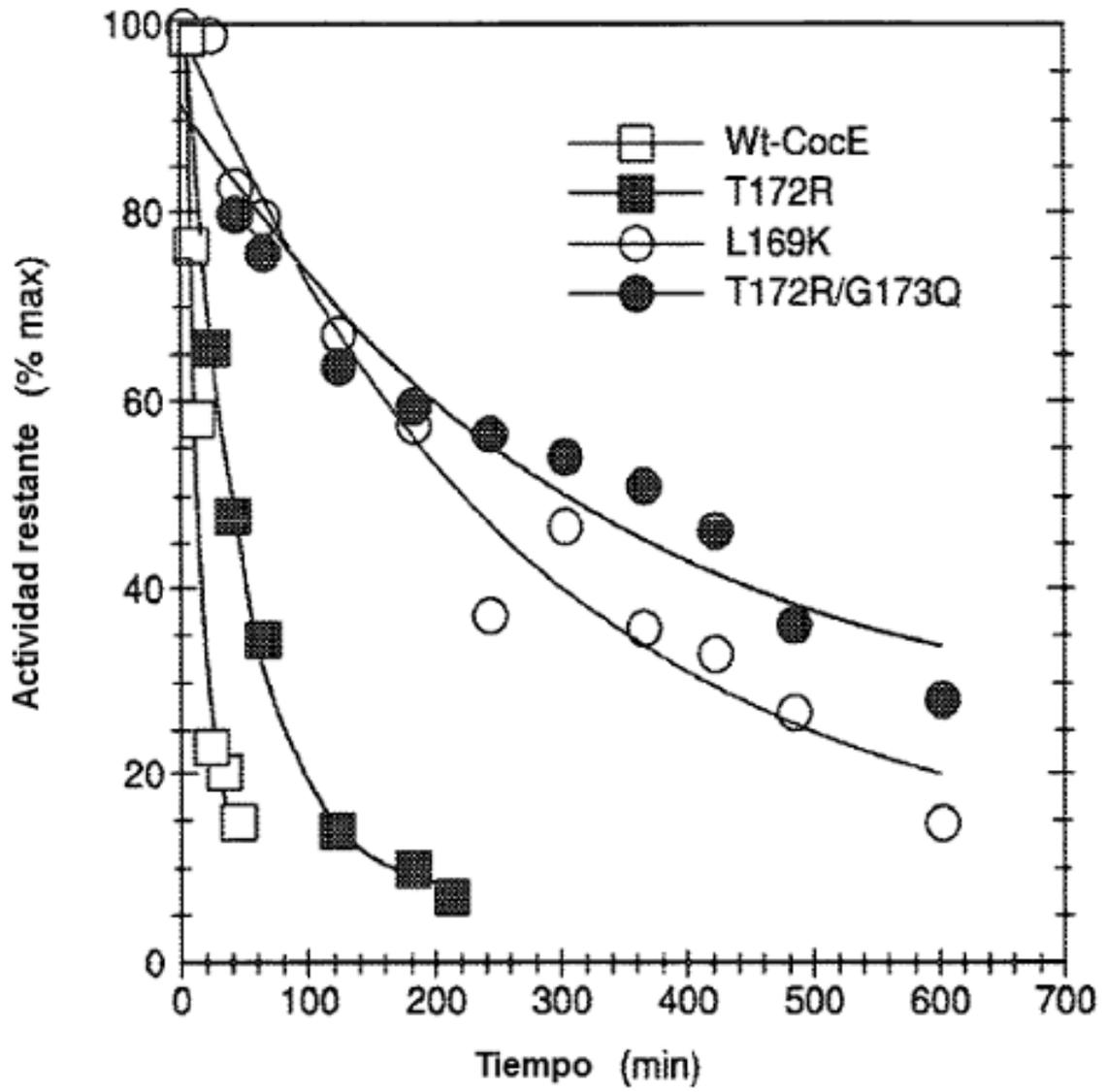


FIG. 23

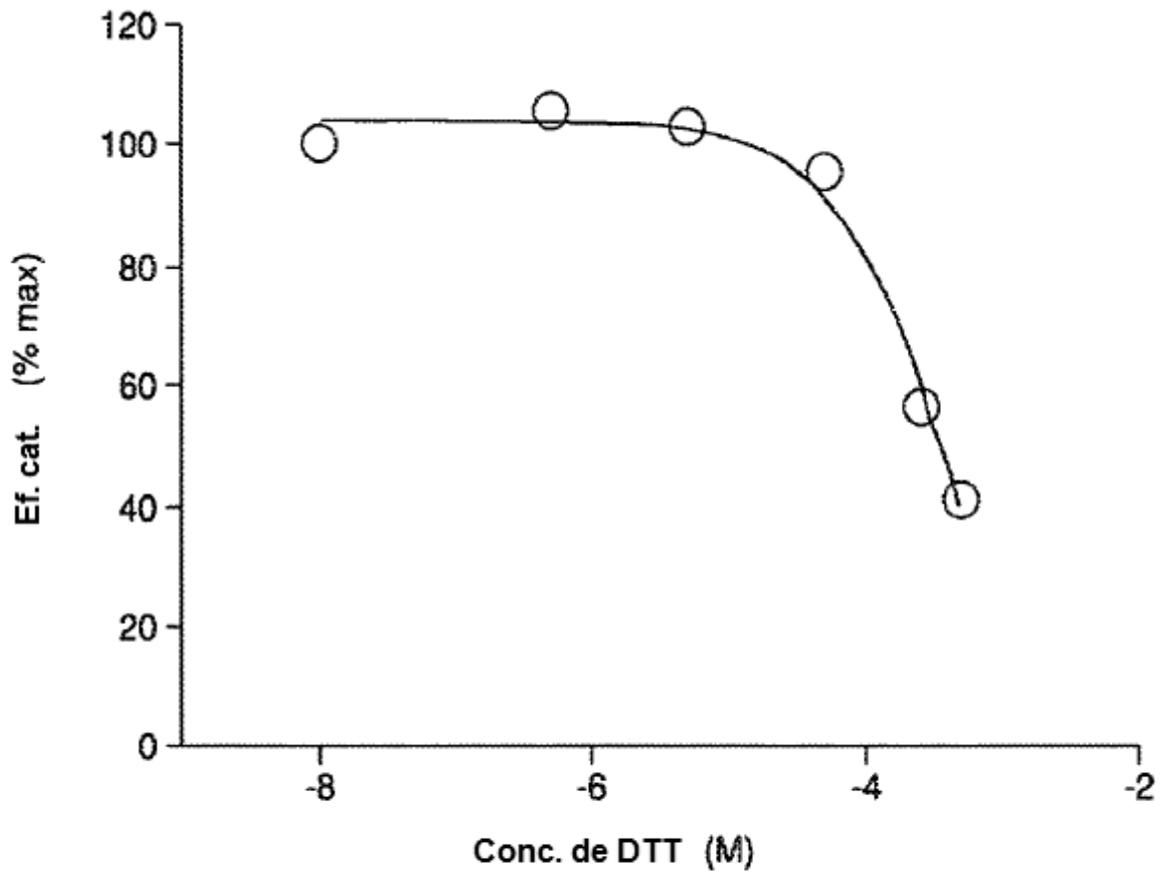
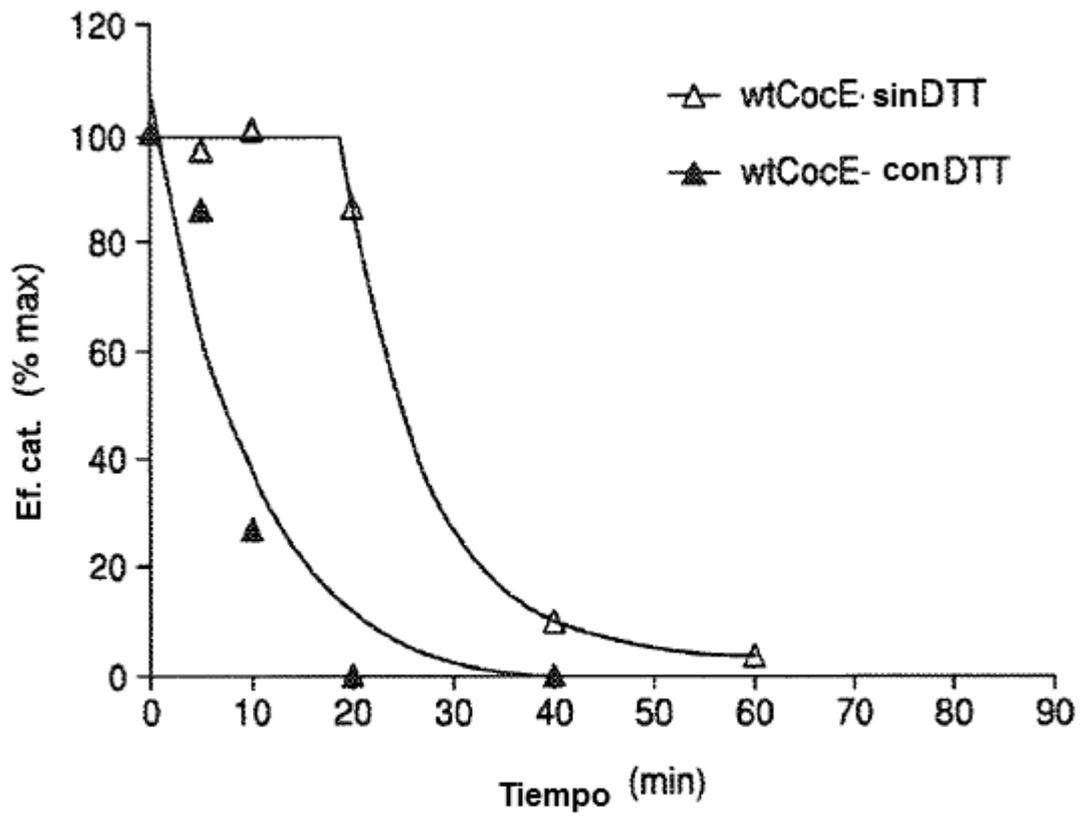


FIG. 24

**FIG. 25**

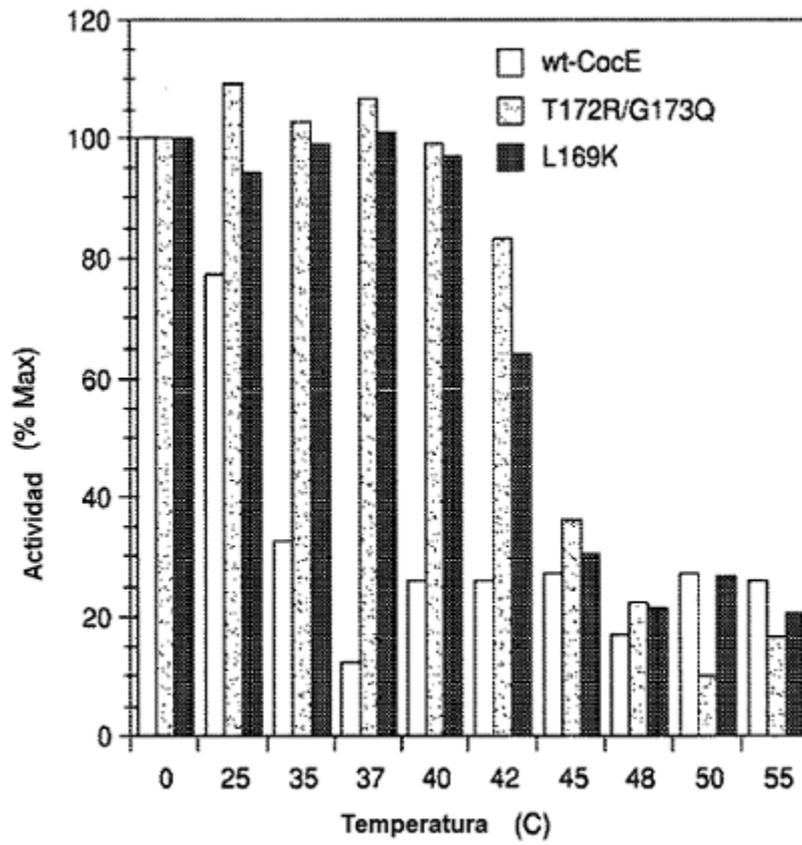


FIG. 26

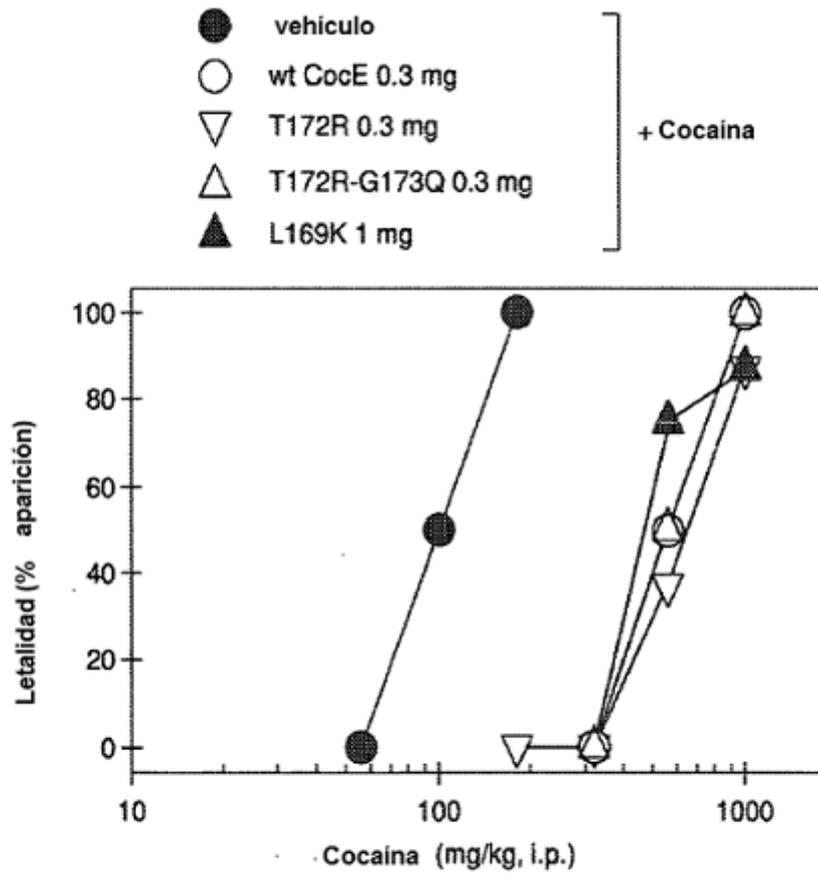


FIG. 27

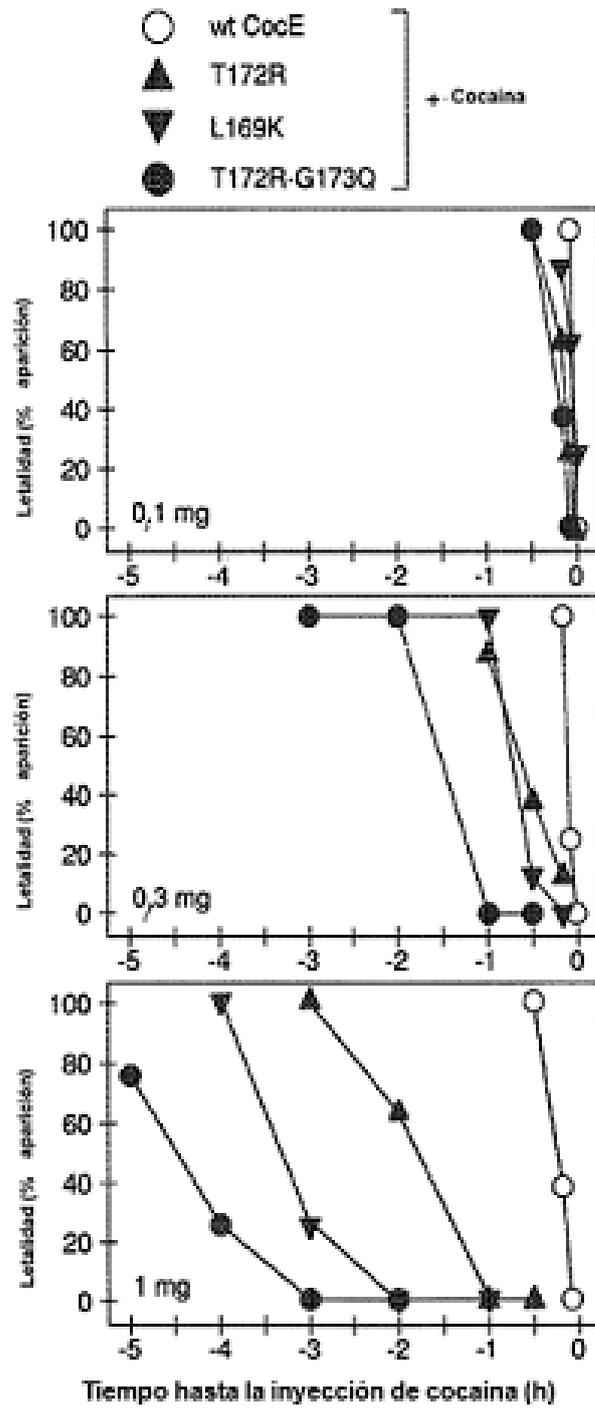


FIG. 28

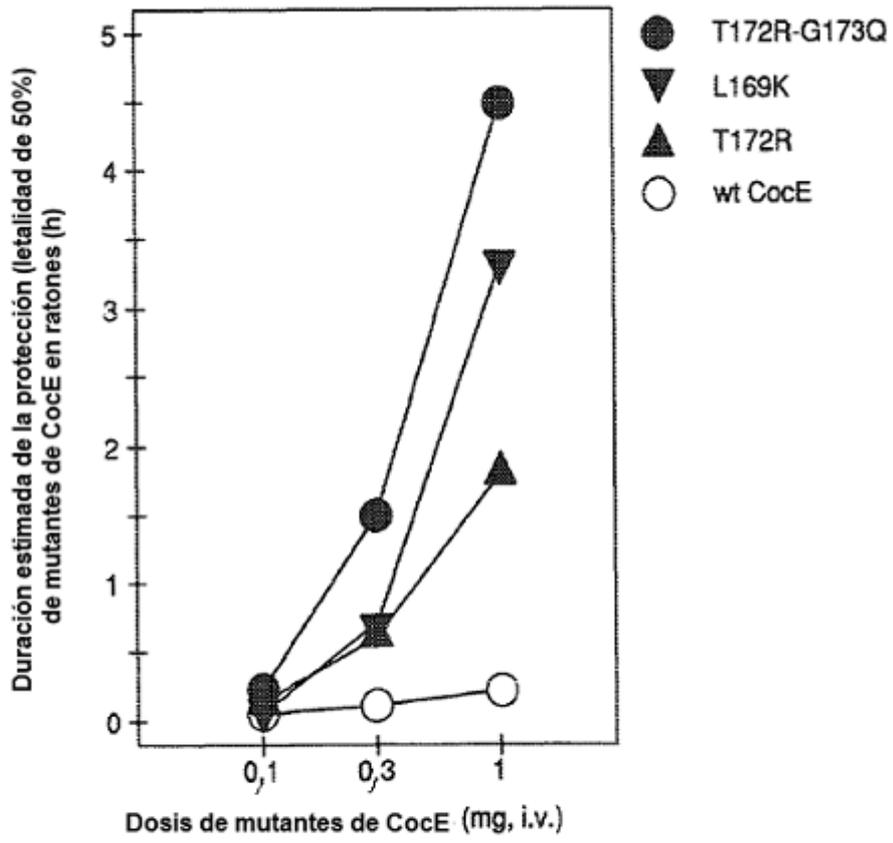


FIG. 29

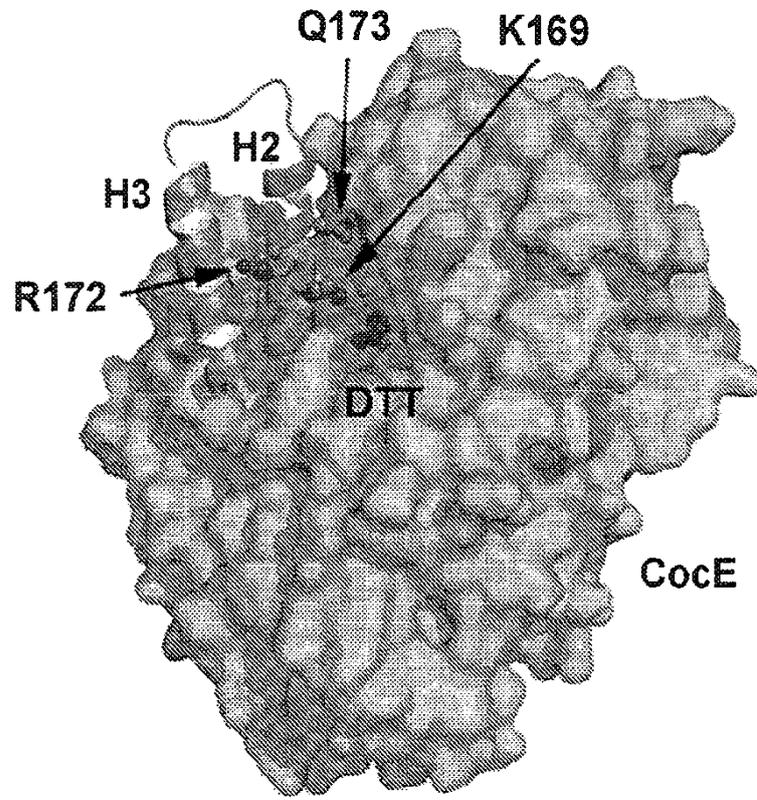


FIG. 30

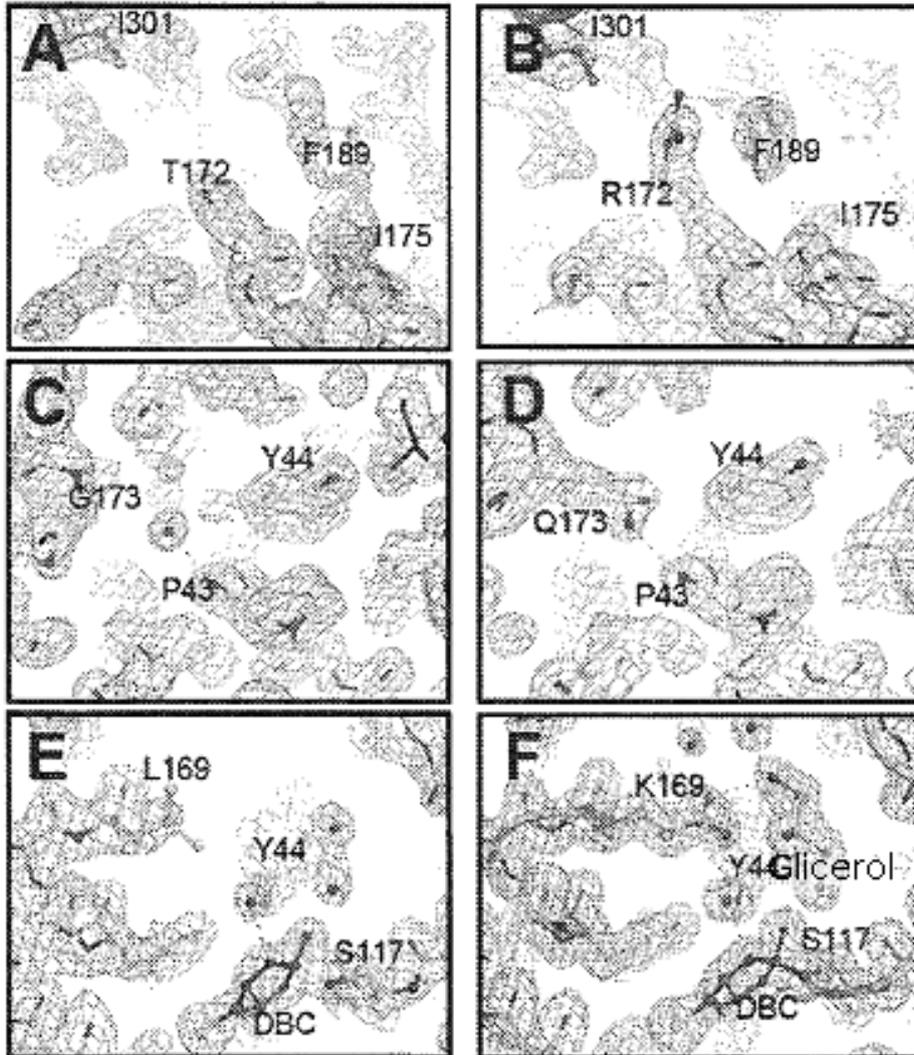


FIG. 31

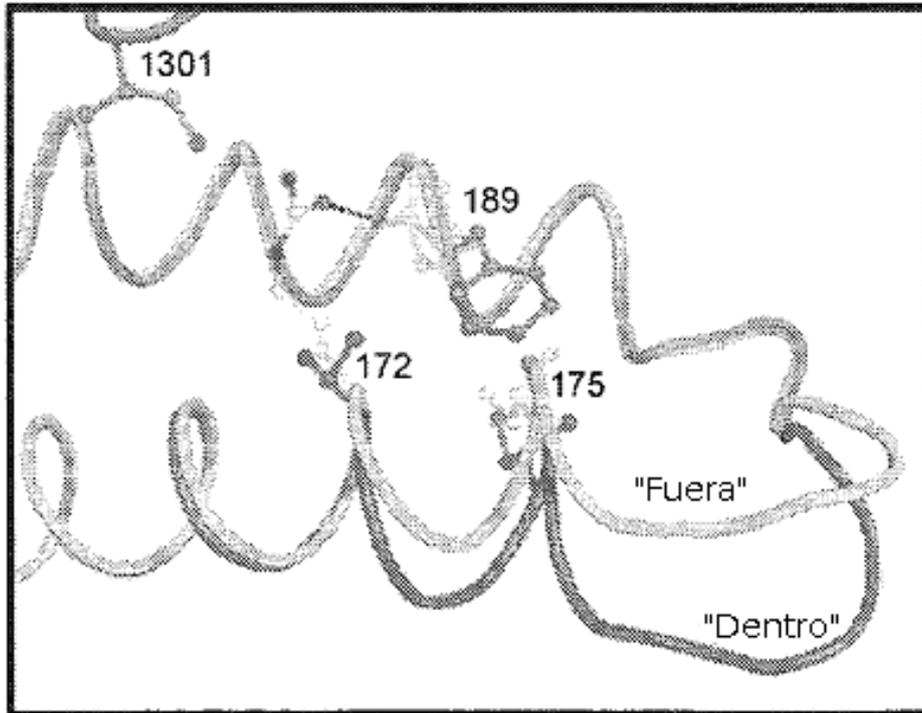


FIG. 32

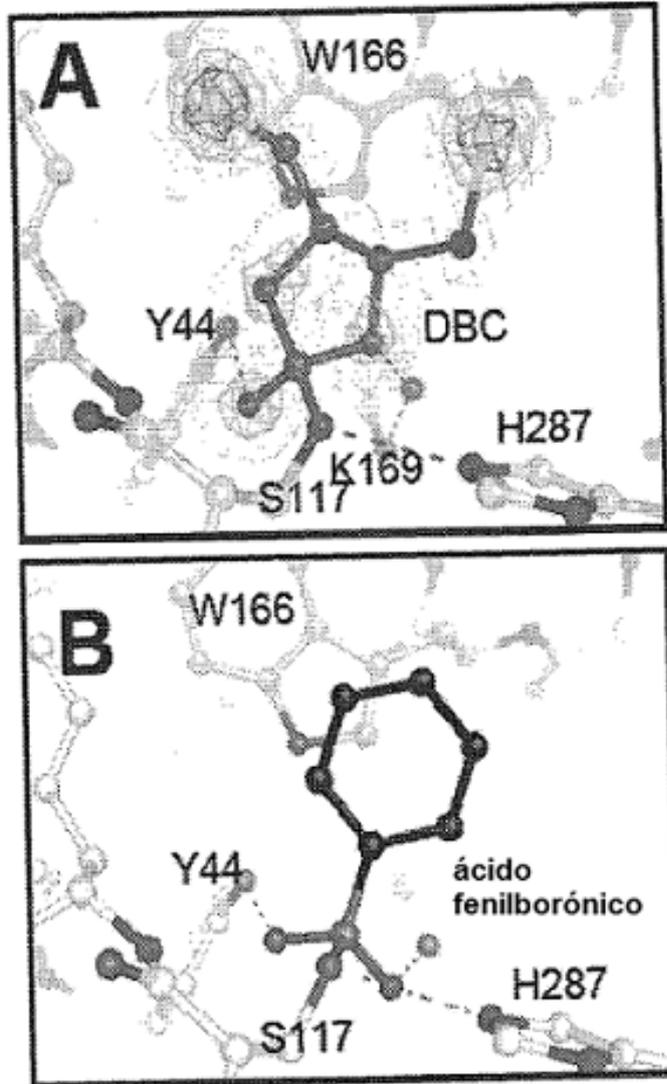
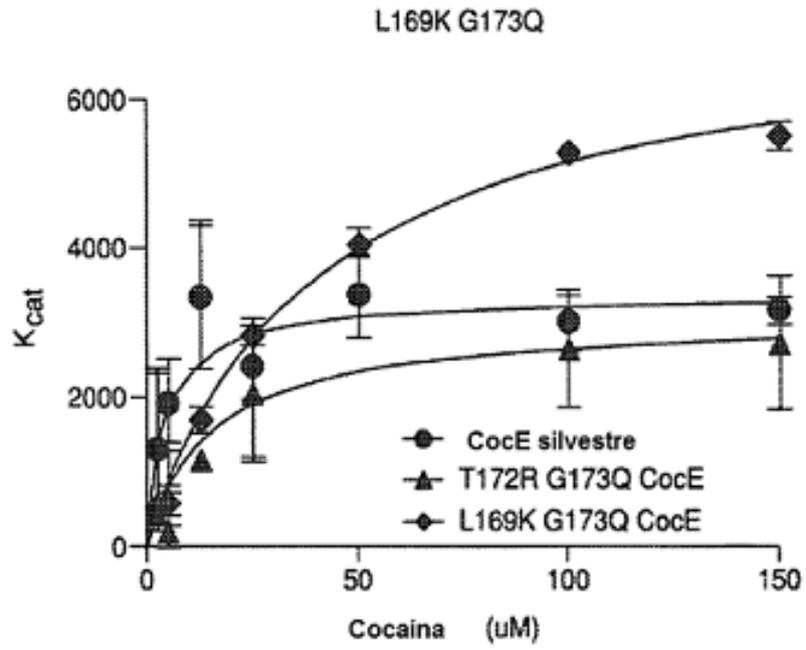


FIG. 33



Cocaina esterasa	K _{cat} (min ⁻¹)	K _m (uM)	Eficiencia catalitica K _{cat} (min ⁻¹)/K _m (M)
Silvestre	3337	4	8,3 X 10 ⁸
T172R G173Q	3082	14	2,2 X 10 ⁸
T169K G173Q	7245	40	1,8 X 10 ⁸

FIG. 34

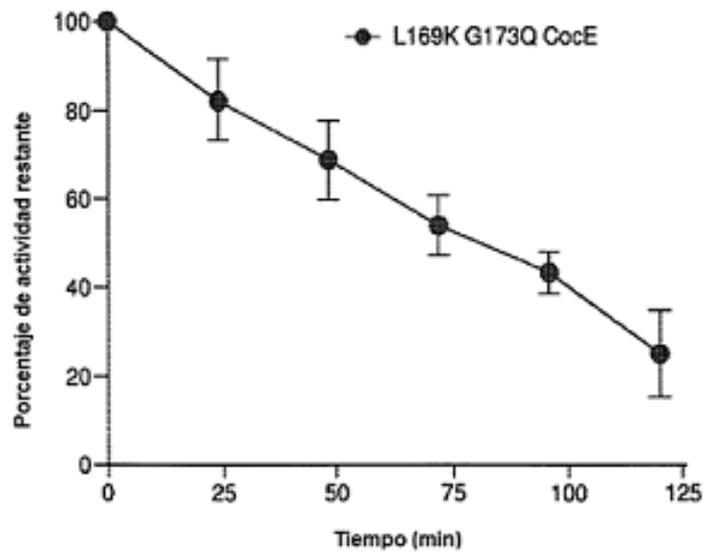
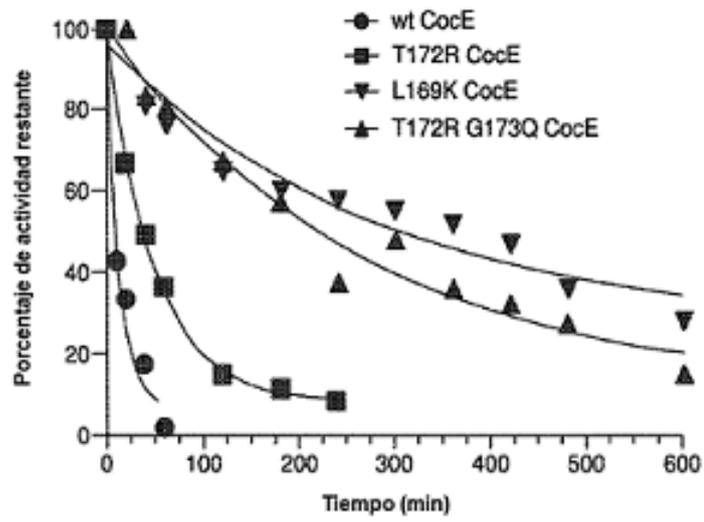


FIG. 35

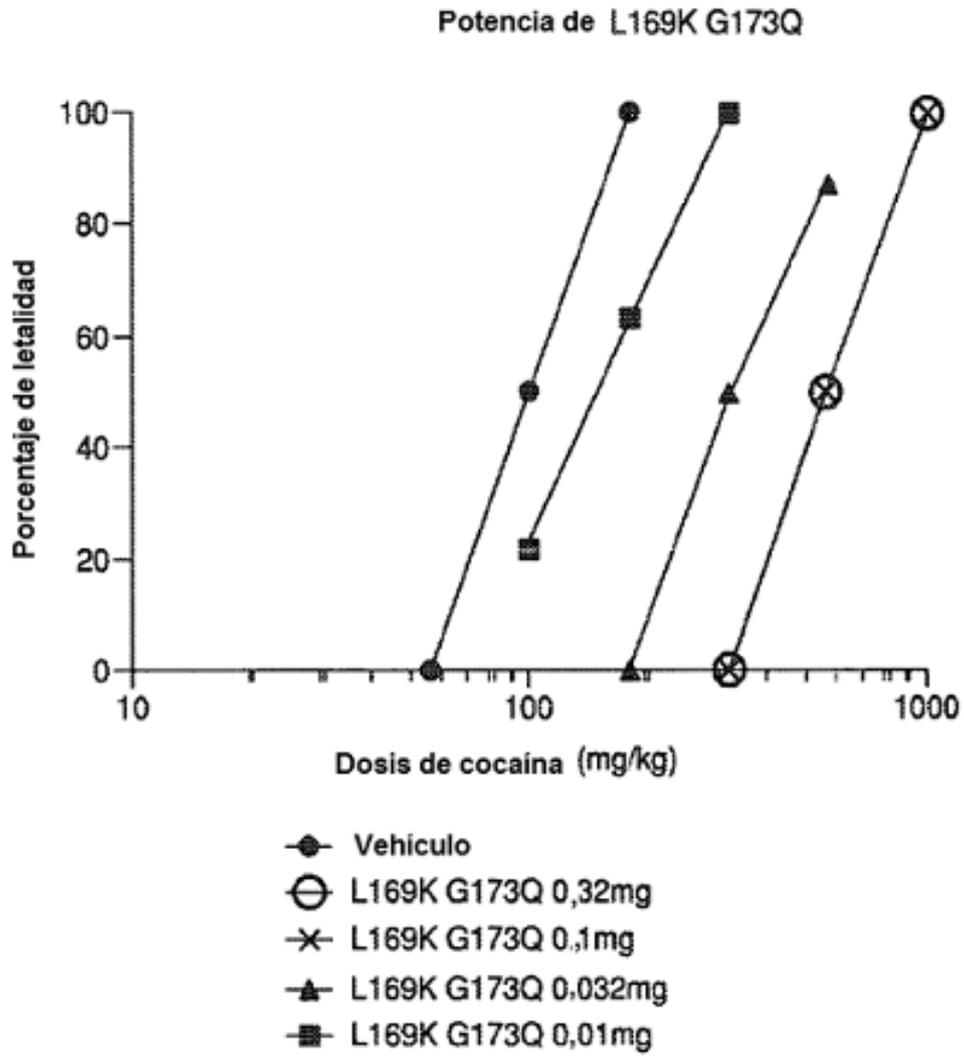


FIG. 36

FIG. 37A

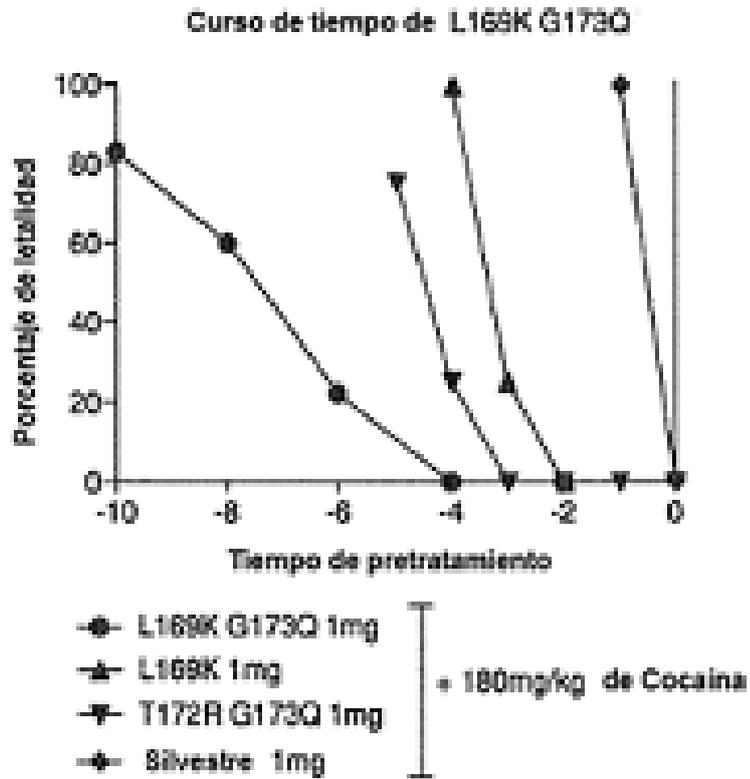


FIG. 37B

