



PCT

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

10-2809

21. EXPEDIENTE N.º

54. TITULO TERMOESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK y THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

NEW YORK, NY, US y ANN ARBOR, MI, US

DOMICILIO

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTÀ, D.C.

Fr. 10-02-2010 Tit. 21

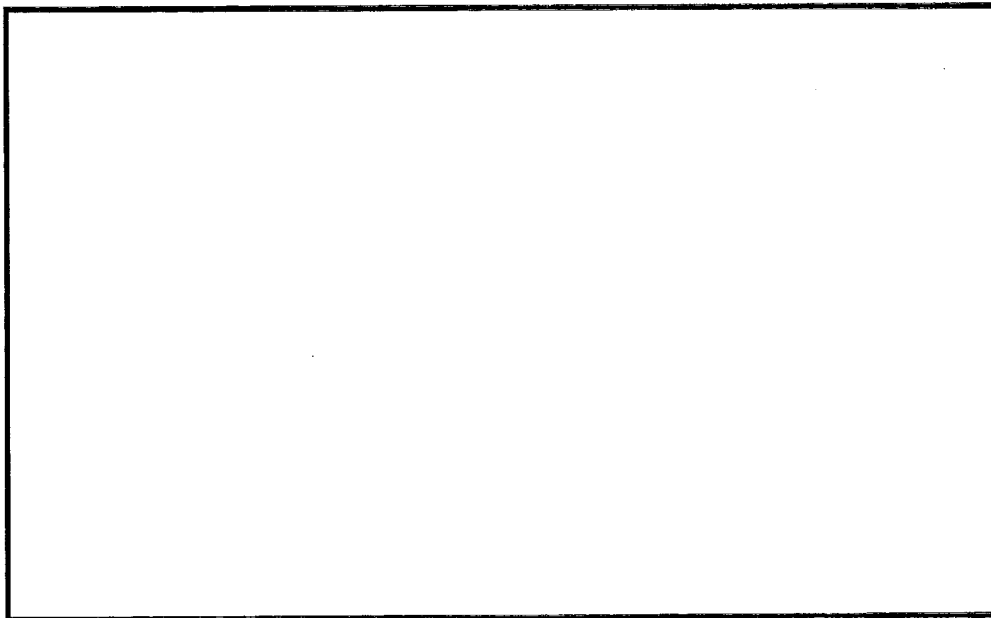
PETITORIO			
AS: 112.689		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 10-002809- -00000-0000 Fecha: 2010-01-13 16:23:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 157	
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA			
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL			
1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.			
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.			
2	SOLICITANTE (71)	Nombre: THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK y THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN Dirección: 412 Low Memorial Library, Mail Code 4308 535 West 116th Street New York, New York 10027, US; The University of Michigan 1214 S. University Avenue, 2nd Floor Ann Arbor, Michigan 48104, US (respectivamente). Nacionalidad o Domicilio: US Lugar de Constitución: US Teléfono: Fax: E-mail	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3	REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Calle 70A #4 – 41, Bogotá, Colombia. Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200 E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 80.410.337 TP 57492
4	INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Donald LANDRY, Joanne MACDONALD, Milan N. STOJANOVIC, Roger K. SUNAHARA, Diwahar NARASIMHAN, James H. WOODS, John J. G.TESMER, Remy L. BRIM. Dirección: 29 Claremont Avenue Apartment 2-South New York, New York 10027, US; 605 W. 156th Street Apartment 40 New York, New York 10032, US; 243B Whiteman Street Fort Lee, New Jersey 07024, US; 1130 Olivia Avenue Ann Arbor, Michigan 48104, US; 258 Village Green Boulevard Apartment 201 Ann Arbor, Michigan 48105, US; 650 North Fourth Avenue Ann Arbor, Michigan 48104, US; 2450 Adare Road Ann Arbor, Michigan 48104, US; 28239 Ridgebrook Road Farmington Hills, Michigan 48334, US (Respectivamente). Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.	
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2008/069659</u> Fecha <u>10.07.2008</u> Publicación Internacional No <u>WO2009/009669 A3</u> Fecha <u>15.01.2009</u>			
6 Título (54): <u>TERMOESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS</u>			
7 Clasificación Internacional (51): <u>A61K38/46</u>			
8 Prioridad		(33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐		US	10.07.2007
		US	13.11.2007
		(31) Número de Solicitud	
		60/948,976	
		60/987,661	
9 Comprobante de pago No. <u>10-1.256; 09-74.018/19/20/21; 09-65.091; 10-2.159</u> Fecha <u>08-01-2010</u>			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.			

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 554.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional. Bajo el Art. 34.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales. \$2.782.000 (107*\$26.000)

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA: [Signature]

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

3
112689

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 1,256
FECHA : ENERO 6 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002809- -00000-0000

Fecha: 2010-01-13 16:23:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 157

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104946402	06/01/2010	98,466,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CASH : 09 - 74,018
FECHA : SEPTIEMBRE 30 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002809- -00000-0000

Fecha: 2010-01-13 16:23:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 157

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTÁ	062754387	774104	30/09/2009	57,821,560.00

***** CONCEPTO *****

CANT. REENTISTADO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	*** CANCELACION REGISTRO MARCANIO POR	650,000.00
	TOTAL :	\$ 650,000.00

SUN: SEISCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CASH APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

112 689

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 74,019
FECHA : SEPTIEMBRE 30 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002809- -00000-0000

Fecha: 2010-01-13 16:23:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 157

==== CONSIGNACION ====

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	774104	30/09/2009	57,821,550.00

==== CONCEPTO ====

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		*** CANCELACION REGISTRO MARCAIO POR	650,000.00
		TOTAL :	\$ 650,000.00

SON: SEISCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

112689⁶

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 74,020
FECHA : SEPTIEMBRE 30 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002809- -00000-0000

Fecha: 2010-01-13 16:23:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 157

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BRIARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	774104	30/09/2009	57,821,560.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	*** CANCELACION REGISTRO MARCAPIO POR
			TOTAL : \$ 650,000.00

SON: SEISCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

112689⁷

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800126089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 74,021
FECHA : SEPTIEMBRE 30 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002809-00000-0000

Fecha: 2010-01-13 16:23:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 157

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIBARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	774104	30/09/2009	57,821,560.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		*** CANCELACION REGISTRO MARCAID POR	650,000.00
		TOTAL :	5 650,000.00

SON: SEISCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

8
112699

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002809- -00000-0000

Fecha: 2010-01-13 16:23:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 157

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 65,091
FECHA : SEPTIEMBRE 2 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	06275438/	114278894	01/09/2009	39,305,440.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	162,000.00
		TOTAL :	\$ 162,000.00

SON: CIENTO SESENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

112689⁹

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 2,159
FECHA : ENERO 8 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-002809- -00000-0000

Fecha: 2010-01-13 16:23:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 157

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662330	07/01/2010	9.849,600.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR	20.000.00
		TOTAL :	\$ 20.000.00

SON: VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/069659

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

GENDLOFF, Elie, H.
Sonnenschein Nath & Rosenthal LLP
P.O. Box 061080, Wacker Drive Station, Sears
Tower
Chicago, IL 60606-1080
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 11 December 2009 (11.12.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 88800730-109	
International application No. PCT/US2008/069659	International filing date (day/month/year) 10 July 2008 (10.07.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address WOODS, James, H.	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN The University of Michigan 1214 S. University Avenue, 2nd Floor Ann Arbor, Michigan 48104 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The person in Box 2 has been added as applicant for all designated States except US. Status of the person in Box 1 has changed to be inventor (for all designated States) and applicant for US only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Qiu Anman
Facsimile No. +41 22 338 89 65	e-mail pt02.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 08

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 January 2009 (15.01.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/009669 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 38/46 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/069659

(22) International Filing Date: 10 July 2008 (10.07.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/948,976 10 July 2007 (10.07.2007) US
60/987,661 13 November 2007 (13.11.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK [US/US]; 412 Low Memorial Library, Mail Code 4308, 535 West 116th Street, New York, New York 10027 (US).

(71) Applicant and
(72) Inventor: WOODS, James, H. [US/US]; 650 North Fourth Avenue, Ann Arbor, Michigan 48104 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LANDRY, Donald [US/US]; 29 Claremont Avenue, Apartment 2-South, New York, New York 10027 (US). MACDONALD, Joanne [AU/US]; 605 W. 156th Street, Apartment 40, New York, New York 10032 (US). STOJANOVIC, Milan, N. [US/US]; 243B Whiteman Street, Fort Lee, New

Jersey 07024 (US). SUNAHARA, Roger, K. [CA/US]; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, Michigan 48104 (US). NARASIMHAN, Diwahar [IN/US]; 258 Village Green Boulevard, Apartment 201, Ann Arbor, Michigan 48105 (US). TESMER, John, J., G. [US/US]; 2450 Adare Road, Ann Arbor, Michigan 48104 (US). BRIM, Remy, L. [US/US]; 28239 Ridgebrook Road, Farmington Hills, Michigan 48334 (US).

(74) Agent: GENDLOFF, Elie, H.; Sonnenschein Nath & Rosenthal LLP, P.O. Box 061080, Wacker Drive Station, Sears Tower, Chicago, IL 60606-1080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: THERMOSTABILIZATION OF PROTEINS

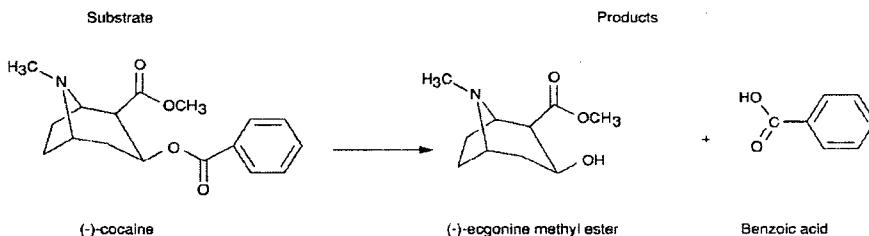


FIG. 1

(57) Abstract: Provided are compositions comprising a cocaine esterase (CocE) and a compound that thermostabilizes the CocE. Also provided are methods of thermostabilizing a cocaine esterase. Additionally provided are methods of treating a mammal undergoing a cocaine-induced condition. Methods of determining whether a compound is a thermostabilizing agent for a protein are also provided. Uses of the above-described compositions for the treatment of a cocaine-induced condition is additionally provided. Additionally provided is an isolated nucleic acid encoding a CocE polypeptide having the substitutions L169K and G173Q, and the CocE polypeptide encoded by that nucleic acid, and pharmaceutical compositions thereof. Further provided is the use of that composition for the manufacture of a medicament for the treatment of a cocaine-induced condition and for the treatment of a cocaine-induced condition.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual

Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional

15 de Enero de 2009 (15.01.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2009/009669 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 31/505 (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2008/069659

(22) Fecha de Presentación Internacional:

10 de Julio de 2008 (10.07.2008)

(25) Idioma de Presentación:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:

60/948,976 10 de julio de 2007 (10.07.2007) US
60/987,661 13 de noviembre de 2007 (13.11.2007) US

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con excepción de US): THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK [US/US]; 412 Low Memorial Library, Mail Code 4308, 535 West 116th Street, New York, New York 10027 (US).

(71) Solicitante, e

(72) Inventor: WOODS, James, H. [US/US]; 650 North Fourth Avenue, Ann Arbor, Michigan 48104 (US).

(72) Inventores, e

(75) Inventores/Solicitantes (para US únicamente): LANDRY, Donald [US/US]; 29 Claremont Avenue, Apartment 2-South, New York, New York 10027 (US). MACDONALD, Joanne [AU/US]; 605 W. 156th Street, Apartment 40, New York, New York 10032 (US). STOJANOVIC, Milan, N. [US/US]; 243B Whiteman Street, Fort Lee, New Jersey 07024 (US). SUNAHARA, Roger, K. [CA/US]; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, Michigan 48104 (US). NARASIMHAN, Diwahar [IN/US];

258 Village Green Boulevard, Apartment 201, Ann Arbor, Michigan 48105 (US). TESMER, John, J., G. [US/US]; 2450 Adare Road, Ann Arbor, Michigan 48104 (US). BRIM, Remy, L. [US/US]; 28239 Ridgebrook Road, Farmington Hills, Michigan 48334 (US).

Agentes: GENDLOFF, Elie, H.; Sonnenschein Nath & Rosenthal LLP, P.O. Box 061080, Wacker Drive Station, Sears Tower, Chicago, IL 60606-1080 (US).

(74)

Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible):

(81)

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FT, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84)

Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- con el informe internacional de búsqueda.
- antes de la fecha límite de expiración para reivindicaciones modificadas y a ser publicado nuevamente en el evento de recibirlas

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional:

16 de abril de 2009

(54) Título: TERMOESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS

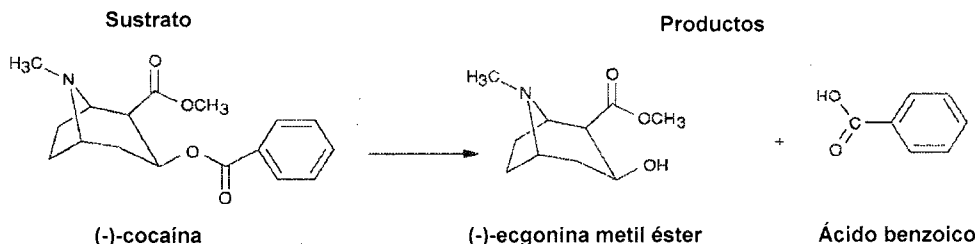


FIG. 1

(57) Extracto: Se proveen composiciones que contienen una cocaína esterasa (CocE) y un compuesto que termoestabiliza la CocE. Se proveen así mismo métodos de termoestabilizar una cocaína esterasa. Adicionalmente se proveen métodos de tratar un mamífero que sufre de una enfermedad inducida por la cocaína. Se proveen igualmente métodos de determinar si un compuesto es un agente termoestabilizador para una proteína. Adicionalmente se proveen usos de las composiciones descritas más arriba para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína. Se provee además un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de CocE, que tiene las sustituciones L169K y G173Q, y el polipéptido de CocE codificado por ese ácido nucleico, y sus composiciones farmacéuticas. Se provee también el uso de esa composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína y para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 January 2009 (15.01.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/009669 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 31/505 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/069659

(22) International Filing Date: 10 July 2008 (10.07.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/948,976 10 July 2007 (10.07.2007) US
60/987,661 13 November 2007 (13.11.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK [US/US]; 412 Low Memorial Library, Mail Code 4308, 535 West 116th Street, New York, New York 10027 (US).

(71) Applicant and

(72) Inventor: WOODS, James, H. [US/US]; 650 North Fourth Avenue, Ann Arbor, Michigan 48104 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LANDRY, Donald [US/US]; 29 Claremont Avenue, Apartment 2-South, New York, New York 10027 (US). MACDONALD, Joanne [AU/US]; 605 W. 156th Street, Apartment 40, New York, New York 10032 (US). STOJANOVIC, Milan, N. [US/US]; 243B Whiteman Street, Fort Lee, New Jersey 07024 (US). SUNAHARA, Roger, K. [CA/US]; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, Michigan 48104 (US).

NARASIMHAN, Diwahar [IN/US]; 258 Village Green Boulevard, Apartment 201, Ann Arbor, Michigan 48105 (US). TESMER, John, J., G. [US/US]; 2450 Adare Road, Ann Arbor, Michigan 48104 (US). BRIM, Remy, L. [US/US]; 28239 Ridgebrook Road, Farmington Hills, Michigan 48334 (US).

(74) Agent: GENDLOFF, Elie, H.; Sonnenschein Nath & Rosenthal LLP, P.O. Box 061080, Wacker Drive Station, Sears Tower, Chicago, IL 60606-1080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(54) Title: THERMOSTABILIZATION OF PROTEINS

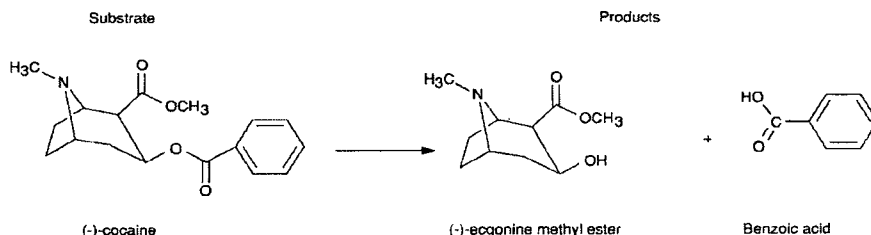


FIG. 1

(57) Abstract: Provided are compositions comprising a cocaine esterase (CocE) and a compound that thermostabilizes the CocE. Also provided are methods of thermostabilizing a cocaine esterase. Additionally provided are methods of treating a mammal undergoing a cocaine-induced condition. Methods of determining whether a compound is a thermostabilizing agent for a protein are also provided. Uses of the above-described compositions for the treatment of a cocaine-induced condition is additionally provided. Additionally provided is an isolated nucleic acid encoding a CocE polypeptide having the substitutions L169K and G173Q, and the CocE polypeptide encoded by that nucleic acid, and pharmaceutical compositions thereof. Further provided is the use of that composition for the manufacture of a medicament for the treatment of a cocaine-induced condition and for the treatment of a cocaine-induced condition.

WO 2009/009669 A2

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual

Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional

15 de Enero de 2009 (15.01.2009)

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2009/009669 A2

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 31/505 (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2008/069659

(22) Fecha de Presentación Internacional:

10 de Julio de 2008 (10.07.2008)

(25) Idioma de Presentación:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:

60/948,976 10 de julio de 2007 (10.07.2007) US
60/987,661 13 de noviembre de 2007 (13.11.2007) US

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con excepción de US): THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK [US/US]; 412 Low Memorial Library, Mail Code 4308, 535 West 116th Street, New York, New York 10027 (US).

(71) Solicitante, e

(72) Inventor: WOODS, James, H. [US/US]; 650 North Fourth Avenue, Ann Arbor, Michigan 48104 (US).

(72) Inventores, e

(75) Inventores/Solicitantes (para US únicamente): LANDRY, Donald [US/US]; 29 Claremont Avenue, Apartment 2-South, New York, New York 10027 (US). MACDONALD, Joanne [AU/US]; 605 W. 156th Street, Apartment 40, New York, New York 10032 (US). STOJANOVIC, Milan, N. [US/US]; 243B Whiteman Street, Fort Lee, New Jersey 07024 (US). SUNAHARA,

Roger, K. [CA/US]; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, Michigan 48104 (US). NARASIMHAN, Diwahar [IN/US]; 258 Village Green Boulevard, Apartment 201, Ann Arbor, Michigan 48105 (US). TESMER, John, J., G. [US/US]; 2450 Adare Road, Ann Arbor, Michigan 48104 (US). BRIM, Remy, L. [US/US]; 28239 Ridgebrook Road, Farmington Hills, Michigan 48334 (US).

(74) Agentes: GENDLOFF, Elie, H.; Sonnenschein Nath & Rosenthal LLP, P.O. Box 061080, Wacker Drive Station, Sears Tower, Chicago, IL 60606-1080 (US).

(81) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FT, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— sin informe de búsqueda internacional y a volverse a publicar al recibo de ese informe

(54) Título: TERMOESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS

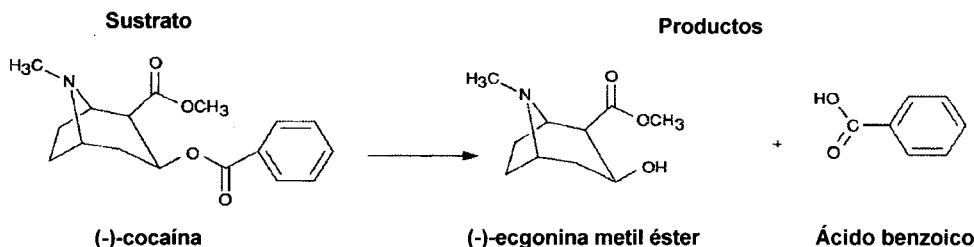


FIG. 1

(57) Extracto: Se proveen composiciones que contienen una cocaína esterasa (CocE) y un compuesto que termoestabiliza la CocE. Se proveen así mismo métodos de termoestabilizar una cocaína esterasa. Adicionalmente se proveen métodos de tratar un mamífero que sufre de una enfermedad inducida por la cocaína. Se proveen igualmente métodos de determinar si un compuesto es un agente termoestabilizador para una proteína. Adicionalmente se proveen usos de las composiciones descritas más arriba para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína. Se provee además un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de CocE, que tiene las sustituciones L169K y G173Q, y el polipéptido de CocE codificado por ese ácido nucleico, y sus composiciones farmacéuticas. Se provee también el uso de esa composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína y para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.

TERMOESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/948,976, presentada el 10 de julio de 2007, y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/987,661, presentada el 13 de noviembre de 2007, las cuales se incorporan ambas por referencia en esta especificación en su totalidad.

DCLARACIÓN CON RESPECTO A INVESTIGACIÓN O DESARROLLO PATROCINADOS CON RECURSOS FEDERALES

[0002] Esta invención se realizó con ayuda gubernamental bajo la Subvención No. DA021416-01 otorgada por los Institutos Nacionales de Salud, y la Subvención No. IIS-0324845 otorgada por la Fundación de Ciencias de la Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

CAMPO

[0003] La presente solicitud se refiere generalmente a fármacos anti-cocaína.

ANTECEDENTES

[0004] El abuso de cocaína es un problema médico y social persistente, que se resiste a la curación mediante farmacoterapia. La cocaína actúa bloqueando la recaptación de monoaminas, dopamina, norepinefrina y serotonina, prolongando y magnificando los efectos de estos neurotransmisores en el sistema nervioso central (Benowitz, 1993). La toxicidad de la cocaína se caracteriza tanto por convulsiones como por

17

disfunción cardíaca (por ejemplo, infarto del miocardio, arritmias cardíacas, aumento de la presión sanguínea, apoplejía, o aneurisma disecante y elevada demanda de oxígeno del miocardio), debido a efectos sobre los sistemas neurotransmisores y bloqueo de canal de sodio miocárdico (Bauman JL and DiDomenico, 2002; Wilson and Shelat, 2003; Knuepfer 2003). Debido a la capacidad de la cocaína de atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica y sus efectos generalizados sobre los sistemas nerviosos central y periférico, la sobredosis puede resultar en muerte súbita (véase Bauman and DiDomenico, 2002, para una recapitulación).

[0005] Aunque el mecanismo de acción de la cocaína es bien entendido, esta información no se ha traducido aún en el desarrollo de un antagonista efectivo de la cocaína que pudiera emplearse en situaciones de abuso y sobredosis. Los efectos rápidos y pleiotrópicos de la cocaína plantean un problema complejo para el tratamiento de la toxicidad aguda de la cocaína (Carroll and Kuhar, 1999). Los dos tipos de terapias que se encuentran disponibles para el tratamiento del abuso de opioideos, antagonismo (por ejemplo, naltrexona) y sustitución (por ejemplo, metadona), no registran paralelos en el caso de la cocaína, si bien se están considerando intentos hacia éstos últimos (por ejemplo, J. Grabowski et al., 2004). Un enfoque es impedir que la cocaína alcance sitios de acción, o reducir su impacto, administrando esterasas endógenas, anticuerpos específicos de la cocaína, o un anticuerpo catalítico.

[0006] La cocaína de origen natural se hidroliza en el benzoiléster por la butirilcolinesterasa sérica (BChE) en ecgonina metil éster no tóxico y ácido benzoico. En el hígado, la carboxilesterasa hCE-2 hidroliza el metil éster para producir benzoilecgonina y metanol (véase a este respecto, Figura 1). La semivida de eliminación de la cocaína en la sangre varía de 0.5 a 1.5 horas (Inaba, 1989). Ha habido unos cuantos intentos de emplear BChE de origen natural o BChE genéticamente modificada 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 utilizado un anticuerpo monoclonal, Mab 15A10, como un anticuerpo catalítico contra la cocaína (véase por ejemplo, Landry et al, 1993; Mets et al., 1998), mientras que otros están explorando la posibilidad del uso de vacunas (véase por ejemplo, Kosten et al. (2002).

[0007] Una bacteria, *Rhodococcus* sp. MB 1, nativa del suelo que rodea la planta de coca, ha desarrollado la capacidad de utilizar cocaína como su única fuente de carbono y nitrógeno. La bacteria expresa una cocaína esterasa (CocE) que actúa en la misma forma que la BChE para hidrolizar el benzoiléster de la cocaína, produciendo ecgonina metil éster y ácido benzoico (véase a este respecto, Figura 1) (Bresler et al., 2000; Turner et al., 2002); Larsen et al., 2002).

[0010] La enzima purificada (peso molecular ~65kDa) cataliza la cocaína muy eficientemente 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 mayor que las esterasas endógenas y, muy probablemente, actuaría suficientemente rápido para desintoxicar humanos que se hayan tomado una dosis excesiva de cocaína (Landry et al., 1993; Mets et al., 1998). Adicionalmente, la esterasa metaboliza asimismo cocaetileno, un potente metabolito de la cocaína y alcohol, casi tan eficientemente como metaboliza la cocaína ($k_{cat} = 94 \text{ s}^{-1}$ y $K_m = 1600 \text{ nM}$) (Turner et al., 2002; Larsen et al., 2002).

[0011] Un aspecto de la CocE *Rhodococcus* que limita su utilidad es su baja termoestabilidad – su $t_{1/2}$ a 37 °C es de alrededor de 15 minutos, mientras que su $t_{1/2}$ a 4 °C es >6 meses (Solicitud de Patente PCT PCT/US2007/015762, incorporada por referencia en esta especificación). La termoestabilidad se manipuló genéticamente en la CocE, teniendo varias proteínas mutantes una $t_{1/2}$ incrementada a 37 °C de hasta ~ 326 min (*Id.*).

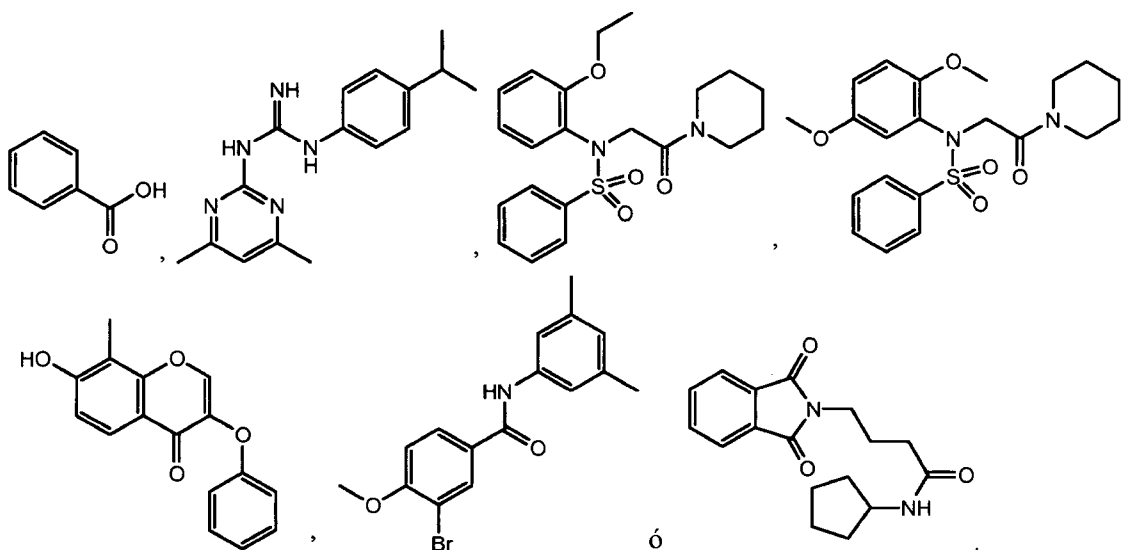
[0012] Existe una necesidad de métodos y composiciones adicionales para la termoestabilización de CocE. La presente invención aborda esa necesidad.

SUMARIO

[0013] Los inventores han descubierto que ciertos compuestos termoestabilizan la CocE natural ("wild-type CocE") y termoestabilizan así mismo mutantes de CocE, que ya eran más termoestables que la CocE natural.

[0014] Por consiguiente, la solicitud se dirige a composiciones que contienen una cocaína esterasa (CocE) y un compuesto, en donde la CocE en la presencia del compuesto es más termoestable que la CocE en la ausencia del compuesto.

[0015] La solicitud se dirige igualmente a métodos de termoestabilizar una cocaína esterasa (CocE). Los métodos comprenden combinar la CocE con el compuesto



[0016] La solicitud se dirige adicionalmente a métodos de tratar un mamífero que padece una enfermedad inducida por la cocaína. Los métodos

20

comprenden administrar la composición ya descrita al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la enfermedad inducida por la cocaína en el mamífero.

[0017] Adicionalmente, la solicitud se dirige a métodos de tratar un mamífero que sufre una sobredosis de cocaína. Los métodos comprenden administrar la composición ya descrita al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la cocaína en el mamífero.

[0018] La solicitud se dirige así mismo a métodos de tratar un mamífero que tiene una dependencia de la cocaína. Los métodos comprenden administrar la composición descrita más arriba al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la dependencia de la cocaína en el mamífero.

[0019] Así mismo, la solicitud se dirige a métodos de determinar si un compuesto es un agente termoestabilizador para una proteína. Los métodos comprenden medir la termoestabilidad de la proteína con y sin el compuesto. Con estos métodos, un compuesto que hace que la proteína sea más termoestable es un agente termoestabilizador para la proteína.

[0020] La solicitud se dirige igualmente al uso de las composiciones ya indicadas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.

[0021] La solicitud se dirige adicionalmente al uso de las composiciones ya indicadas para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.

[0022] Se ha descubierto de igual forma que el mutante de CocE L169K/G173Q tiene un grado inesperadamente alto de termoestabilidad. Véase Ejemplo 5.

[0023] En consecuencia, la solicitud se dirige adicionalmente a un ácido nucleico aislado, que codifica un polipéptido de CocE, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido de CocE codificado tiene (a) las sustituciones L169K y G173Q, y (b) actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37 °C, comparada con la CocE natural.

[0024] La solicitud se dirige igualmente al polipéptido de CocE el cual comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido de CocE codificado tiene las sustituciones L169K y G173Q, y actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37 °C, comparada con la CocE natural. Se proveen así mismo composiciones que contienen el polipéptido en una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable.

[0025] En incorporaciones adicionales, la solicitud se dirige a un método de tratar un mamífero que sufre una enfermedad inducida por la cocaína. El método comprende administrar la composición inmediatamente descrita más arriba al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la enfermedad inducida por la cocaína en el mamífero. Se contempla igualmente el uso de esa composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína, como lo es el uso de esa composición para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0026] FIG. 1 muestra el metabolismo de cocaína catalizada por la cocaína esterasa (CocE) *Rhodococcus*.

[0027] FIG. 2 son gráficos de la desnaturalización de la cocaína en el transcurso del tiempo en la presencia y ausencia de CocE.

[0028] FIG. 3 muestra el metabolismo de 4-nitrofenil acetato (4NPA) catalizado por CocE y gráficos de la desnaturalización de 4NPA en el transcurso del tiempo en la presencia y ausencia de CocE.

[0029] FIG. 4 es una fotografía de un gel no desnaturalizante que muestra la agregación de CocE después de 1 hora de incubación bajo varias condiciones y en la presencia o ausencia de sustratos o productos.

[0030] FIG. 5 es un gráfico de un análisis espectrofotométricos de la estabilización de cocaína durante escisión de 4NPA en la presencia de varias concentraciones de cocaína.

[0031] FIG. 6 son gráficos que muestran un análisis espectrofotométrico cinético de la estabilización de CocE por ácido benzoico, ecgonina metil éster o acetato de sodio.

[0032] 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 por ácido fenilborónico (PBA - *phenylboronic acid*)

[0033] FIG. 8 es un gráfico que muestra la termoestabilización de CocE por ácido benzoico.

[0034] FIG. 9 es un gráfico que muestra los resultados de una identificación sistemática ("*a screening*") de 40 compuestos con respecto a la capacidad de termoestabilizar la CocE, junto con las estructuras químicas de los compuestos más efectivos.

23

[0035] FIG. 10 son gráficos y la estructura del compuesto 6031818 que muestran resultados de estudios sobre la capacidad de ese compuesto de inhibir la CocE.

[0036] FIG. 11 son gráficos y la estructura del compuesto 6031818 que muestran la capacidad de ese compuesto de termoestabilizar CocE cuando 4NPA o cocaína se emplean como sustratos.

[0037] FIG. 12 son gráficos y la estructura del compuesto 6169221 que muestran resultados de estudios sobre la capacidad de ese compuesto de inhibir la CocE.

[0038] FIG. 13 son gráficos y la estructura del compuesto 6169221 que muestran la capacidad de ese compuesto de termoestabilizar la CocE cuando 4NPA o cocaína se emplean como sustratos.

[0039] FIG. 14 son gráficos y la estructura del compuesto 5804236 que muestran resultados de estudios sobre la capacidad de ese compuesto de inhibir la CocE.

[0040] FIG. 15 son gráficos y la estructura del compuesto 5804236 que muestran la capacidad de ese compuesto de termoestabilizar la CocE cuando 4NPA o cocaína se emplean como sustratos.

[0041] FIG. 16 son gráficos que caracterizan aún más, por dicroísmo circular, la estabilidad de la CocE natural y el mutante T172R

[0042] FIG. 17 son gráficos que caracterizan aún más, por dicroísmo circular, la estabilidad de la CocE natural en la presencia de ácido benzoico o ácido fenilborónico.

[0043] FIG. 18 son gráficos que caracterizan aún más, por dicroísmo

circular, la estabilidad del mutante L169K de CocE en la ausencia o presencia de ácido fenilborónico.

[0044] FIG. 19 son gráficos que caracterizan aún más, por dicroísmo circular, la estabilidad de la CocE natural en la presencia o ausencia del compuesto 6031818.

[0045] FIG. 20 es fotografías de geles no desnaturalizantes que muestran los resultados de un análisis de la CocE natural y el mutante L169K de CocE en la presencia de varias moléculas pequeñas, luego de la incubación a 37 °C para varios puntos de tiempo.

[0046] FIG. 21 es un gráfico y tabla que muestran los resultados de un análisis de semivida por densitometría de detalle ("*a spot densitometry half-life analysis*") de los geles mostrados en FIG. 20.

[0047] FIG. 22 son diagramas que muestran la estructura de cocaína esterasa. Panel A. La cocaína esterasa se compone de tres dominios distintos, tal como se indica. Panel B. Mutaciones puntuales previstas por métodos computacionales se superponen a la estructura cristalina de CocE natural. Las coordenadas se obtuvieron de la base de datos RCSB (pdb: 1JU4) por Larsen et al., (2002). Se generaron modelos de estructura y se llevaron a imágenes digitales tridimensionales con PyMol (DeLano Scientific, Palo Alto, CA).

[0048] FIG. 23 es un gráfico que muestra la descomposición en la actividad CocE a 37 °C. 50 ng/ml de CocE natural y los mutantes se incubaron a 37 °C y se midió la actividad (Xie et al., 1999) en el transcurso del tiempo. Se midieron las semividas de las curvas resultantes. La CocE natural, T172R, L169K y T172R/G173Q mostraron semividas de 12 minutos, 46 minutos, 274 minutos y 326 minutos, respectivamente.

27

[0049] FIG. 24 es un gráfico que muestra que DTT inhibe la CocE natural en una manera dependiente de la concentración con una $IC_{50} \sim 390 \mu M$.

[0050] FIG. 25 es un gráfico que muestra que la presencia de DTT (10 mM) acorta *in vitro* la τ_{inact} en CocE natural.

[0051] FIG. 26 es un gráfico que muestra la descomposición, dependiente de la temperatura, en la actividad esterasa. 50 ng/ml de CocE natural y los mutantes se pre-incubaron durante 30 minutos a las temperaturas indicadas ($^{\circ}C$) y se midió la actividad (Xie et al., 1999). Se ilustra la actividad restante de cada mutante (como porcentaje de la actividad máxima, V_{max} , sin pre-incubación) luego de la pre-incubación. La CocE natural (barras abiertas) parece inactivarse entre 30-35 $^{\circ}C$, mientras que el T172R/G173Q (barras sombreadas) y el L169K (sólidas) exhiben ambos estabilidad térmica mejorada (inactivación a 40-45 $^{\circ}C$).

[0052] FIG. 27 es un gráfico que muestra los efectos protectores de la CocE contra la toxicidad inducida por la cocaína. La CocE (1 mg) se administró intravenosamente 1 minuto antes de la administración de la cocaína (mg/kg, i.p.). Se trazaron curvas de respuesta a la dosis de la mortalidad inducida por cocaína en la ausencia o presencia de CocE o mutantes. Cada punto de datos representa el porcentaje de ratones ($n=6$ para cada condición de dosificación), que exhiben mortalidad inducida por la cocaína.

[0053] FIG. 28 son gráficos que muestran el transcurso del 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 dosificación), que exhiben mortalidad inducida por la cocaína. CocE o mutantes (0.1 mg, 0.3 mg, 1 mg i.v.) se administraron en diferentes puntos de tiempo antes de la administración de la cocaína (180 mg/kg, i.p.).

[0054] FIG. 29 es un gráfico que muestra la duración calculada de protección para una mortalidad del 50%. El tiempo requerido para alcanzar una mortalidad del 50% para la CocE y cada mutante se midió de los datos en FIG. 28 y se graficó contra la dosificación.

[0055] FIG. 30 es un diagrama que muestra una visión de conjunto la de CocE y las mutaciones termoestabilizadoras. Las hélices H2 y H3 de la CocE se muestran como espirales, y el resto de la CocE como una superficie molecular. La molécula de DTT que se observa ligada en nuestras estructuras cristalinas indica la posición relativa del sitio activo, en una cavidad adyacente a la hélice H2. Se indican las tres mutaciones estabilizadoras identificadas. La mutación T172R lleva a interacciones de van der Waals entre R172 (hélice H2) y F189 (hélice H3). La mutación G173Q puentea la hendidura del sitio activo con un nuevo enlace de hidrógeno (líneas sombreadas). La mutación L169K incide en el sitio activo. Tanto DTT como glicerol se observan en el sitio activo en esta estructura cristalina, exhibiendo K169 múltiples conformaciones y formando enlaces de hidrógeno con glicerol. Nótese que L169 se ordena deficientemente en la estructura natural. K169 forma contactos directos adicionales con Y44. El glicerol se une donde se espera que se una el anillo tropano de cocaína, mientras que DTT ocupa el sitio de unión de la fracción bencilo. Se generó un modelo de la estructura y se llevó a imagen digital tridimensional con PyMol (DeLano Scientific, Palo Alto, CA).

[0056] FIG. 31 son diagramas que muestran la estructura de los mutantes termoestables. Las estructuras cristalinas de alta resolución de T172R (B), G173Q (D) y L169K (F) se comparan con las estructuras de CocE natural (A, B y C, respectivamente). El efecto general de los mutantes parece resultar de interacciones mejoradas entre la hélice 1 y 2 del dominio II (R172 y F189) o interacciones inter-dominio (Q173 con P44 y K169 con el sitio activo). Las estructuras de L169K en comparación con CocE natural

en la presencia de 2-oxo-dioxolano butiril carbonato (DBC – *oxodioxolane butyryl carbonate*) en el sitio activo ilustran la interacción mejorada del residuo de lisina con agua y el sitio activo. Las densidades electrónicas $2F_oF_c$ se perfilaron en 1 sigma.

[0057] 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 intensificadoras con F189. Aunque las dos conformaciones "in" (oscura) y "out" (clara) pueden encontrarse en las estructuras de la CocE natural, únicamente la conformación "out" se encuentra con T172R.

[0058] FIG. 33 son diagramas que muestran una comparación de DBC y ácido fenilborónico en el sitio activo de la CocE natural. Se encontró DBC enlazado covalentemente al sitio activo serina 117 de cristales desarrollados de proteína aislada con DTT. Un mapa OMIT de la molécula DBC (izquierda) muestra la densidad del carbono en 5 sigma, la densidad del oxígeno en 12 sigma y la densidad del azufre en 20 sigma. El panel derecho describe un sitio de unión divulgado previamente del análogo de estado de transición ácido fenilborónico (pdb:1JU3), el cual es análogo al sitio de unión del DBC. Se muestra la densidad del mapa OMIT para el mutante L169K, que coordina una molécula de agua con enlaces de hidrógeno al anillo DBC.

[0059] FIG. 34 es un gráfico y una tabla que muestran parámetros catalíticos de la CocE natural y dos mutantes dobles.

[0060] FIG. 35 son gráficos que muestran la pérdida *in vitro* de actividad de la CocE natural, dos mutantes de CocE (T172R y L169K) y un mutante doble, que combina las dos mutaciones individuales.

[0061] FIG. 36 es un gráfico que muestra la protección de ratones de

una dosis letal de cocaína por el mutante L169K/G173Q de CocE.

[0062] FIG. 37 son gráficos que muestran un transcurso de tiempo de protección de ratones de una dosis letal de cocaína por el mutante L169K/G173Q de CocE.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0063] Los inventores han descubierto que ciertos compuestos termoestabilizan la CocE natural y termoestabilizan además mutantes de CocE que ya eran más termoestables que la CocE natural. Véase Ejemplos 1-3.

[0064] Por consiguiente, la solicitud se dirige a composiciones que contienen una cocaína esterasa (CocE) y un compuesto, donde la CocE en la presencia del compuesto es más termostable que la CocE en la ausencia del compuesto.

[0065] El incremento resultante en termoestabilidad de la CocE en la presencia del compuesto aumenta la semivida de la enzima a 37 °C por lo menos alrededor de 5 minutos, preferiblemente por lo menos alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 minutos, o más.

[0066] La termoestabilidad de un polipéptido dado puede evaluarse por una variedad de métodos conocidos por el arte, incluyendo por ejemplo espectroscopia de dicroísmo circular (CD – *circular dichroism*) (verbigracia, como en Ejemplo 2, más adelante) o calorimetría diferencial de barrido. Véase así mismo la Solicitud de Patente PCT PCT/US2007/015762, publicada como WO/2008/008358, incorporada por referencia. Preferiblemente, la termoestabilidad se determina midiendo la actividad de la enzima en el transcurso del tiempo a una temperatura baja y alta con y sin el compuesto, para determinar si, y en qué grado, el

compuesto hace que la enzima mantenga su actividad a una temperatura más elevada 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, pueden usarse cualesquiera intervalos de temperatura. El artesano experto podría determinar el mejor intervalo de temperatura para cualquier aplicación particular sin experimentación excesiva.

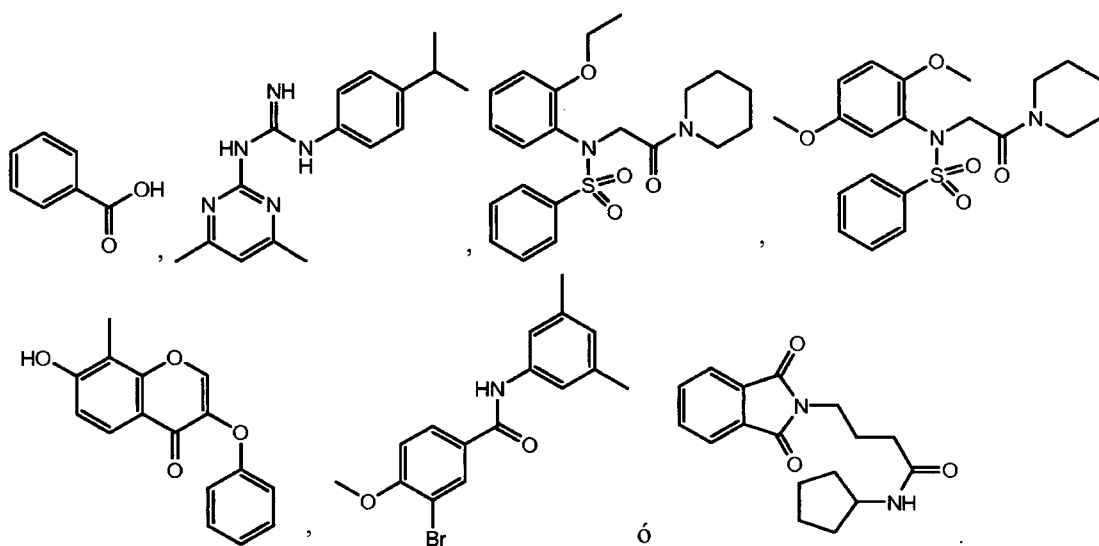
[0067] Tal como se emplea en esta especificación, una CocE es una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 1 y es capaz de catalizar específicamente la escisión de cocaína en ecgonina metil éster y ácido benzoico. Preferiblemente, la CocE tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 90%, más preferiblemente, 95%, aún más preferiblemente 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En algunas incorporaciones preferidas, la CocE tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 1.

[0068] En otras incorporaciones, la CocE tiene una mutación, tal como las descritas en la Solicitud de Patente PCT PCT/US2007/015762, incluyendo mutantes que tienen termoestabilidad incrementada sobre la natural (SEQ ID NO: 1) y mutantes que no la tienen. Mutantes preferidos son aquellos en donde la CocE tiene la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la substitución LI63V, 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 incorporaciones, la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q. En otras de estas incorporaciones, la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q.

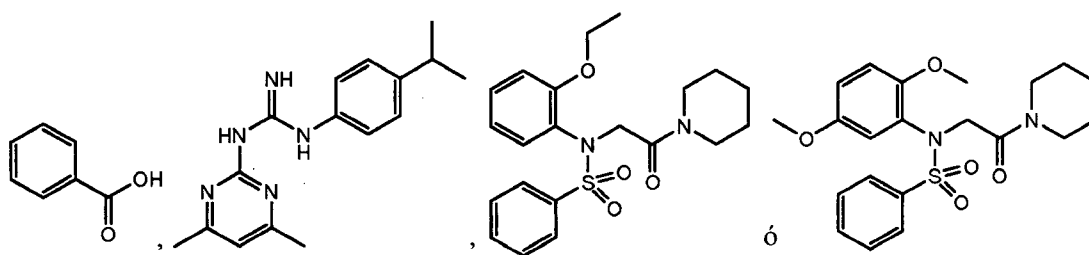
[0069] Un compuesto dentro del ámbito de estas incorporaciones puede incrementar la termoestabilidad de la CocE natural y/o una CocE mutante descritas anteriormente.

[0070] La CocE puede igualmente pegilarse o tratarse en otra forma para aumentar la duración de acción, la estabilidad al calor, y/o disminuir la inmunogenicidad. La pegilación puede potenciar así mismo la termoestabilidad de composiciones de CocE-compuesto y, cuando se utilizan *in vivo*, aumentar la semivida sérica disminuyendo la depuración renal, la proteólisis, la captación de macrófagos y la respuesta inmunológica.

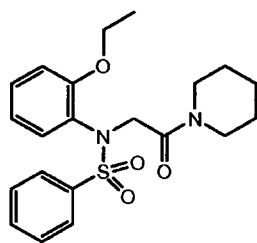
[0071] Las composiciones de CocE-compuesto pueden encapsularse en glóbulos rojos (RBC - *red blood cells*), con el fin de incrementar la duración de acción y la estabilidad al calor, y disminuir la inmunogenicidad. En composiciones preferidas, el compuesto es:



[0072] Más preferiblemente, el compuesto es

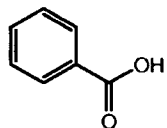


[0073] Aún más preferiblemente, el compuesto es



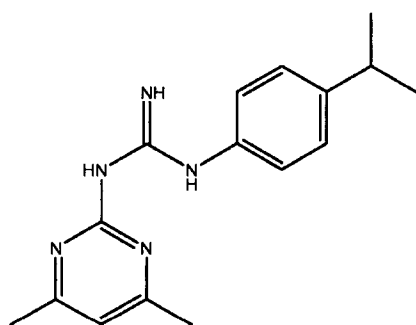
(6031818).

[0074] En otras incorporaciones preferidas, el compuesto es



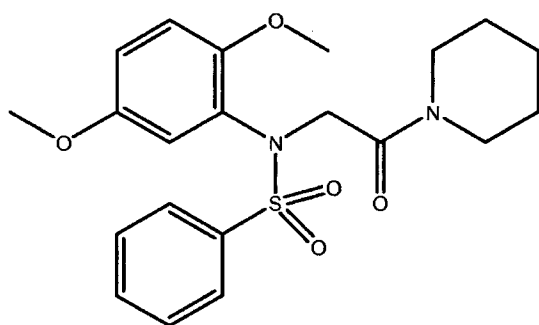
(ácido benzoico)

[0075] Así mismo el compuesto puede ser



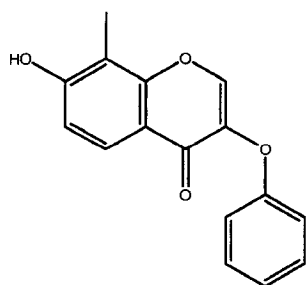
(5804236).

[0076] El compuesto puede ser adicionalmente



(6169221).

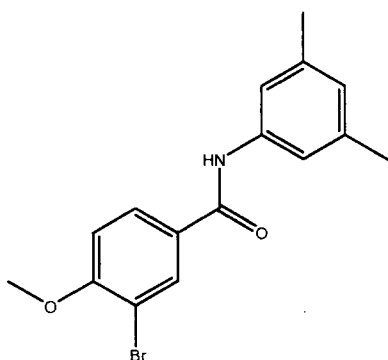
[0077] Adicionalmente, el compuesto puede ser



(F6 460).

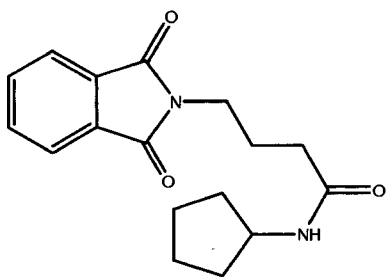
[0078] Además, el compuesto puede ser

32



(G2 30460).

[0079] Así mismo el compuesto puede ser



(G3 30390).

[0080] Las composiciones de la presente invención pueden comprender más de uno de cualquiera de los compuestos, identificados más arriba, que termoestabilizan la CocE.

[0081] En algunas incorporaciones de estas composiciones, en particular donde se usan con fines terapéuticos, la composición está en una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable.

[0082] Las composiciones de CocE-compuesto descritas en esta especificación pueden formularse por cualquier manera convencional usando una o más sustancias portadoras farmacéuticamente aceptables y/o excipientes (véase, por ejemplo, Gennaro (2005) Remington the Science and Practice of Pharmacy 21st ed. Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781746736). Tales formulaciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones de CocE-compuesto, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad apropiada de una sustancia portadora, con el fin de proveer la forma de administración adecuada al sujeto. La formulación debe adaptarse al modo de administración. Las composiciones de CocE-compuesto de uso con la

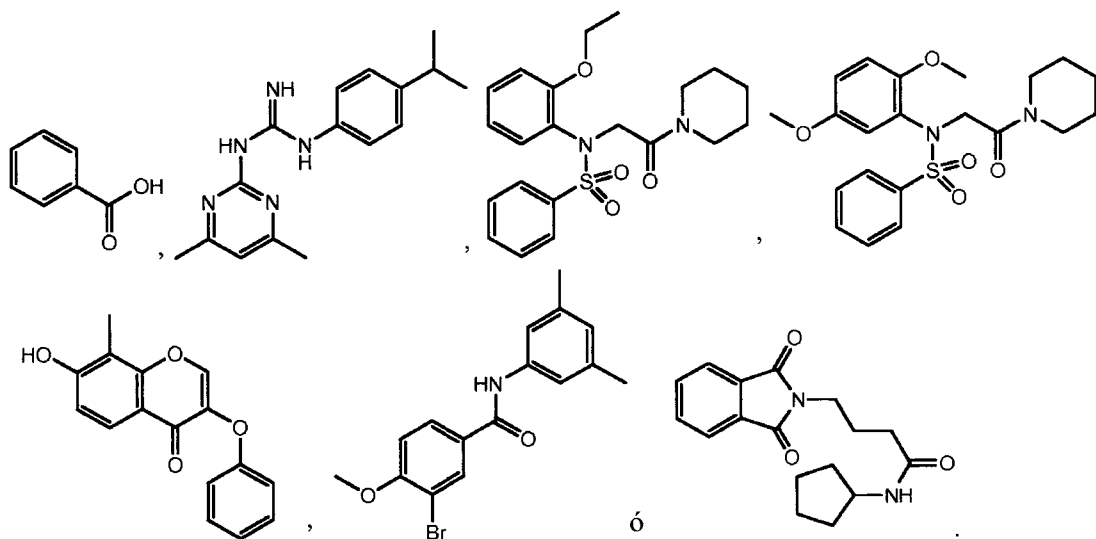
actual solicitud pueden formularse por métodos conocidos para la administración a un sujeto utilizando varias vías que incluyen, pero no se limitan a, la vía parenteral, pulmonar, oral, tópica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oftálmica, bucal y rectal. Las composiciones de CocE-compuesto pueden administrarse además en combinación con uno o más agentes adicionales divulgados en esta especificación, y/o junto con otros agentes biológicamente activos o biológicamente inertes. Tales agentes biológicamente activos o inertes pueden estar en comunicación fluida o mecánica con el agente(s) o unirse al agente(s) por fuerzas iónicas, covalentes, de Van der Waals, hidrofóbas, hidrófilas u otras fuerzas físicas.

[0083] Las composiciones de CocE-compuesto descritas en esta especificación pueden administrarse parenteralmente, incluidas las inyecciones intravenosas, intramusculares, subcutáneas o intraperitoneales. Excipientes usados comúnmente en la administración parenteral de moléculas pequeñas de medicamentos, incluidos intensificadores de solubilidad, agentes osmóticos, soluciones amortiguadoras y preservantes, pueden incluirse igualmente en formulaciones de biomoléculas. La inclusión de agentes de anti-agregación y anti-adsorción, tales como tensioactivos y albúmina, cuando se formulan y aplican biomoléculas, puede agregar una estabilidad incrementada y disminuir el riesgo de que la biomolécula interactúe con una interfase, la cual puede llevar al desdoblamiento, agregación y/o precipitación. Las composiciones de CocE-compuesto pueden liofilizarse para impartirles estabilidad adicional durante el almacenamiento, y re-procesarse antes de la administración parenteral.

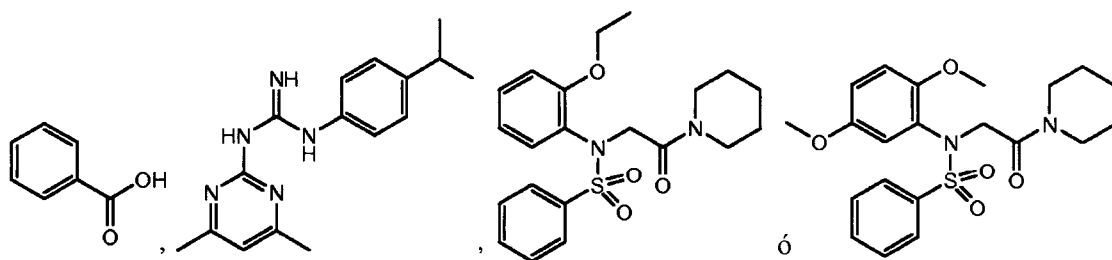
[0084] Igualmente se contempla la administración pulmonar de las composiciones de CocE-compuesto. Adicionalmente, las preparaciones de liberación controlada (o liberación sostenida) pueden formularse para ampliar la actividad del polipéptido CocE mutante y reducir la frecuencia de dosificación, como se conoce en el arte.

[0085] Las composiciones de CocE-compuesto pueden encapsularse y administrarse en una variedad de sistemas de administración de sustancias portadoras. Ejemplos de sistemas de administración de sustancias portadoras para uso con polipéptidos CocE mutantes descritos en esta especificación incluyen microesferas (véase, por ejemplo, Varde & Pack (2004) Expert Opin. Biol. 4(1) 35-51), hidrogeles (véase generalmente, Sakiyama et al. (2001) FASEB J. 15, 1300-1302), implantes poliméricos (véase generalmente, Teng et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 3024-3029), sustancias portadoras poliméricas inteligentes (véase generalmente, Stayton et al. (2005) Orthod Craniofacial Res 8, 219-225; Wu et al. (2005) Nature Biotech (2005) 23(9), 1137-1146), y liposomas (véase, por ejemplo, Galovic et al. (2002) Eur. J. Pharm. Sci. 15, 441-448; Wagner et al. (2002) J. Liposome Res. 12, 259-270).

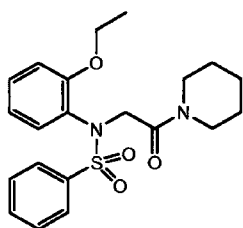
[0086] La solicitud se dirige igualmente a métodos de termoestabilizar una cocaína esterasa (CocE). Los métodos comprenden combinar la CocE con el compuesto



[0087] Preferiblemente, el compuesto es

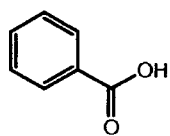


[0088] Más preferiblemente, el compuesto es



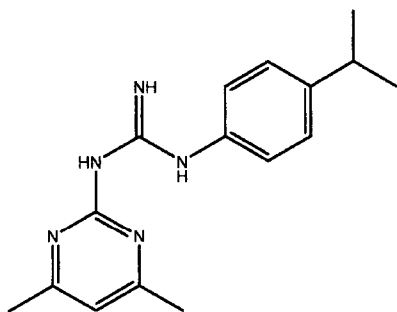
(6031818).

[0089] En otras incorporaciones preferidas, el compuesto es



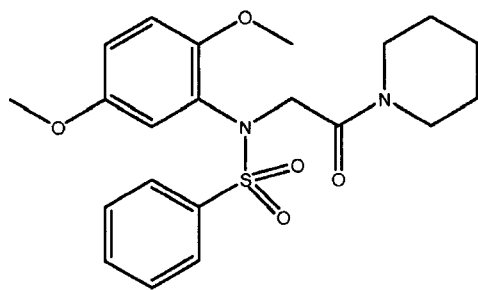
(ácido benzoico)

[0100] Así mismo el compuesto puede ser



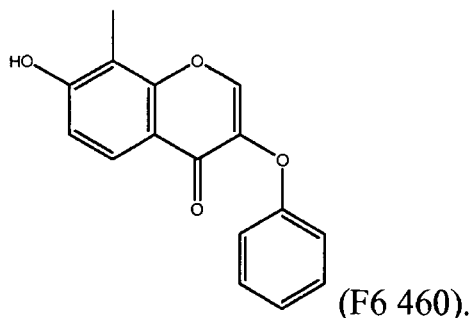
(5804236).

[0090] El compuesto puede ser adicionalmente

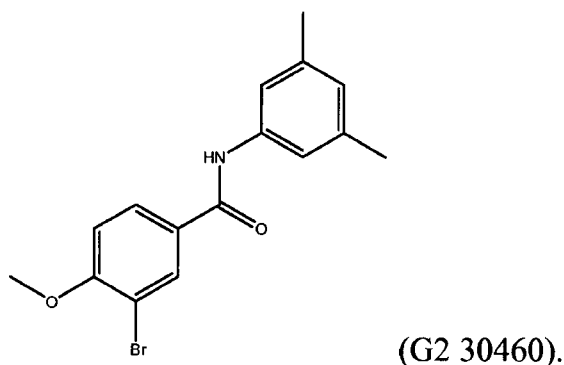


(6169221).

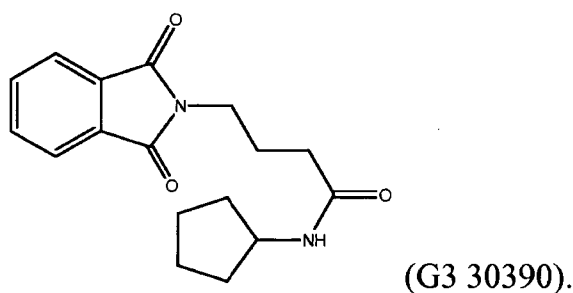
[0091] Adicionalmente, el compuesto puede ser



[0092] Igualmente, el compuesto puede ser



[0093] Así mismo el compuesto puede ser



[0094] En estos métodos, la CocE puede combinarse con más de un compuesto termoestabilizador, por ejemplo uno de los compuestos descritos más arriba, o con cualquier otro compuesto.

[0101] Preferiblemente, la CocE comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 1; más preferiblemente por lo menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 1; aún más preferiblemente por lo menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 1. En otras incorporaciones preferidas, la CocE comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En incorporaciones adicionales, la CocE es un mutante termoestable de una CocE natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Ejemplos preferidos de tales mutantes termoestables es la CocE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q. Adicionalmente, la CocE puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q.

[0102] Los métodos de estas incorporaciones pueden llevarse a cabo donde la CocE está *in vitro*, por ejemplo para termoestabilizar la CocE luego de la purificación o durante el almacenamiento. Preferiblemente, sin embargo, la CocE está en un mamífero vivo. Con el objeto de realizar esas incorporaciones, un aspecto de esta solicitud se dirige a enfoques de degradación catalítica a fármacos anti-cocaína. Se proveen tratamientos, tanto profilácticos como terapéuticos, de enfermedades inducidas por la cocaína mediante la administración de composiciones de CocE-compuesto termoestables, con actividad esterasa a un sujeto necesitado de ello. Es el aumento en termoestabilidad provisto por el compuesto termoestabilizador lo que permite una respuesta mucho más rápida y efectiva a los síntomas de la toxicidad de la cocaína que distingue a las composiciones de CocE-compuesto, descritas más arriba, de otras opciones de tratamiento.

[0103] La solicitud se dirige adicionalmente a métodos de tratar un mamífero que sufre una enfermedad inducida por la cocaína. Los métodos comprenden administrar la composición CocE-compuesto ya descrita al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la enfermedad inducida por la cocaína en el mamífero.

[0104] Una determinación de la necesidad de tratamiento se evaluará típicamente por una historia y un examen físico consistente con la afección inducida por la cocaína. Se contempla que los presentes métodos puedan usarse para tratamiento de cualquier enfermedad inducida por la cocaína incluyendo, pero sin limitación, sobredosis de cocaína, toxicidad de la cocaína y dependencia de la cocaína y/o adicción a ella. El diagnóstico de tales enfermedades se encuentra dentro de las habilidades del arte. Por

ejemplo, el diagnóstico de la toxicidad de la cocaína puede incluir la valoración de convulsiones, convulsiones tónicoclónicas generalizadas ("*grand-mal seizures*"), paro cardíaco, infarto del miocardio, arritmias cardíacas, presión sanguínea elevada, apoplejía, psicosis inducida por drogas, aneurisma disecante y elevada demanda de oxígeno del miocardio. Como otro ejemplo, en el caso de dependencia de la cocaína y/o adicción a ella, los síntomas de abstinencia incluyen sensaciones subjetivas de disforia moderada a severa, depresión, ansiedad, o irritabilidad. Los sujetos con una necesidad identificada de terapia incluyen aquellos con una afección diagnosticada, inducida por la cocaína, un indicio de una afección inducida por la cocaína, y sujetos que han sido tratados, están siendo tratados, o serán tratados por una afección inducida por la cocaína. Estos métodos pueden emplearse para tratar cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitación, roedores, conejos, conejillos de Indias, caballos, vacas, perros, gatos, ovejas y cerdos y, muy preferiblemente, humanos.

[0105] Una cantidad efectiva de las composiciones de CocE-compuesto descritas en esta especificación es generalmente aquella que puede reducir la toxicidad de la cocaína o la gravedad de una afección inducida por la cocaína. La reducción en la gravedad incluye, por ejemplo, una detención o una disminución en los síntomas, indicadores fisiológicos, marcadores bioquímicos, o indicadores metabólicos. Cuando se usa en los métodos de la invención, una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones de CocE-compuesto descritas en esta especificación puede emplearse en forma pura o, donde tales formas existen, en forma de sal farmacéuticamente aceptable y con o sin un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las composiciones de CocE-compuesto pueden administrarse con una relación razonable riesgo/beneficio aplicable a cualquier tratamiento médico, en una cantidad suficiente para reducir sustancialmente la concentración de cocaína en la sangre y/o tejidos del sujeto.

[0106] La toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones de CocE-compuesto pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células y/o animales experimentales para determinar la LD₅₀ (la dosis letal al 50% de la población) y la ED₅₀, (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población, u otros parámetros.

[0107] La cantidad de las composiciones de CocE-compuesto que puede combinarse con una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable para producir una presentación farmacéutica única variará dependiendo del hospedero tratado y del modo particular de administración. Se observará por los expertos en el arte que el contenido unitario de agente contenido en una dosis individual de cada presentación farmacéutica no necesita constituir en sí mismo una cantidad terapéuticamente efectiva, ya que la cantidad terapéuticamente efectiva necesaria podría alcanzarse mediante administración de un número de dosis individuales. La administración de la composición de CocE-compuesto puede ocurrir como un episodio único o durante el tiempo de ciclo de tratamiento. Por ejemplo, la composición de CocE-compuesto puede administrarse diaria, semanal, bi-semanal, o mensualmente. Para algunas afecciones, el tratamiento puede prolongarse desde varias semanas a varios meses, o incluso un año o más.

[0108] El nivel específico de dosis terapéuticamente efectiva para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores, incluida la afección inducida por la cocaína que se está tratando y la gravedad de la afección inducida por la cocaína; la actividad del polipéptido CocE mutante empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la semivida plasmática del polipéptido CocE mutante; la velocidad de excreción del polipéptido CocE mutante empleado; la duración del tratamiento; los medicamentos utilizados en combinación o coincidentes con el polipéptido CocE mutante empleado; y factores similares bien conocidos en las artes 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). Se entenderá por un facultativo experto que la utilización diaria total de las composiciones de CocE-compuesto para uso en incorporaciones de la invención, divulgada en esta especificación, se decidirá sin experimentación excesiva por el médico especialista dentro del ámbito de un juicio médico acertado.

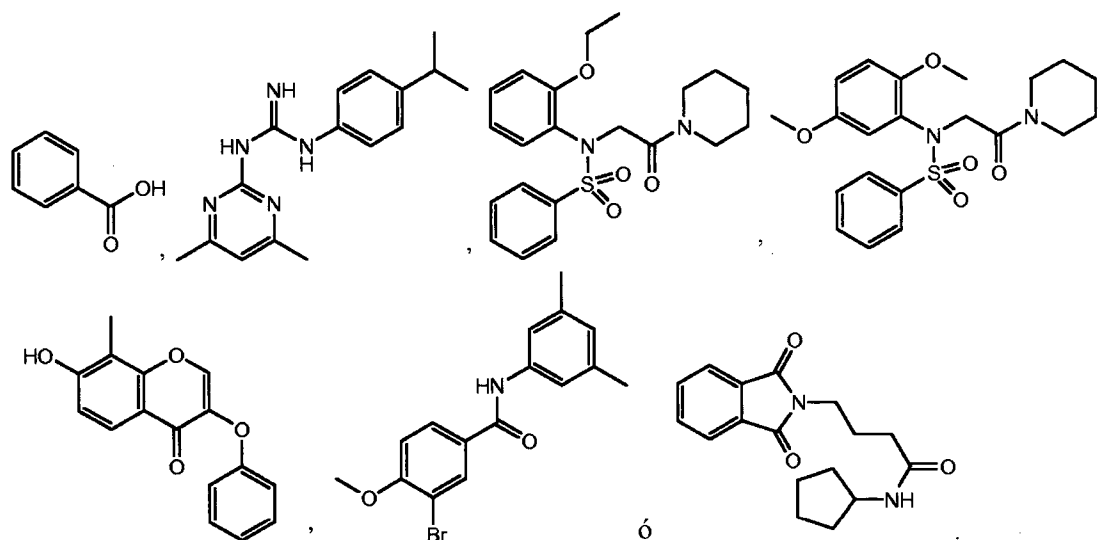
[0109] Las composiciones de CocE-compuesto descritas en esta especificación pueden usarse igualmente en combinación con otras modalidades terapéuticas. Por consiguiente, además de las terapias descritas en esta especificación, se le pueden aplicar también al sujeto otras terapias conocidas por su eficacia para afecciones particulares inducidas por la cocaína.

[0110] Por consiguiente, en algunas incorporaciones de estos métodos, el mamífero es adicto a la cocaína. En otras incorporaciones, el mamífero está sufriendo una sobredosis de cocaína.

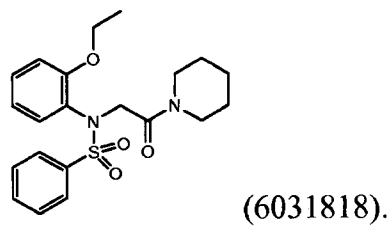
[0111] La CocE para estos métodos puede ser un mutante termoestable de una CocE natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Mutantes preferidos de este tipo tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, T172R/G173Q, o L169K/G173Q. Mutantes de CocE que tienen más de una mutación, preferiblemente más de una mutación termoestabilizadora, son también útiles para estos métodos de tratamiento.

[0112] Estos métodos no están limitados al uso de algún compuesto

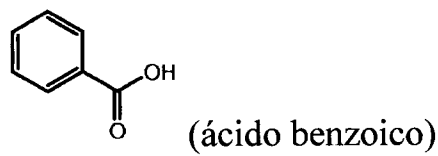
termoestabilizador particular. Preferiblemente, el compuesto es



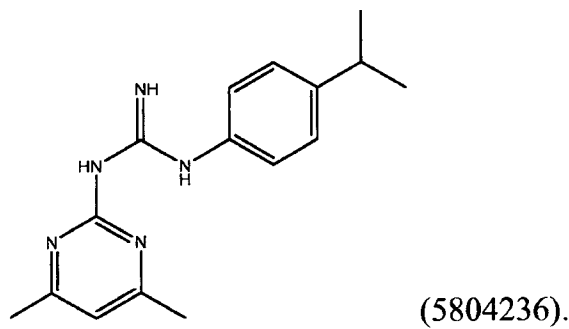
[0113] Más preferiblemente, el compuesto es



[0114] En otras incorporaciones preferidas, el compuesto es

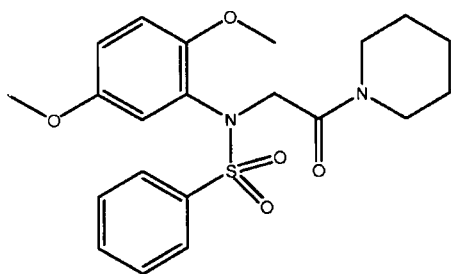


[0115] Así mismo el compuesto puede ser

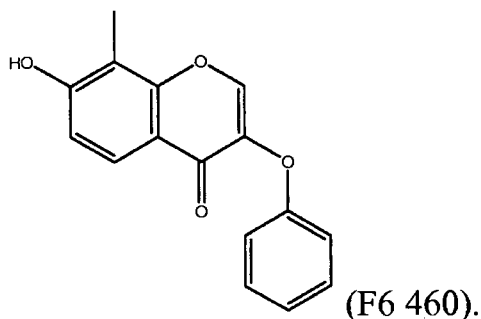


[0116] El compuesto puede ser adicionalmente

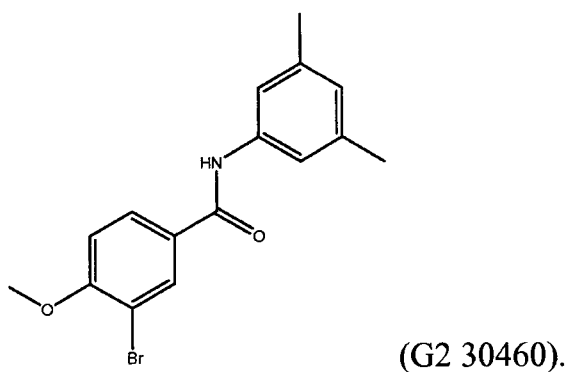
42



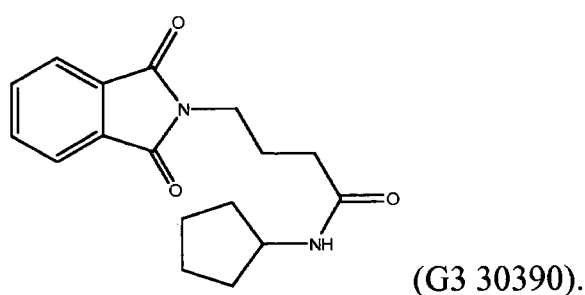
[0117] Adicionalmente, el compuesto puede ser



[0118] Adicionalmente, el compuesto puede ser



[0119] Así mismo el compuesto puede ser



[0120] En estos métodos, la CocE puede combinarse con más de un compuesto termoestabilizador, por ejemplo uno de los compuestos descritos más arriba, o con cualquier otro compuesto.

[0121] La solicitud se dirige igualmente a métodos de tratar un mamífero que sufre una sobredosis de cocaína. Los métodos comprenden

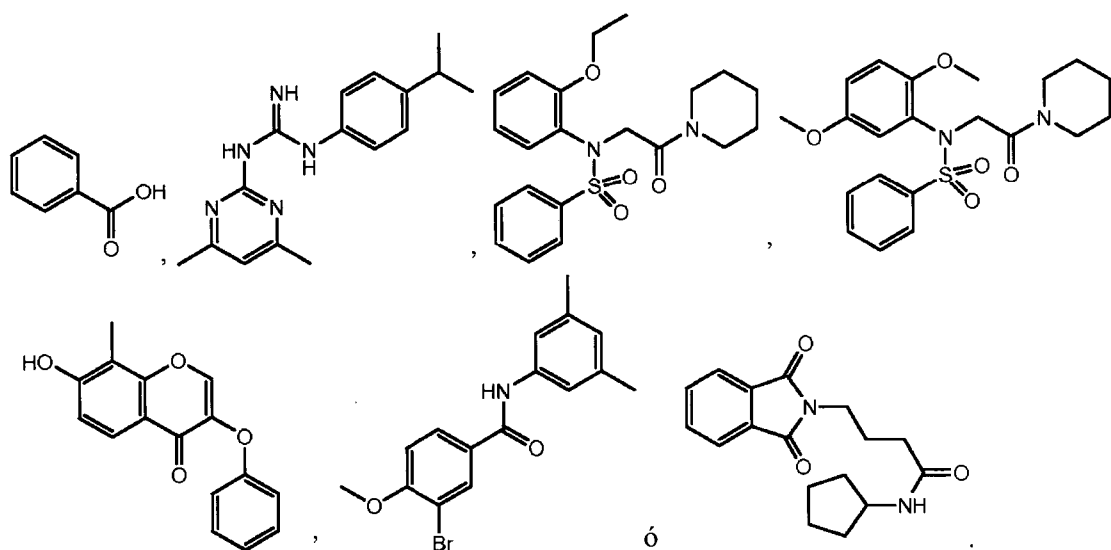
administrar la composición descrita más arriba al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la cocaína en el mamífero.

[0122] Estos métodos pueden usarse para tratar cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, roedores, conejos, conejillos de Indias, caballos, vacas, perros, gatos, ovejas, cerdos y, muy preferiblemente, humanos.

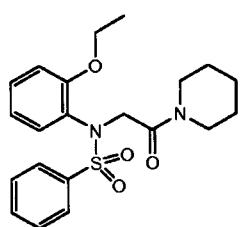
[0123] Al igual que con los métodos de tratamiento descritos más arriba, la composición puede administrarse por cualquier método conocido en el arte. El artesano experto podría determinar el mejor modo de administración para cualquier individuo particular sin experimentación excesiva. En algunas incorporaciones preferidas, la composición de CocE-compuesto se administra al mamífero por vía intravenosa.

[0124] La CocE para estos métodos puede ser un mutante termoestable de una CocE natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Mutantes preferidos de este tipo tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q. En otro mutante termoestable, la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q. Mutantes de CocE que tienen más de una mutación, preferiblemente más de una mutación termoestabilizadora, son también útiles para estos métodos de tratamiento.

[0125] Estos métodos no están limitados al uso de algún compuesto termoestabilizador particular. Preferiblemente, el compuesto es

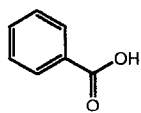


[0126] Más preferiblemente, el compuesto es



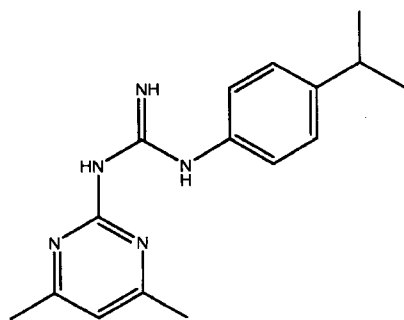
(6031818).

[0127] En otras incorporaciones preferidas, el compuesto es



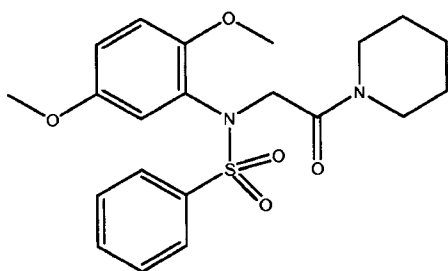
(ácido benzoico)

[0128] Así mismo el compuesto puede ser



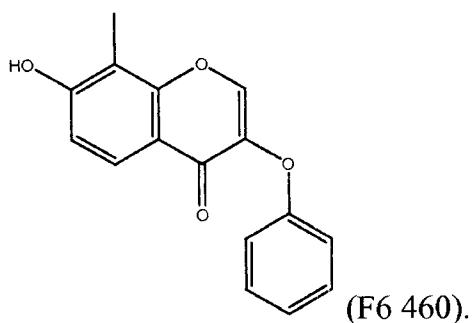
(5804236).

[0129] El compuesto puede ser adicionalmente

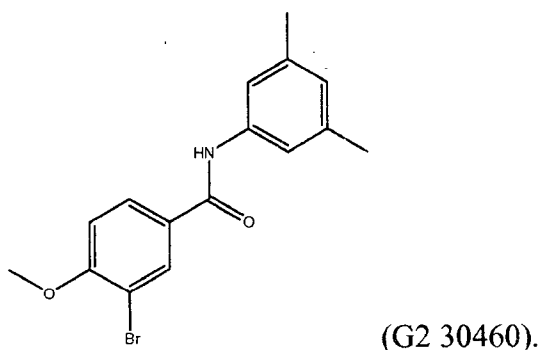


(6169221).

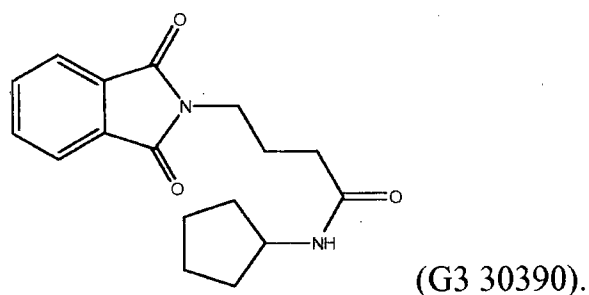
[0130] Adicionalmente, el compuesto puede ser



[0131] Adicionalmente, el compuesto puede ser



[0132] Así mismo el compuesto puede ser



[0133] En estos métodos, la CocE puede combinarse con más de un compuesto termoestabilizador, por ejemplo uno de los compuestos descritos más arriba, o con cualquier otro compuesto.

[0134] La invención se dirige así mismo a métodos de tratar un mamífero que sufre de dependencia de la cocaína. Los métodos comprenden administrar la composición descrita más arriba al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la dependencia de la cocaína en el mamífero.

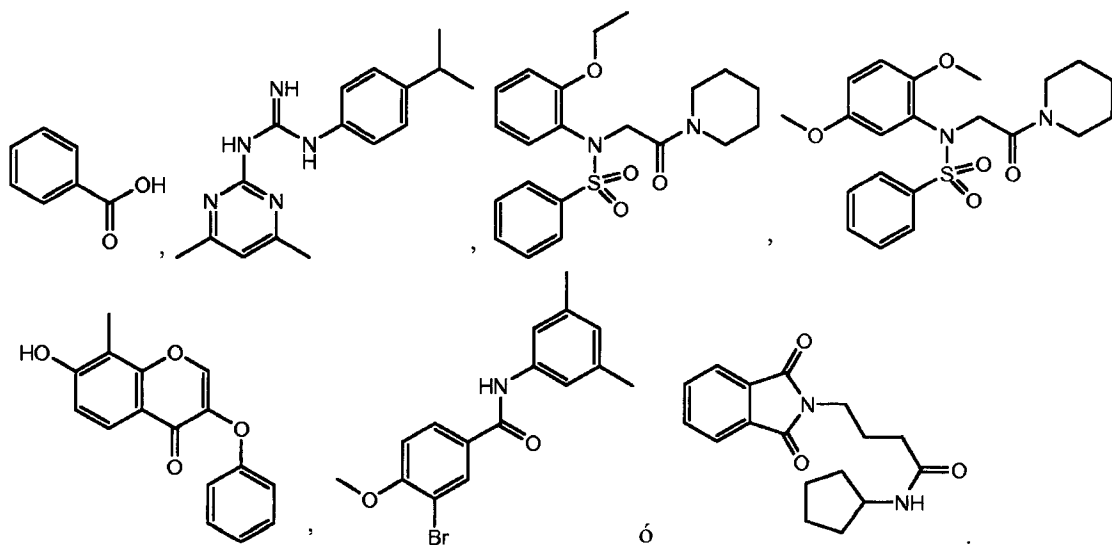
[0135] Estos métodos pueden usarse para tratar cualquier animal, incluyendo, pero sin limitación, roedores, conejos, conejillos de Indias, caballos, vacas, perros, gatos, ovejas y cerdos y, muy preferiblemente,

humanos.

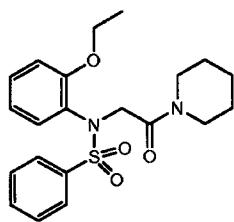
[0136] Como en el caso de los métodos de tratamiento descritos más arriba, la composición puede administrarse por cualquier método conocido en el arte. El artesano experto podría determinar el mejor modo de administración para cualquier individuo particular sin experimentación excesiva. En algunas incorporaciones preferidas, la composición de CocE-compuesto se administra al mamífero por vía intravenosa.

[0137] La CocE para estos métodos puede ser un mutante termoestable de una CocE natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Mutantes preferidos de tal tipo tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q. En otro mutante termoestable, la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q. Mutantes de CocE que tienen más de una mutación, preferiblemente más de una mutación termoestabilizadora, son igualmente útiles para estos métodos de tratamiento.

[0138] Estos métodos no se limitan al uso de algún compuesto termoestabilizador particular. Preferiblemente, el compuesto es

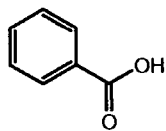


[0139] Más preferiblemente, el compuesto es



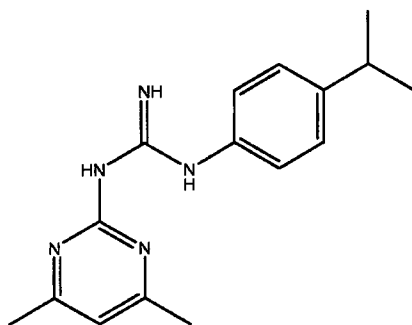
(6031818).

[0140] En otras incorporaciones preferidas, el compuesto es



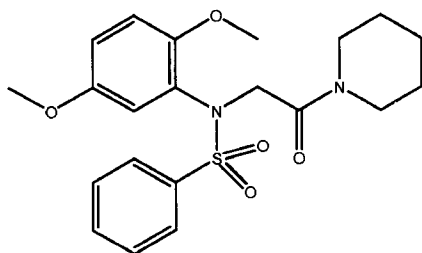
(ácido benzoico)

[0141] Así mismo el compuesto puede ser



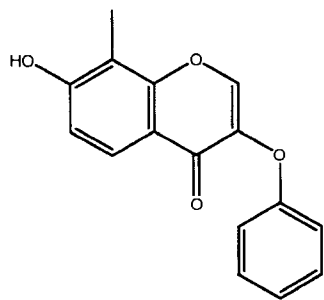
(5804236).

[0142] El compuesto puede ser adicionalmente



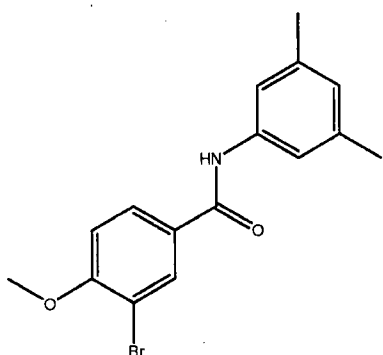
(6169221).

[0143] Adicionalmente, el compuesto puede ser



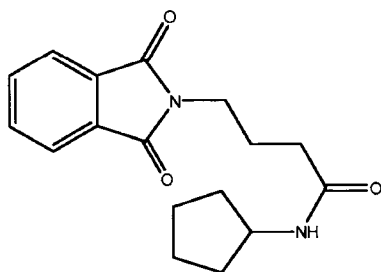
(F6 460).

[0144] Adicionalmente, el compuesto puede ser



(G2 30460).

[0145] Así mismo el compuesto puede ser



(G3 30390).

[0146] En estos métodos, la CocE puede combinarse con más de un compuesto termoestabilizador, por ejemplo uno de los compuestos descritos más arriba, o con cualquier otro compuesto.

[0147] Adicionalmente, la solicitud se dirige a métodos de determinar si un compuesto es un agente termoestabilizador para una proteína. Los métodos comprenden medir la termoestabilidad de la proteína con y sin el compuesto. Con estos métodos, un compuesto que hace que la proteína sea más termoestable es un agente termoestabilizador para la proteína. La proteína es preferiblemente una CocE.

[0148] Con estos métodos, la proteína puede aislarse (es decir, en un tubo de ensayo de una célula viva), o producirse por células en cultivo o *in vivo* para la determinación de la termoestabilidad.

[0149] La actividad de la proteína aislada con y sin el compuesto puede ser medirse a una o más temperaturas para determinar la termoestabilidad de la proteína impartida por el compuesto. La temperatura a la cual se realiza el ensayo de actividad determina el grado de detección de la termoestabilidad. En consecuencia, la identificación sistemática

inicial, por ejemplo, puede llevarse a cabo a 30 °C y, luego de la selección del compuesto inicial, la identificación sistemática puede efectuarse con temperaturas progresivamente crecientes (por ejemplo, 34 °C, 37 °C, 40 °C, 42.5 °C, 45 °C, etc.), hasta que se obtenga un compuesto de termoestabilidad apropiada. Los aumentos progresivos de temperatura se determinan empíricamente durante el procedimiento y se afectan por el número de aciertos a temperaturas particulares y la T_m determinada de los compuestos iniciales.

[0150] La detección de la actividad esterasa puede realizarse usando una variedad de métodos, donde sustratos se acoplan a un sistema de detección específico. Sustratos apropiados para uso en determinar la actividad esterasa pueden incluir cocaína, cocaína tritiada (^3H), derivados de sustrato de cocaína tales como un derivado de tio-cocaína (véase a este respecto, Figura 6), y/o sustratos revelan la actividad esterasa general, tales como 4-nitrofenil acetato. El sistema de detección puede acoplarse directamente a las especificidades del sustrato, por ejemplo: la escisión de cocaína no modificada puede detectarse monitorizando cambios en la absorbencia de la cocaína a 240nm (véase a este respecto, Ejemplo 4), o monitorizando cambios de pH que resultan de la acumulación del producto ácido benzoico (véase a este respecto, Ejemplo 15), o mediante el uso de aptámeros de cocaína (véase a este respecto, Stojanovic, M. N., de Prada, P. & Landry, D. W. (2001) J Am Chem Soc 123, 4928-4931; Stojanovic, M. N. & Landry, D. W. (2002) J Am Chem Soc 124, 9678-9679) monitorizando cambios en fluorescencia, luego de la degradación de la cocaína (véase ejemplo 15); la escisión de cocaína tritiada (^3H) puede detectarse mediante acidificación y detección de producto ácido benzoico tritiado mediante la separación por cromatografía (véase Ejemplo 1 y 15); la escisión de derivados de cocaína tales como tio-cocaína puede monitorizarse mediante la detección de grupos sulfhidrilo reactivos, mediante la adición del reactivo de Ellman y la determinación de cambios de absorbencia a 412nm (véase a este respecto, Ejemplo 15), o mediante la

✓

adición y visualización de metales pesados que reaccionan con sulfhidrilo de precipitación; la escisión de 4-nitrofenil acetato puede detectarse monitorizando cambios en la absorbencia a 420nm (véase a este respecto, Halgasova, N. et al. (1994) Biochem J 298 Pt 3, 751-755; O'Conner, C.J. & Manuel, R.D. (1993) J Dairy Sci. 76, 3674-3682). Véase también la Publicación PCT WO/2008/008358 para ampliación adicional de lo anterior.

[0151] Las composiciones de proteína-compuesto identificadas mediante los procedimientos anteriores, o un análisis similar de gran productividad, pueden evaluarse además empleando procedimientos *in vitro* descritos en esta especificación y en la Publicación PCT WO/2008/008358 (por ejemplo, valores K_{cat} y K_m , estabilidad a 37°, temperatura de fusión (T_m), niveles de endotoxina, capacidad de degradar cocaína en plasma). Las composiciones de proteína-compuesto, que exhiben termoestabilidad sobre la proteína misma, pueden evaluarse adicionalmente, cuando sea apropiado, utilizando procedimientos *in vivo* descritos en esta especificación y en la Publicación PCT WO/2008/008358 (por ejemplo, potencia, tiempo de acción, efectos con dosificación repetida, y/o evaluación inmunológica).

[0152] Por consiguiente, para estos métodos de identificación sistemática, la proteína es preferiblemente una enzima. Más preferiblemente, la proteína es una proteasa. Aún más preferiblemente, la proteína es una esterasa. Muy preferiblemente, la proteína es una cocaína esterasa (CocE), que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 1 y es capaz de catalizar específicamente la escisión de cocaína en ecgonina metil éster y ácido benzoico. Preferiblemente, la CocE tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 90%, más preferiblemente, 95%, aún más preferiblemente 99% idéntica a SEQ ID NO: 1. En algunas incorporaciones preferidas, la CocE tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a SEQ ID NO: 1.

5)

[0153] Puesto que es deseable que el compuesto termoestabilizador sea efectivo a una concentración baja, es preferible en estos métodos de identificación sistemática que el compuesto esté presente en la composición en una concentración de menos de alrededor de 1 mM. Más preferiblemente, el compuesto está presente en la composición en una concentración de menos de alrededor de 0.1 mM. Muy preferiblemente, el compuesto está presente en la composición en una concentración de menos de alrededor de 0.025 mM.

[0154] Preferiblemente en estos métodos de identificación sistemática la termoestabilidad se cuantifica midiendo la función de la proteína a una temperatura baja y una temperatura alta en la presencia y ausencia del compuesto, en donde la temperatura baja está cerca de la temperatura óptima para la función de la proteína y en donde la proteína es menos estable a la temperatura alta que a la temperatura baja. Preferiblemente, la temperatura alta es alrededor de 37 °C, particularmente cuando la proteína es una CocE. Sin embargo, para otras enzimas, la temperatura alta puede ser mayor que alrededor de 40 °C, mayor que alrededor de 50 °C, mayor que alrededor de 60 °C, mayor que alrededor de 70 °C, mayor que alrededor de 80 °C, mayor que alrededor de 90 °C, mayor que alrededor de 95 °C, o incluso mayor que alrededor de 98 °C, por ejemplo, con polimerasas termoestables para PCR.

[0155] Cualquier aspecto de la función de la proteína puede medirse para determinar la termoestabilidad con y sin el compuesto. Ejemplos preferidos de la función de la proteína para este propósito es la actividad de la enzima y la unión de ligando.

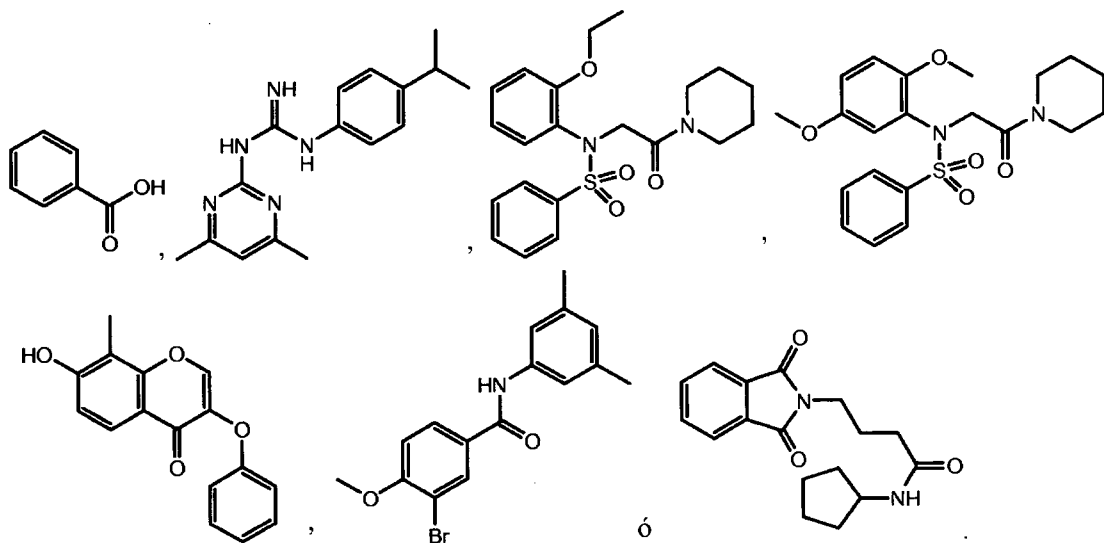
[0156] La solicitud se dirige igualmente al uso de las composiciones citadas más arriba para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína. Preferiblemente, la enfermedad inducida por la cocaína es sobredosis de cocaína, toxicidad de

52

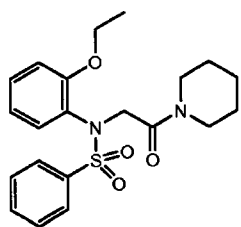
la cocaína, adicción a la cocaína, o dependencia de la cocaína. Muy preferiblemente, la enfermedad inducida por la cocaína es sobredosis de cocaína.

[0157] La CocE para estos usos puede ser un mutante termoestable de una CocE natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Mutantes preferidos de tal tipo tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q. En otro mutante termoestable, la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q. Mutantes de CocE que tienen más de una mutación, preferiblemente más de una mutación termoestabilizadora, son también útiles para estos métodos de tratamiento.

[0158] Estos usos no se limitan a la utilización de algún agente termoestabilizador particular. Preferiblemente, el compuesto es

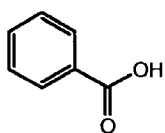


[0159] Más preferiblemente, el compuesto es



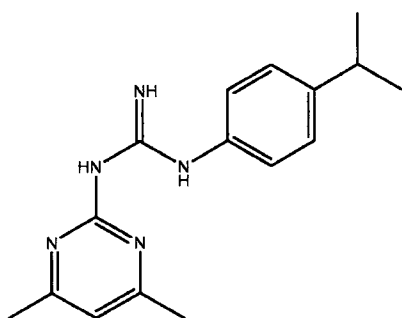
(6031818).

[0160] En otras incorporaciones preferidas, el compuesto es



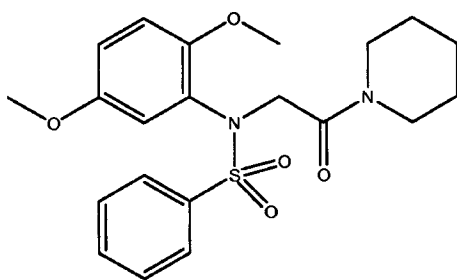
(ácido benzoico)

[0161] Así mismo el compuesto puede ser



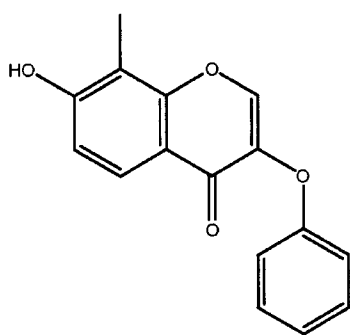
(5804236).

[0162] El compuesto puede ser adicionalmente



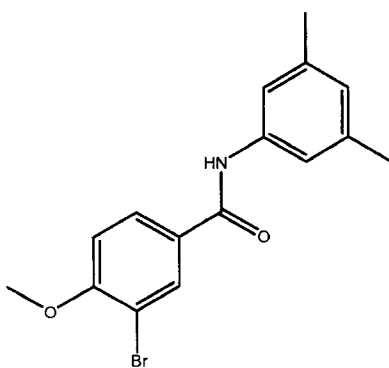
(6169221).

[0163] Adicionalmente, el compuesto puede ser



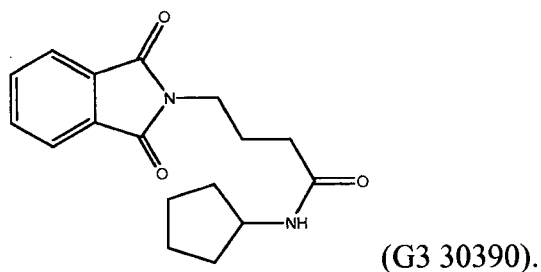
(F6 460).

[0164] Adicionalmente, el compuesto puede ser



(G2 30460).

[0165] Así mismo el compuesto puede ser

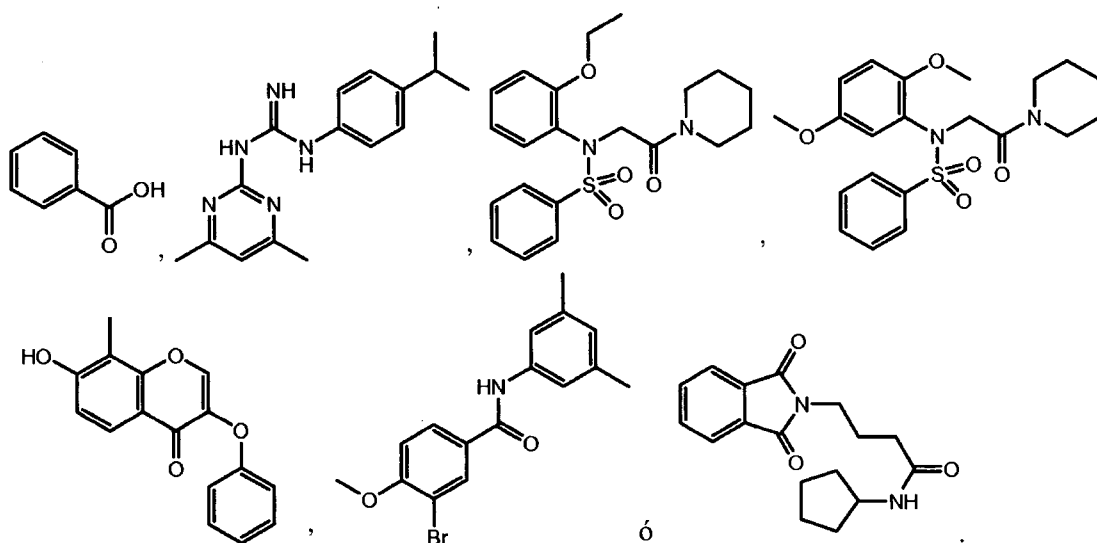


[0166] En estos usos, la CocE puede combinarse con más de un compuesto termoestabilizador, por ejemplo uno de los compuestos descritos más arriba, o con cualquier otro compuesto.

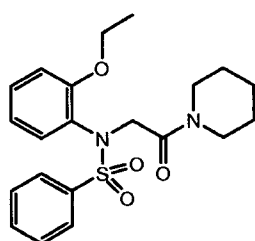
[0167] La solicitud se dirige adicionalmente al uso de la composiciones indicadas más arriba para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína. Preferiblemente, la enfermedad inducida por la cocaína es sobredosis de cocaína, toxicidad de la cocaína, adicción a la cocaína, o dependencia de la cocaína. Muy preferiblemente, la enfermedad inducida por la cocaína es sobredosis de cocaína.

[0168] La CocE para estos usos puede ser un mutante termoestable de una CocE natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Mutantes preferidos de tal tipo tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q. En otro mutante termoestable, la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q. Mutantes de CocE que tienen más de una mutación, preferiblemente más de una mutación termoestabilizadora, son también útiles para estos métodos de tratamiento.

[0169] Estos usos no se limitan a la utilización de algún compuesto termoestabilizador particular. Preferiblemente, el compuesto es

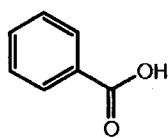


[0170] Más preferiblemente, el compuesto es



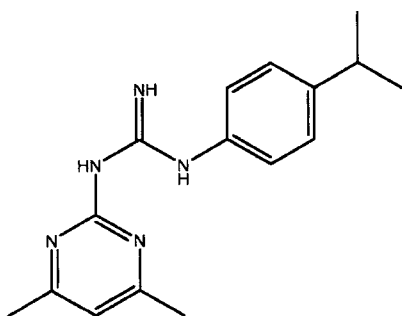
(6031818)

[0171] En otras incorporaciones preferidas, el compuesto es



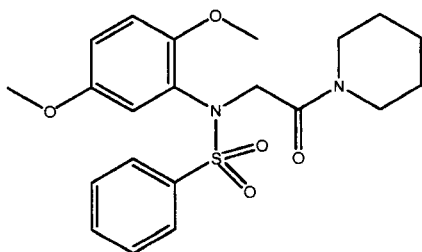
(ácido benzoico)

[0172] Así mismo el compuesto puede ser



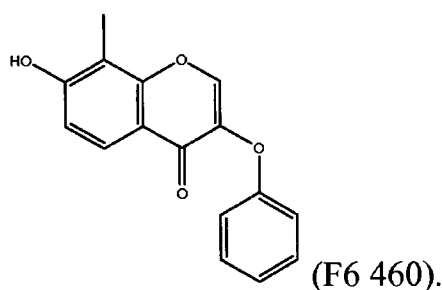
(5804236).

[0173] El compuesto puede ser adicionalmente

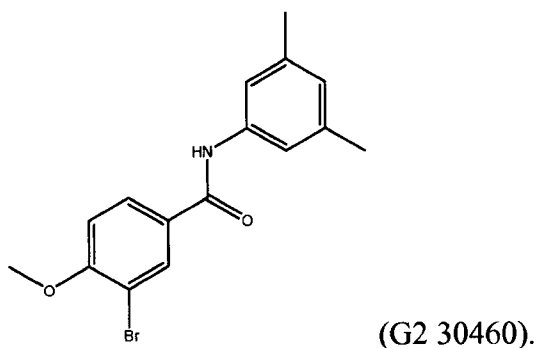


(6169221).

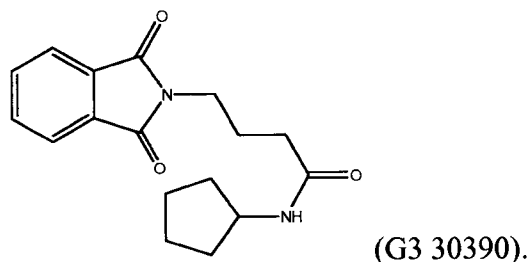
[0174] Adicionalmente, el compuesto puede ser



[0175] Adicionalmente, el compuesto puede ser



[0176] Así mismo el compuesto puede ser



[0177] En estos usos, la CocE puede combinarse con más de un compuesto termoestabilizador, por ejemplo uno de los compuestos descritos más arriba, o con cualquier otro compuesto.

[0178] La solicitud se dirige además a un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de CocE que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1. En estas incorporaciones, el polipéptido de CocE codificado tiene (a) las sustituciones L169K y G173Q, y (b) actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37 °C comparada con la CocE natural. Véase Ejemplo 5, que establece que este polipéptido tiene una semivida de alrededor de 72 horas a 37 °C, la cual es más de 300x más prolongada que la enzima natural que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 90% de

57

identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1. Aún más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1. En las incorporaciones muy preferidas, el ácido nucleico codifica un polipéptido de CocE que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 excepto por las sustituciones L169K y G173 Q.

[0179] La solicitud se dirige igualmente a polipéptidos de CocE codificados por cualquiera de los ácidos nucleicos ya indicados que codifican un polipéptido de CocE que tiene las sustituciones L169K y G173Q. En algunas incorporaciones, el polipéptido de CocE está en una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable.

[0180] En incorporaciones adicionales, la solicitud se dirige a un método de tratar un mamífero que sufre una enfermedad inducida por la cocaína. El método comprende administrar la composición descrita más arriba que contiene el polipéptido de CocE con las sustituciones L169K y G173Q al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la enfermedad inducida por la cocaína en el mamífero.

[0181] Así mismo, la solicitud se dirige al uso de la composición descrita más arriba, que contiene el polipéptido de CocE con las sustituciones L169K y G173Q, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.

[0182] La solicitud se dirige adicionalmente al uso de la composición descrita más arriba, que contiene el polipéptido de CocE con L169K y G173Q, para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.

[0183] Incorporaciones preferidas de la invención se describen en los

siguientes ejemplos. Otras incorporaciones dentro del ámbito de las reivindicaciones en esta especificación serán evidentes a una persona experta en el arte, a partir de la consideración de la especificación o práctica de la invención, como se divulga en este documento. Se pretende que la especificación, junto con los ejemplos, se considere ejemplar únicamente, indicándose el ámbito y el espíritu de la invención por las reivindicaciones, que siguen a los ejemplos.

Ejemplo 1. Compuestos que termoestabilizan CocE.

[0184] La cocaína esterasa es una proteína expresada bacterianamente, que cataliza la escisión de la cocaína en dos subproductos inactivos: ecgonina metil éster y ácido benzoico. Teóricamente la proteína podría utilizarse *in vivo* para el tratamiento de sobredosis y adicción de cocaína; no obstante, la proteína natural no es estable a 37 °C.

[0185] El análisis de la acción de CocE sobre la escisión de la cocaína se realiza utilizando las propiedades espectroscópicas de la cocaína, la cual absorbe luz en grado máximo a una longitud de onda de 240 nm. La actividad de CocE se mide monitorizando con respecto a una disminución en la señal a A240, usando varias concentraciones de cocaína y determinando la tasa inicial de la disminución. A partir de estos valores puede determinarse la $V_{\max}$ de la enzima. Pre-incubando la enzima a 37 °C durante varios tiempos antes de monitorizar con respecto a la actividad, puede calcularse la semivida de la CocE a 37 °C.

[0186] En un esfuerzo continuo por mejorar la termoestabilidad de la CocE, se han diseñado y ensayado varios mutantes de la proteína con respecto a su semivida *in vitro*. Análisis subsiguientes usando electrophoresis en gel mostraron que bajo condiciones naturales pudo observarse que las proteínas se agregaban luego de la pre-incubación a 37 °C durante varios tiempos (Publicación PCT WO/2008/008358). La desaparición del producto inicial puede medirse por análisis de

densitometría, y este análisis apoyó los datos espectroscópicos de que los mutantes tenían una semivida mejorada *in vitro* sobre la natural ("*WT – wild-type*") y el mutante S167A.

[0187] Aunque la pre-incubación en varios tiempos indica que la CocE natural ("*WT CocE*") tuvo una semivida corta a 37 °C (5 minutos), se observó igualmente que, si se ejecutaban mediciones espectrofotométricas a 37 °C, entonces la CocE natural continuaría escindiendo a una tasa lineal de más de 60 minutos (FIG. 2, centro) o hasta que el sustrato de cocaína se hubiera agotado (FIG. 2, parte inferior). Esto sugería que la enzima natural ("*WT enzyme*") estaba siendo estabilizada en la presencia de cocaína o sus subproductos.

[0188] La CocE es también capaz de escindir otro sustrato, el 4-nitrofenil acetato (FIG. 3). La escisión se monitoriza por la detección de la aparición del producto de reacción 4-nitrofenol, el cual absorbe a 400 nm. El análisis de la escisión de este sustrato a 37 °C muestra que el producto se produce inicialmente en forma rápida, pero la reacción se desacelera en el transcurso del tiempo (FIG. 3, centro y parte inferior). Esto indica que, probablemente, el 4-nitrofenil acetato y los productos no están estabilizando la enzima, o por lo menos no en el grado en que es la reacción de cocaína.

[0189] Para analizar la estabilización de CocE natural por sustratos y productos, se examinó la capacidad de cada compuesto de inhibir la formación de agregados de proteína CocE luego de la incubación durante 1 hora a 37 °C. Tanto la cocaína como el ácido benzoico inhibieron la formación de agregados en ciertas concentraciones, pero la ecgonina metil éster y el acetato de sodio no pudieron (FIG. 4).

[0190] Se realizó así mismo análisis espectrofotométrico de la estabilización de la cocaína, analizando la capacidad de CocE de escindir el 4-nitrofenil acetato, luego de la pre-incubación a 37 °C durante varios

tiempos, en la presencia de varias concentraciones de cocaína. Se descubrió que la cocaína es un inhibidor de la escisión del 4-nitrofenil acetato en concentraciones más altas (62.5 y 125 μM) (FIG. 5). No se encontró que concentraciones inferiores a éstas fueran estabilizadoras a 37 °C. No obstante, la pre-incubación de CocE en las concentraciones más altas durante varios tiempos a 37 °C indicó que la enzima se estabilizó suficientemente para ser capaz de escindir el sustrato 4-nitrofenil (FIG. 5).

[0191] El análisis espectrofotométrico cinético de la estabilización por el ácido benzoico, la ecgonina metil éster y el acetato de sodio de CocE no reveló ninguna estabilización por debajo de 125 μM (FIG. 6). Sin embargo, se descubrió que el ácido benzoico inhibió y estabilizó en concentraciones más altas.

[0192] Para estudiar además la estabilización de CocE con pequeñas moléculas, se consideraron otros inhibidores de la reacción de escisión de CocE. El ácido fenilborónico, un inhibidor irreversible de CocE, que fue capaz de estabilizar la agregación de la CocE natural a 37 °C durante 1 hora, con una concentración de estabilización del 50% de aproximadamente 0.2 μM (FIG. 7).

[0193] Los datos descritos más arriba indican que la CocE natural fue capaz de estabilizarse por la adición de sustratos, productos o inhibidores de la enzima. No obstante, la totalidad de estas pequeñas moléculas inhibió la actividad de la enzima en ciertos grados. Se evaluó si podría existir una pequeña molécula pudiera impedir la agregación de CocE, sin inhibir la actividad de la enzima. Tal molécula podría utilizarse como un estabilizador *in vitro*, por ejemplo, durante la preparación de la enzima, e *in vivo*. Se diseñó un análisis para identificar sistemática una biblioteca de 20.000 moléculas pequeñas para la estabilización de CocE. En ese análisis, la enzima se mezcla con los compuestos en un formato de placa de 96 pocillos, y luego se incuba a 37 °C durante una hora. Los controles del

análisis son usualmente el diluyente del compuesto (por ejemplo, DMSO), la enzima no calentada, y la enzima mezclada con 2.000 μ M de ácido benzoico. Después de la incubación a 37 °C, las mezclas enzima/compuesto se examinan con respecto a la capacidad de escindir el 4-nitrofenil acetato (FIG. 8). Únicamente los compuestos que estabilizaron serían capaces de escindir luego de este período de incubación.

[0194] Primeramente se examinaron cuarenta compuestos. Los compuestos se analizaron en duplicado con controles apropiados. Una placa duplicado (sin enzima) se efectuó como control negativo, para buscar compuestos capaces de causar un incremento de la absorbencia en 400 nm en la ausencia de CocE. Se descubrió que varios compuestos incrementaban también la absorbencia en 400 nm. Algunos fueron capaces de hacer esto en la ausencia de CocE. Éstos se descartaron como falsos positivos.

[0195] FIG. 9 es el gráfico de la tasa inicial de escisión del 4-nitrofenil acetato para todos los compuestos, una vez deducida la escisión "sin enzima" de fondo. Los compuestos con actividad significativa (2 desviaciones estándar por encima de los controles DMSO únicamente) están marcados con un asterisco y se muestran las estructuras químicas de esos compuestos.

[0196] El compuesto más efectivo en el análisis fue el compuesto 6031818 (FIG. 10). Ese compuesto es un inhibidor débil de la escisión del 4-nitrofenil acetato (16 μ M; FIG. 10, gráfico izquierdo), y no inhibe en absoluto la escisión de la cocaína (FIG. 10, gráfico derecho).

[0197] El análisis de estabilización en la presencia de altas concentraciones de enzima indicó que la actividad de la enzima comienza a caer después de 60 minutos a 37 °C (FIG. 11). Luego de ese tiempo, 6031818 fue capaz de estabilizar la semivida de la enzima natural, de modo que con 20 μ M la semivida aumenta de 12-14 minutos a 60-70 minutos.

b2

[0198] Otro compuesto efectivo, 6169221, tuvo una estructura muy similar a 6031818. Este compuesto tampoco inhibió la escisión del 4-nitrofenil acetato o el sustrato de cocaína (FIG. 12). El compuesto 6169221 fue sólo débilmente capaz de estabilizar la enzima, incrementando la semivida de 7-12 minutos a 13-17 minutos.

[0199] Otro compuesto termoestabilizador es 5804238. Ese compuesto tampoco inhibió la escisión del 4-nitrofenil acetato o la cocaína (FIG. 14). 5804238 fue débilmente capaz de estabilizar la enzima, incrementando la semivida de 9-10 minutos a 22-25 minutos (FIG. 15).

Ejemplo 2. Dicroísmo circular de CocE natural y mutante.

[0200] Se realizó una caracterización adicional de la estabilidad de la CocE natural (*WT*) y mutantes termoestables mediante dicroísmo circular, el cual detecta pequeños cambios en la conformación y estructura de la proteína. El examen mediante mediciones CD (*circular dichroism*) repetidas a temperaturas crecientes permite el análisis de la termodinámica y la temperatura de fusión (T_M – *melting temperature*) de la proteína, en la medida en que la fusión sea reversible (es decir, la proteína reasuma su conformación original luego de enfriarse). Desafortunadamente, la función de la CocE natural (*WT*) no es reversible, de modo que no puede determinarse la verdadera termodinámica. No obstante, el CD es aún útil en determinar la temperatura para el desdoblamiento. En estos ensayos, la CocE natural (*WT*) (FIG. 16, parte superior) se funde a aproximadamente 39 °C, mientras que el mutante T172R (FIG. 16, parte inferior) se funde a ~42 °C, mostrando que la termoestabilidad de este mutante conferida a 37 °C se debe a una temperatura de fusión 2-3 grados mayor que la natural (*WT*).

[0201] La CocE natural (*WT CocE*) en la presencia de exceso de ácido benzoico (FIG. 17, parte superior) aumentó la temperatura de fusión

de CocE a 53 °C, un total de 10 grados más alta que el mutante T172R. La molécula de ácido benzoico en esta concentración fue ligeramente espectroscópica, afectando los espectros de la proteína, pero no la fusión. El análisis de CocE natural (*WT CocE*) en la presencia de ácido fenilborónico de molaridad 5x (FIG. 17, parte inferior) aumentó la temperatura de fusión a 73 °C, es decir, más de 30 grados más que la natural (*WT*) y el mutante T172R.

[0202] El análisis CD de otro mutante de CocE, L169K, estableció una temperatura de fusión de ~65 °C únicamente, y una temperatura de fusión de ~85 °C en la presencia de ácido fenilborónico (FIG. 18), es decir, el ácido fenilborónico confirió una temperatura de fusión de 20 °C adicionales a la temperatura de fusión original ya elevada para L169K.

[0203] El análisis CD de CocE natural (*WT*) en la presencia de 6031818 estableció una temperatura de fusión de ~42 °C, similar al mutante T172R.

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

[0204] La CocE natural o el mutante de CocE L169K se incubó en la presencia de varias moléculas pequeñas a 37 °C para varios puntos de tiempo, luego se corrió en geles no desnaturizantes. Los resultados se muestran en FIG. 20. Se utilizó densitometría de detalle ("*spot densitometry*") para analizar los geles con el fin de determinar la semivida de las enzimas CocE bajo estas condiciones. Véase FIG. 21. El ácido fenilborónico aumentó la semivida de la CocE al máximo, seguido por el ácido benzoico. El compuesto 6041818 incrementó la semivida de la enzima natural en alrededor de 50%.

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

[0205] A pesar de los avances en el desarrollo de fármacos que apuntan específicamente ("*that target*") al transportador de dopamina, la identificación de fármacos que combaten el abuso y la sobredosis de cocaína ha sido menos fructífera. Enfoques más clásicos hacia el desarrollo de fármacos contra el abuso y la sobredosis de cocaína albergan retos inherentes en que inhibidores competitivos y alostéricos de cocaína, que se unen al transportador, exhiben efectos de comportamiento similares de la cocaína: inhibición de la captación de dopamina. El uso de cocaína esterasa se ha desarrollado como una terapia protectora contra la mortalidad inducida por la cocaína. La aceleración de la digestión, mediada por enzima, de la cocaína sistémica por cocaína esterasa añadida exógenamente representa un cambio de paradigma significativo en la terapia del abuso de la cocaína. Aquí se divulgan el diseño y la generación de preparaciones de enzimas significativamente más estables usando enfoques computacionales. Se suministra evidencia proveniente de estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, la cual indica que la enzima modificada exhibe una semivida prolongada (hasta 30 veces) y una termoestabilidad mejor que la enzima natural. Más aún, se ha obtenido evidencia cristalográfica de rayos X que ofrece un fundamento estructural de la estabilidad mejorada de la enzima.

Introducción

[0206] Se utilizaron enfoques computacionales y basados en la estructura para generar mutantes de CocE con estabilidad incrementada a 37 °C. Se usaron la estructura cristalina de CocE (Larsen et al., 2002) y una combinación de modelado molecular, minimizaciones de energía y simulaciones de dinámica molecular (MD - *molecular dynamics*) con el programa RosettaDesign (Kirjegian et al., 2005; Kuhlman and Baker, 2000) y el programa AMBER (Case et al., 2004). Los mutantes expresados y purificados se evaluaron con respecto a su estabilidad intrínseca mejorada usando análisis *in vitro*. En forma digna de consideración, tres de 36

65

sustituciones previstas exhibieron un mejoramiento dramático en la semivida de la enzima, como se evaluó por análisis *in vitro* y por la protección *in vivo* contra la mortalidad inducida por la cocaína. Se determinaron estructuras cristalinas, obtenidas por rayos X, de estos mutantes, con el fin de investigar su base estructural para una estabilidad térmica mejorada. En cada caso, las sustituciones incrementan los contactos interdominio de la enzima. El mejoramiento dramático en la estabilidad de la CocE mutante *in vivo* ilustra el aspecto promisorio tanto de este enfoque experimental como del uso de CocE en el abuso y adicción de la cocaína.

Materiales y Métodos

[0207] Materiales. La cocaína se adquirió de Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO. Todos los demás reactivos son de grado analítico y se obtuvieron de Fisher Biosciences y Sigma-Aldrich Corp.

[0208] Diseño de mutaciones termoestables. Basándose en la estructura cristalina por rayos X (código PDB 1JU3) de la cocaína esterasa bacteriana (CocE) (Larson et al., 2002), se construyó un modelo 3D completo de CocE ligada a (-)-cocaína, empleando minimizaciones de energía y simulaciones de dinámica molecular (MD) incorporadas en el programa AMBER (Case et al., 2004). Para aumentar la termoestabilidad de CocE, se utilizó un método computacional implementado en el programa RosettaDesign (Kuhlman and Baker, 2000), el cual fue capaz de predecir las mutaciones termoestabilizadoras en un pliegue dado ("*a given fold*"), minimizando al mismo tiempo cualquier cambio en la cadena principal, que podría alterar estructuralmente la estructura del sitio activo o destruir su flexibilidad. El método implementado en el programa RosettaDesign utiliza una función de energía para evaluar la adaptabilidad de una secuencia particular para un pliegue dado y un algoritmo de búsqueda Monte Carlo para muestrear el espacio de secuencia. El mismo método se ha utilizado exitosamente por otros investigadores para incrementar la termoestabilidad de una enzima sin reducción en la eficiencia catalítica (Korkegian et al.,

2005; Kuhlman and Baker, 2000). El modelado computacional, que emplea el programa RosettaDesign, ha permitido la predicción de un conjunto de mutaciones que pueden reducir potencialmente la energía y, por consiguiente, incrementar la mayor termoestabilidad de CocE. Al igual que la primera ronda del diseño racional, la computación se simplificó considerando únicamente las posibles mutaciones en los residuos de aminoácidos que tenían una distancia de 6 - 25 Å de la cocaína.

[0209] Mutagénesis sitio-dirigida. Se generaron mutaciones puntuales usando ADNc de CocE clonado en el vector de expresión bacteriano, pET-22b(+), como plantilla, usando un protocolo de mutagénesis QuickChange (Stratagene) modificado y cebadores de oligonucleótidos individuales. Para la generación de mutantes dobles se emplearon como plantillas los ADNc con mutaciones puntuales individuales para una segunda ronda de mutagénesis. Todos los mutantes se secuenciaron en ambas direcciones sobre toda la región codificadora. CocE natural y mutantes de CocE se expresaron como proteínas con colas 6xHis C-terminales ("***C-terminally-6xHis-tagged proteins***") en células BL-21 Gold (DE3) de *E. coli* cultivadas a 37 °C. Se indujo la expresión de proteínas con 1 mM isopropil- β -tiogalactopiranosido (IPTG - *isopropyl- β -thiogalactopyranoside*, Fisher) durante 12 horas a 18 °C.

[0210] Purificación de Cocaína Esterasa y mutantes. Las células se sedimentaron, se re-suspendieron en 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl con inhibidores de proteasa (3 μ g/ml cada uno de inhibidor de leupeptina y tripsina de frijol de media luna o soya) y se desintegraron mediante lisinas usando un prensa French (Thermo Fisher Scientific Corp, USA). Se enriqueció CocE natural o mutante empleando cromatografía de afinidad con metales TALON (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View CA), se purificó utilizando cromatografía de intercambio de iones (Q-Sepharose, GE Healthcare, Piscataway NJ). La CocE se eluyó de la columna Q-Sepharose con soluciones amortiguadoras ("***bufffers***") de gradiente lineal

150-450 mM NaCl, que contenían 20 mM Hepes pH 8.0, 2 mM MgCb, 1 mM EDTA y 1 mM DTT. Las fracciones pico se agruparon y se concentraron por Centricon-30 (Millipore), se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

[0211] Cinética Michaelis-Menten de la hidrólisis de cocaína. Se realizó un análisis espectrofotométrico en tiempo real de la hidrólisis de la cocaína, usado para monitorizar la hidrólisis de la cocaína (Landry et al., 1993). Las tasas iniciales (de descomposición) se determinaron siguiendo la variación en la absorbencia intrínseca de la cocaína a 240 nm ($6700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Xie et al., 1999) empleando un lector de placas SpectraMax Plus 384 UV (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), que usaba software SOFTmax Pro (Versión 3.1.2). La reacción se inició agregando 100 μL de una solución de enzima 2X (100 mM solución amortiguadora de fosfato, pH 7.4 y 300 mM NaCl) a 100 μL de una solución de cocaína 2X (50 $\mu\text{g/mL}$ de enzima, solución amortiguadora de fosfato 100 mM, pH 7.4 y 300 mM NaCl). Todos los análisis se llevaron a cabo con 100 μM DTT, 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 μM . Se calcularon los valores máximos V_{max} y K_m usando Prism (software GraphPad, San Diego). Para las mediciones de estabilidad, enzimas naturales y mutantes se diluyeron a una concentración 2X y se incubaron a 37 °C durante los tiempos indicados. Al final de cada punto de tiempo, se extrajo una alícuota y se observó un comportamiento cinético como se describe más arriba.

[0212] Protección *in vivo* contra la mortalidad de la cocaína. Ratones macho NIH-Swiss (25-32 g) se obtuvieron de Harlan Inc. (Indianapolis, IN) y se alojaron en grupos de 6 ratones por jaula. A todos los ratones se les permitió acceso *ad libitum* a alimento y agua, y se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas con las luces prendidas a las 06.30 a.m. en una sala mantenida a una temperatura de 21-22 °C. Los experimentos se

llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (*the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*) adoptada y promulgada por los Institutos Nacionales de Salud. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Universitario para el Uso y Cuidado de Animales en la Universidad de Michigan.

[0213] La toxicidad inducida por la cocaína se caracterizó por la ocurrencia de mortalidad, como se define por el cese del movimiento y la respiración observados. Los ratones se pusieron individualmente en cámaras de observación de Plexiglas (16x28x20 cm) para habituarse durante 15 minutos antes de la administración del fármaco. Luego de la administración intra-peritoneal (i.p.) de la cocaína, el ratón se puso inmediatamente en forma individual en la misma cámara para observación. Se registró la presencia o ausencia de mortalidad durante 60 minutos luego de la administración de la cocaína. El ratón se puso en una pequeña cámara de confinamiento (diámetro exterior del tubo: 30 mm; diámetro interior del tubo: 24 mm) que dejaba la cola expuesta. La cola se limpió con un paño humedecido en alcohol y se insertó una aguja deslizante de precisión 30G1/2 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) en una de las venas laterales para infusión. El volumen de inyección i.v. de CocE o mutante de CocE fue de 0.2 mL por ratón. Se aplicaron gasa estéril y presión al sitio de inyección para detener la hemorragia.

[0214] Se evaluó la potencia de los mutantes de CocE para proteger contra la toxicidad inducida por la cocaína luego de la administración i.v. de la enzima (0.3 o 1 mg) 1 minuto antes de la administración de varias dosis de cocaína i.p. (180, 320, 560 y 1.000 mg/kg, n=8/dosis). Se determinaron curvas de respuesta a la dosis de la mortalidad inducida por la cocaína en la ausencia o presencia de una dosis única de la enzima para demostrar los efectos protectores *in vivo* de los mutantes de CocE.

[0215] La duración de la protección contra la toxicidad de la cocaína

provista por CocE y mutantes de CocE se evaluó mediante monitorización de la mortalidad luego de la administración *i.v.* de la enzima (0.1, 0.3 y 1 mg) antes de la cocaína *i.p.* (LD₁₀₀, 180 mg/kg). Se monitorizó la mortalidad luego de la inyección a los 1, 5, 10 o 30 minutos, o a las 1, 2, 3, 4, 5 horas luego de la administración de la enzima. Cada tratamiento utilizó 8 ratones para evaluar el porcentaje de mortalidad (es decir, protección) en ratones tratados previamente con una dosis única de una esterasa en un solo punto de tiempo.

[0216] En el estudio de la potencia, se calculó un valor LD₅₀ del grupo por regresión de mínimos cuadrados usando la porción de la curva de respuesta a la dosis que cubría 50% de ocurrencia de mortalidad. Estos valores se utilizaron para comparar el grado de cambios a la derecha de la curva de respuesta a la dosis de la cocaína en la ausencia o presencia del pretratamiento con la enzima. En el estudio del tiempo transcurrido, se calculó un punto de tiempo para la duración de la protección (es decir, 50% de mortalidad), empleando cada curva de tiempo transcurrido que intersectaba el 50% de ocurrencia de mortalidad.

[0217] Clorhidrato de cocaína (Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO) se disolvió en agua esterilizada y se administró intraperitonealmente en un volumen de 0.01 mL/g. La CocE o el mutante de CocE se diluyó a diferentes concentraciones en solución salina amortiguada con fosfato y se administró por vía intravenosa en un volumen de 0.2 mL/ratón.

[0218] Cristalización y determinación de la estructura. Se desarrollaron cristales por el método de difusión de vapor con gota colgante ("*the hanging drop vapor diffusion method*"), como se describe previamente (Larsen et al, 2002). Para la recolección, se agregaron 2 µL de crioprotector (5 mM Tris pH 7.0, 1.5 M sulfato de amonio, 10 mM HEPES pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 825 mM NaCl, 25% glicerol y 1 mM DTT donde fuera indicado) a cada gota colgante y, en seguida, los cristales

se transfirieron a un crioprotector al 100% y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Se recolectaron los cristales en el término de 3 días después de depositarse en la bandeja ("*tray set-up*").

[0219] Se recolectaron las intensidades de difracción en la Advanced Photon Source en líneas experimentales ("*beamlines*") soportadas por GM/CA- y LS-CAT, y luego se redujeron y escalaron usando HKL2000 (Otwinowski et al., 1997). Las fases iniciales fueron de la sustitución molecular directa empleando estructuras publicadas previamente de CocE (Larsen et al., 2002). Se utilizó REFMAC5 para el refinamiento de máxima probabilidad, y la construcción del modelo y la adición de agua se llevaron a cabo con O y COOT.

Se presentó una densidad inequívoca para todas las cadenas laterales mutadas. Se recolectaron 23 conjuntos de datos totales con conjuntos de datos múltiples para cada tipo de cristal, de modo que pudiera 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 encuentran depositados en la PDB bajo los códigos de acceso 2QAY (T172R), 2QAX (G173Q), 2QAW (T172R/G173Q), 2QAV (L169K), 2QAT (natural sin ligando) y 2QAU (natural con aducto DTT).

Resultados

[0220] Diseño de mutaciones termoestables. La cocaína esterasa contiene tres dominios distintos. Dominio I (residuos 1-144 y 241-354) compone el pliegue de la α/β -hidrolasa canónica. Dominio II (residuos 145-240) es una serie de 7 α -hélices insertadas entre las hebras β 6- β 7 de Dominio I. Dominio III (355-574) consta principalmente de tres hojas β y comprende una topología general parecida a un brazo de reina (FIG. 22A). Se llevaron a cabo estudios computacionales, incluyendo simulación MD y análisis energético subsiguiente para identificar substituciones dentro de la concha de 6-25Å, la cual circunda el sitio activo que estabilizaría la CocE. Este diseño, basado en la estructura y el mecanismo de los mutantes de

21

CocE, combinó el uso de minimizaciones de energía y simulaciones MD empleando AMBER (Case et al., 2004) y estudios de modelado adicionales utilizando el programa RosettaDesign (Kuhlman and Baker, 2000). Aunque la CocE es un dímero en solución y en cristales, el modelado se llevó a cabo con un monómero. Los datos resumidos en la Tabla 1 sugieren que las siguientes mutaciones podrían estabilizar termodinámicamente la estructura de 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 en la estructura de CocE se muestran en FIG. 22A. Se predice que cada una estas mutaciones individuales estabiliza la estructura de CocE en 2.1 a 4.5 kcal/mol, sugiriendo que el tiempo de semivida de la proteína debe llegar a ser alrededor de 30 a 1.000 veces más prolongado a temperatura ambiente (Tabla 1). Para probar estas predicciones, ADNc que codifican las mutaciones en la CocE se expresaron en *E. coli* y las proteínas resultantes se caracterizaron mediante análisis cinéticos y de estabilidad. De los 36 mutantes examinados, tres mutaciones que se agrupaban alrededor de la hélice 2 del Dominio II mejoraron aparentemente la estabilidad de la enzima a 37 °C, sin reducción significativa en la eficiencia catalítica, como se describe a continuación.

Tabla 1. CocE mutante que exhibe estabilidad mejorada luego de la incubación a 37 °C. Se determinaron $\tau_{1/2}$ mediante pre-incubación de la enzima a 37 °C durante tiempos variables. Se determinaron mediciones de actividad a temperatura ambiente (RT) (25 °C). Enzimas mutantes con $\tau_{1/2}$ de 12 minutos (es decir los $\tau_{1/2}$ de CocE natural [wt – *wild type*]), o menos, se consideraron no térmicamente estables. Esta Tabla se encuentra también en WO/2008/008358.

22

Mutante	Estabilidad @ 37 (t _{1/2})
T122A	No
Q123E	No
S159A	No
S140A	No
S167A/W52L	No
T172R	-46 min
V121D	No
L163V	No
F189A	No
F189A/T172R	-40 min (similar a T172R)
C107S	No
W220A	No
F189L	No
A193D	No
T172R/A193D	-40 min (a T172R)
G173Q	-25 min
T254R	No
N42V	No
T172R/G173Q	~ 326 min
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-I175-G-G-A186	~ 75 min
T172R/G173Q-T176-G-G-D185	~75 min
S177Q	No
D45R	No
F47R	No
L169K	~274 min
L174R	No
A181K	No
S179R	No
F189K	25 min
V190K	No
A194K	No
R182K	No

73

[0221] Análisis cinéticos *in vitro*. Para evaluar la actividad enzimática de CocE natural (*wt*) y mutante, se midió directamente la hidrólisis de la cocaína a 37 °C utilizando un análisis espectrofotométrico (Xie et al, 1999). Seguidamente se emplearon tasas iniciales para determinar parámetros Michaelis-Menten. Para evaluar la estabilidad térmica, las preparaciones de la enzima se pre-incubaron a 37 °C durante varios períodos de tiempo, antes de la medición de actividades residuales (Tabla 1 y FIG. 23). La inactivación a 37 °C ocurre en una manera dependiente del tiempo. En la ausencia de DTT, la pre-incubación de CocE natural (*wt-CocE*) a 37 °C disminuye la actividad enzimática exponencialmente con un semi-tiempo de inactivación, τ_{inact} , de aproximadamente 25 min. Tres de 36 de los mutantes predichos incrementaron la estabilidad enzimática de la CocE: T172R (τ_{inact} = 46 minutos), G173Q (τ_{inact} = 35 minutos; datos no mostrados) y L169K (τ_{inact} ~274 minutos). Aunque los mutantes T172R y G173Q no parecieron afectar adversamente la eficiencia catalítica de la enzima (k_{cat} ~ 1×10^8 y 2×10^8 , respectivamente), la k_{cat} de L169K se disminuyó, en gran parte como resultado un aumento de ~5 veces en su K_m para la cocaína esterasa (Tabla 2). De un modo interesante, los mutantes que parecen exhibir estabilidad significativa a 37 °C residen todos en la hélice 2 de Dominio II (FIG. 22B). Igualmente Dominio II se localiza cerca del sitio activo y, por lo menos en el caso de L169K, puede explicar los efectos sobre k_{cat} . Digna de mención así mismo es la observación de que incubar la enzima con DTT parece acelerar la descomposición de la enzima natural, pero no T172R/G173Q y L169K (FIG. 24). Se determinó también que el DTT puede inhibir la hidrólisis de la cocaína con una K_i ~380 μM (FIG. 25) en un manera que parece ser mixta, competitiva y no competitiva (no mostrada). No se observó efecto del DTT cuando combinar las mutaciones parece mejorar aún más la estabilidad de la enzima a 37 °C (no mostrado).

Tabla 2. Comportamiento cinético de CocE natural y mutantes de CocE rediseñados. Se midió el metabolismo de la cocaína por preparaciones

purificadas de CocE natural (*wt-CocE*), T172R, T172R/G173Q o L169K, como se describe en la Sección Métodos. Las constantes de Michaelis, K_M , y K_{cat} se calcularon usando Prism (Graphpad, San Diego, CA).

Enzima	$T_{1/2}$ (min)	K_{cat} (mol·s ⁻¹ ·mol ⁻¹)	K_m (M)	Eficiencia Catalítica, K_{cat}/K_m (S ⁻¹)
wt-CocE	122	2323	0.021	1.11E+08
T172R	46.8	2502	0.024	1.05E+08
T172R/G173Q	326	2247	0.024	9.40E+07
L169K	274	3104	0.105	2.90E+07

[0222] La actividad de T172R/ G173Q, aunque todavía sensible a la incubación a 37 °C, exhibe una estabilidad mejorada y decae τ_{inact} ~326 minutos. No obstante, la actividad catalítica observada se estabiliza a aproximadamente 35% de su tasa catalítica máxima (*es decir*, a t=10 horas). Este perfil de inactivación fue cualitativa y cuantitativamente diferente al comportamiento de los mutantes individuales T172R y G173Q y la CocE natural (*wt-CocE*), pero similar al de L169K. Sorpresivamente, el triple mutante (L169K/G173Q/T172R) no exhibió una estabilización mejorada (datos no mostrados).

[0223] Para comprobar si la estabilidad enzimática mejorada a 37 °C representa una estabilidad térmica mejorada del pliegue de la proteína, se evaluó la capacidad de la CocE a temperaturas progresivamente mayores (FIG. 26). La actividad de la CocE natural (*wt CocE*) cae en picada precipitadamente luego de 30 minutos a aproximadamente 30-35 °C. Tanto L169K como T172R/G173Q se inactivan cada uno a una temperatura más elevada (40-45 °C). Análisis de dicroísmo circular (cerca del análisis UV) a temperaturas variables, comparando la CocE natural (*wt-CocE*) y T172R/G173Q, tienen temperaturas de fusión en concordancia con la pérdida de actividad catalítica.

[0224] Análisis *in vivo*. El pretratamiento con CocE natural (*wt-CocE*), L169K, T172R, o T172R-G173Q 1 minuto antes de la administración de la cocaína protegió a los ratones contra la mortalidad inducida por la cocaína (FIG. 27). La protección de la enzima (a 0.3 mg, o 9 mg/kg) alteró el valor LD₅₀ de la cocaína de 100 mg/kg, para el grupo tratado con vehículo, a 560 y 670 mg/kg para la CocE natural (*wt-CocE*), T172R o T172R-G173Q (FIG. 28). L169K fue ligeramente menos efectivo y requirió dosis mayores (1 mg, o 30 mg/kg) para producir un cambio hacia la derecha de 6 a 7 veces, similar en la curva de respuesta a la dosis de cocaína, consistente con la eficiencia catalítica disminuída observada en los análisis *in vitro*.

[0225] Aunque el pre-tratamiento (más de 30 minutos) con dosis bajas de enzima (0.1 mg) no fue efectivo contra los efectos mortales de la cocaína, dosis mayores (0.3 mg y 1 mg) parecieron ser efectivas, cuyas duraciones fueron dependientes de la mutación (FIG. 28 y resumidas en FIG. 29). Con las dosis máximas ensayadas (1 mg), el tiempo de pre-tratamiento con la enzima, necesario para proteger a 50% de mortalidad, LT₅₀, para la CocE natural (*wt-CocE*) fue de aproximadamente 14 minutos. Se observaron LT₅₀ considerablemente más prolongados para T172R (LT₅₀~1.8 horas), L169K (LT₅₀~3.3 horas) y T172R-G173Q (LT₅₀~4.5 horas), consistentes con los datos *in vitro*.

[0226] Análisis Estructural de Mutantes Estabilizadores. Se determinaron estructuras cristalinas, con rayos X de alta resolución, de CocE natural (*wt-CocE*) (1.5Å), así como mutantes termoestables L169K (1.6 Å), T172R (2.0 Å), G173Q (2.5 Å) y T172R/G173Q (2.0 Å). FIG. 30 sintetiza algunos de los resultados. El delineamiento de la estructura de la CocE natural sin ligando ("*unliganded wt-CocE*") no se ha divulgado previamente y fue necesaria para comparación en nuestro estudio.

[0227] Las estructuras de L169K, T172R, G173Q y T172R/G173Q

muestran todas una densidad bien ordenada para sus cadenas laterales mutadas (FIG. 31). En cada caso, las sustituciones parecen aumentar el número de contactos/área superficial oculta entre dominios de CocE. La elongación de la cadena alquilo del grupo lateral y la adición de una fracción de guanidinio mediante la sustitución de arginina en T172R generan tanto contactos de van der Waals con el anillo aromático de F189 en la hélice H3 como un enlace hidrógeno entre la fracción de guanidinio al oxígeno de la cadena principal de F189 (FIG. 31 A, B). La cadena lateral de guanidinio se empaqueta igualmente contra la cadena lateral I205, donada por la subunidad relacionada con el dímero. La cadena lateral de G173Q forma un enlace de hidrógeno trans-dominio con el carbonilo de la cadena principal de P43 en dominio I y contactos de van der Waals con Y44, cuyo hidroxilo contribuye al agujero oxianión del sitio activo (FIG. 31C, D). La sustitución L169K forma también contactos con el anillo fenilo de Y44 en dominio I (FIG. 31E, F). La cadena lateral más larga de la lisina podría incidir en el sitio de unión del anillo tropano de la cocaína, explicando quizá la mayor K_m exhibida por este mutante.

[0228] En estructuras divulgadas previamente (1JU3 y 1JU4) y en las nuestras, observamos múltiples conformaciones distintas para una región que abarca el C-término de H2 y el bucle H2-H3 (residuos 171-183, como se ilustra en FIG. 32). Es probable que estas dos conformaciones estén en equilibrio mientras se encuentran en solución, pero la población de estos dos estados parece estar influenciada por las mutaciones en el interior de H2. Debido a que los mutantes estabilizadores se encuentran en la hélice H2, se planteó la hipótesis de que los mutantes pueden contribuir a reducir la flexibilidad adaptativa de esta región y, por consiguiente, protegen térmicamente el pliegue de la enzima. Para este análisis, la conformación "out" de esta región se definió como la tipificada por la estructura cristalina del aducto ácido fenilborónico 1JU3, en donde esta región se pliega alejándose de las hélices H5-H6 del dominio I en hasta 3.3 Å, comparada con la conformación "in", tipificada por la estructura cristalina del ácido

benzoico 1JU4. Se observó igualmente una tercera conformación de esta región bucle, que es similar a la de 1JU4, excepto que los residuos 178-181 tienen una conformación única.

[0229] La flexibilidad global aparente de H2-H3 exige conformaciones distintas de cadena lateral dentro de cada hélice. Por ejemplo, en la conformación 'out', 1175 se mueve hacia H3, forzando a F189 fuera de la interfase hidrófoba entre H2 y H3, mientras que la conformación 'in' permite que F189 esté en esta interfase, o fuera de ella.

[0230] La estructura del mutante T172R revela una tendencia de F189 a adoptar una posición "out" mediante los estrechos contactos de las cadenas laterales de R172 y F189, una tendencia que es más predominante en el mutante T172R/G173Q. Estos datos sugerirían que bloquear la conformación plana de F189 puede contribuir a los efectos termoestabilizadores de la sustitución T172R. La sustitución de alanina por fenilalanina en 189 no revela ningún mejoramiento o disminución de la estabilidad térmica en el T172R o fondo de la natural. En consecuencia, las interacciones de R172 con la hélice H3 misma, o quizá con la subunidad relacionada con el dímero, parecen responsables de la estabilidad mejorada.

[0231] Formación de un aducto DTT-carbonato en el sitio activo de la CocE. Estos estudios se vieron complicados por la densidad excepcionalmente marcada en el sitio activo, la cual pareció corresponder a un aducto covalente con la serina catalítica de la CocE (Ser117). Tal tipo de densidad no se divulgó previamente (FIG. 33) (Larsen et al., 2002). La densidad electrónica correspondió a un anillo de cinco miembros con dos ramas de radicales. Mapas de Fourier de diferencia anómala confirmaron la presencia de azufre en cada una de las ramas, y mapas Omit $2F_o - F_c$ trazados en diferentes niveles identificaron los átomos de oxígeno en el aducto (FIG. 33). Por consiguiente, se concluyó que la densidad corresponde a DTT, el cual se incluyó en las soluciones de cristalización y recolección (a 10 mM),

que se hizo reaccionar con bicarbonato en el sitio activo. El anillo 2-oxo-dioxolano parece atrapado como un complejo de punto muerto intermedio tetraédrico, con uno de los oxígenos tetraédricos que ocupan el agujero oxianión formando el aducto, 2-oxo-dioxolano butiril carbonato, o DBC. En la estructura de resolución máxima (L169K), el carbono presumiblemente donado por el carbonato en el anillo dioxolano es ~ 1.6 Å (la distancia no estuvo restringida en el refinamiento de las estructuras de alta resolución) del γ -oxígeno S117, el oxígeno en el agujero de oxianión, y 1.4-1.5 Å del oxígeno en el agujero oxianión y los dos átomos de oxígeno donados por el DTT, la mayoría consistentes con enlaces covalentes. La densidad electrónica de este carbono tetraédrico es más débil que la de los demás carbonos en el ligando DTT, sugiriendo el retiro de electrones. El aducto 2-oxo-dioxolano adopta una conformación similar al aducto 2-fenilboronato con la CocE (Larsen et al., 2002), excepto que el centro tetraédrico está rotado.

[0232] Para confirmar que la formación de este complejo aducto no era una consecuencia de nuestros mutantes estabilizadores, se determinó la estructura de la CocE natural (*wt-CocE*) en la presencia y ausencia de DTT, y se determinaron igualmente las estructuras de mutantes estabilizadores de CocE en la ausencia de DTT. En todos los casos en donde el DTT se cristalizó conjuntamente con la CocE, se observó el aducto, y la posición del inserto H2-H3 fue esencialmente la misma con o sin el DTT. Bajo las condiciones *in vitro* examinadas aquí, *es decir*, tiempos de incubación relativamente cortos con DTT (<60 minutos), DTT inhibe la actividad de la CocE competitivamente con el sustrato. Nótese que las condiciones de crecimiento de los cristales son considerablemente diferentes con los tiempos de incubación en los días a semanas, una escala de tiempo que, en principio, podría permitir la formación del aducto DBC. La formación del aducto debería exhibir igualmente patrones de inhibición marcadamente diferentes y aparecer como un inhibidor no competitivo. Cristales desarrollados sin DTT, o desarrollados con DTT y posteriormente

empapados en el análogo de cocaína atropina, que parecía desplazar el aducto, mostraron en lugar de ello una molécula de agua cerca de S117 y elevados factores B para residuos del sitio activo, incluyendo S117 y H287 de la tríada catalítica.

Discusión

[0233] A la fecha, la CocE es el catalizador más eficiente para hidrolizar la cocaína y disminuir los niveles de cocaína *in vivo* y proteger contra la mortalidad inducida por la 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; WO/2008/08358). La efectividad de este "antídoto" para la toxicidad de la cocaína en roedores indica que la CocE es un fármaco potencial en humanos. No obstante, la CocE natural (*wt-CocE*) exhibe una inestabilidad considerable, ya que su semivida efectiva en el torrente circulatorio es ~10 min. En comparación, la BchE tetramérica permanece en el plasma de ratones durante 16 horas y activa durante hasta 7 horas después de la inyección (Duysen et al., 2002) mientras que el Ab anti-cocaína permanece en la circulación de ratón durante 8.1 días (Norman et al., 2007). Aún así, el potencial clínico de la CocE natural (*wt-CocE*) sugiere que su duración de protección es probablemente suficiente en casos de sobredosis aguda, tales como aquellos debidos a inhalación o inyección (Landry et al., 1993).

[0234] En casos que implican sobredosis masivas, como en el caso de las "mulas de cocaína", en donde grandes cantidades de cocaína se liberarán en el torrente circulatorio durante un largo período de tiempo, se desea una CocE de efecto más prolongado. La corta semivida plasmática efectiva de la CocE representa por consiguiente un obstáculo mayor en desarrollar este fármaco a base de proteína para el tratamiento agudo de la mortalidad inducida por la cocaína y para el tratamiento crónico de abuso de la cocaína.

[0235] Aquí, se suministran datos *in vitro* que demuestran que la semivida relativamente corta *in vivo* puede ser resultado de la inactivación térmica de la CocE fácilmente observado *in vitro*. La sensibilidad térmica de la CocE puede reflejar el hecho de que *Rhodococcus* sp., el microorganismo del cual se aisló la CocE, medra en el suelo debajo de las plantas de coca bajo temperaturas moderadas de alrededor de 20 °C (Mackay, 1886; Martin, 1952), mucho más bajas que la temperatura corporal de los roedores (37-38 °C).

[0236] De los 36 mutantes predichos por medios computacionales, tres mutaciones exhibieron una estabilidad térmica mejorada. Un número de los mutantes no fue estable y no pudo sobreexpresarse y purificarse como una enzima funcional (Tabla 1). Combinando dos de los mutantes puntuales termoestables, se creó un mutante térmicamente muy estable de CocE, G173Q/T172R, que prolonga la τ_{inact} *in vitro* a 37 °C de 10 minutos a 4-1/2 horas, o aproximadamente 27 veces. Análisis *in vivo* de los mutantes en roedores, como una función de su capacidad de proteger contra mortalidad aguda inducida por la cocaína, concordaron con los ensayos *in vitro*.

[0237] Los resultados de estudios de modelado computacional fueron impresionantes en el sentido de que varios mutantes estables se identificaron en una enzima de 574 residuos de aminoácidos. Desafortunadamente, la resolución de estos métodos no fue suficiente para aclarar el mecanismo preciso que subyace a los efectos termoestabilizadores de los mutantes. En combinación con cristalografía de rayos X, sin embargo, fue posible constatar un modelo razonable para explicar la estabilidad mejorada 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 de dominio a dominio. El dominio más térmicamente

inestable en la enzima se identificó como Dominio II, el cual contiene las hélices H2 y H3.

[0238] La localización de las sustituciones térmicamente estables en las hélices H2-H3, y la heterogeneidad estructural del bucle H2-H3 mismo, sugiere que la región helicoidal H2-H3 es inherentemente inestable y puede, en última instancia, nuclear o, por lo menos, contribuir en gran medida a la agregación o desdoblamiento de la CocE. Ortólogos de CocE de *Listeria* y *Pseudomonas sp.*, los cuales son ambos capaces de sobrevivir a 37°C, tienen hélices H2 & H3 significativamente más cortas y, por lo tanto, un dominio 2 potencialmente más estable (códigos de Acceso a Genbank ZP 01928677 y YP 660510, respectivamente). El truncamiento o eliminación completa del bucle entre las hélices H2 y H3 en CocE, sin embargo, inactivó la enzima (véase Tabla 1). Este resultado sugiere que la región helicoidal H2-H3 es inherentemente inestable.

[0239] La presencia de un aducto DTT-carbonato en el sitio activo de la CocE es catalizado aparentemente por la enzima. Se reseña que otros carbonatos, tales como propileno carbonato (4-metil-2-oxo-1,3-dioxolano), se descomponen en propileno glicol y CO₂ en agua. La síntesis inversa de DTT, un diol vecinal y CO₂ es así concebible. El aducto DTT parece enlazarse covalentemente al S117 catalítico muy en la manera general del ácido fenilborónico (Larsen et al., 2002), aunque su longitud de enlace de 1.6 Å (por oposición a la distancia esperada de 1.43 Å) sugiere un carácter covalente parcial. El plano del anillo dioxolano de DBC traslapa el plano del anillo fenilo de ambas formas enlazadas a ácido fenilborónico y ácido benzoico de CocE (Larsen et al., 2002). Como la conformación de los residuos del sitio activo de la CocE natural (*wt-CocE*), ligada a DBC, difiere muy poco de la forma ligada al ácido fenilborónico, es posible que el aducto no se observara en la estructura cristalina por Larson et al. (2002), debido a la unión mutuamente excluyente del ácido benzoico o fenilboronato. Este aducto se observó en la estructura cristalina de la CocE de *Pseudomonas* (Larsen et al., 2002) y en la estructura de la CocE de *Listeria* (Larsen et al., 2002). El plano del anillo dioxolano de DBC traslapa el plano del anillo fenilo de ambas formas enlazadas a ácido fenilborónico y ácido benzoico de CocE (Larsen et al., 2002). Como la conformación de los residuos del sitio activo de la CocE natural (*wt-CocE*), ligada a DBC, difiere muy poco de la forma ligada al ácido fenilborónico, es posible que el aducto no se observara en la estructura cristalina por Larson et al. (2002), debido a la unión mutuamente excluyente del ácido benzoico o fenilboronato.

82

[0240] La estructura cristalina de la CocE sugiere que la enzima existe como un dímero, y estudios preliminares insinúan que el dímero es lo suficientemente estable en concentraciones bajas para ser resuelto por filtración en gel, aunque el pre-tratamiento a 37 °C induce la agregación de proteína y la elución de una columna de exclusión de tamaño en el espacio vacío de la columna. De un modo interesante, análisis cuidadosos de la cinética de inactivación de ambos T172R/G173Q y L169K revelan que la actividad disminuye exponencialmente en la primera fase, pero parece alcanzar un nivel a aproximadamente 35% de su actividad máxima. Esta actividad se mantiene incluso después de más de 8 horas, en contraste con la CocE natural (*wt-CocE*), G173Q y T172R, donde la actividad decae a menos del 10% de actividad en un término de 90 minutos. Una explicación plausible de este comportamiento (de T172R/G173Q y L169K) es que aún permanece una porción térmicamente sensible de la enzima que no resulta en una inactivación enzimática completa. La región térmicamente sensible restante puede localizarse en la interfase dímero, cuya alteración podría llevar a la agregación. Los datos de cromatografía de filtración en gel, mencionados anteriormente, estarían de acuerdo con esta noción. Por supuesto, se encuentran en curso estudios adicionales y la caracterización de mutantes adicionales en la interfase dímero.

[0241] Tal vez el efecto más dramático de las mutaciones se revela por su capacidad *in vivo* de proteger contra la mortalidad inducida por la cocaína. El efecto de las mutaciones fue equivalente a nuestros datos *in vitro* ampliando la duración del pre-tratamiento que la enzima es capaz de resistir. En el caso de T172R/G173Q la duración del pre-tratamiento, en la cual la enzima era todavía capaz de proteger contra la mortalidad inducida por la cocaína en un 50% se amplió en más de 20 veces, o hasta 4.5 horas. Esto sugiere contundentemente que la causa de la inestabilidad *in vivo* de la CocE es la misma que la observada para la enzima *in vitro*.

[0242] En síntesis, el presente trabajo muestra que un enfoque

múltiple que combine análisis computacionales, bioquímicos y estructurales puede usarse para desarrollar racionalmente variables de CocE que sean significativamente más estables que la enzima natural

Ejemplo 5. Mutante de CocE L169K/G173Q

[0243] Se creó un mutante de CocE, L169K/G173Q y se caracterizó en la siguiente forma.

[0244] Diseño de mutaciones termoestables. Basándose en la estructura cristalina por rayos X (código PDB 1JU3) de la cocaína esterasa bacteriana (CocE) (Larsen et al., 2002), se construyó un modelo 3D completo de CocE ligada a (-)-cocaína usando minimizaciones de energía y simulaciones de dinámica molecular (MD - *molecular dynamics*) incorporadas en el programa AMBER (Case et al., 2004) (véase el Ejemplo 4 más arriba). Para aumentar la termoestabilidad de la CocE, se empleó un método computacional implementado en el programa RosettaDesign (Kuhlman and Baker, 2000; Korkegian et al., 2005). Este método fue capaz de predecir mutaciones termoestabilizadoras en un pliegue dado, minimizando al mismo tiempo cualquier cambio en la cadena principal que pudiera alterar estructuralmente la estructura del sitio activo o extinguir su flexibilidad. El método implementado en el programa RosettaDesign utiliza una función de energía para evaluar la adaptabilidad de una secuencia particular para un pliegue dado y un algoritmo de búsqueda Monte Carlo para el muestreo de espacio en las secuencias ("*for sampling sequence space*"). El mismo método se ha usado exitosamente por otros investigadores para aumentar la termoestabilidad de una enzima sin reducción en la eficiencia catalítica (Kuhlman and Baker, 2000; Korkegian et al., 2005). El modelado computacional empleando el programa RosettaDesign ha permitido la predicción de un conjunto de mutaciones que pueden reducir potencialmente la energía y, por consiguiente, aumentar la mayor termoestabilidad de la CocE. Como la primera ronda del diseño racional, se simplificó la computación considerando únicamente las

posibles mutaciones en los residuos de aminoácidos que tienen una distancia de 6-25 Å del sitio catalítico.

[0245] Mutagénesis sitio-dirigida. Mutaciones puntuales en las posiciones 169 y 173 se introdujeron en el ADNc de CocE clonado en el vector de expresión bacteriana, pET-22b(+). Se generaron mutaciones empleando un protocolo de mutagénesis QuickChange (Stratagene) modificado y cebadores de nucleótidos individuales. Para la generación del mutante doble, se usaron ADNc con la mutación puntual G173Q individual como plantilla para la segunda ronda de mutagénesis, con el fin de introducir el L169K. El mutante se secuenció en ambas direcciones sobre toda la región codificadora. CocE natural y mutantes de CocE se expresaron como proteínas con colas 6xHis C-terminales en células Gold (DE3) BL-21 de *E. coli* cultivadas a 37 °C. La expresión de proteína se indujo con 1 mM isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG, Fisher) durante 12 horas a 18 °C.

[0246] Purificación de cocaína esterasa y mutantes. Se sedimentaron las células, se re-suspendieron en 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl con inhibidores de proteasa (3 µg/ml cada uno de inhibidor de leupeptina y tripsina de frijol de media luna o soya y se desintegraron mediante lisinas empleando una prensa French (Thermo Fisher Scientific Corp, USA). CocE natural o CocE mutante se enriquecieron usando cromatografía de afinidad con metales TALON (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View CA), seguida por cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose, GE Healthcare, Piscataway NJ). La CocE se eluyó de la columna Q-Sepharose con 150-450 mM NaCl de soluciones amortiguadoras de gradiente lineal que contenían 20 mM Hepes pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA y 1 mM DTT. Las fracciones pico se agruparon y se concentraron por Centricon-30 (Millipore), se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

85

[0247] Determinación de la Eficiencia Catalítica. Para determinar la actividad catalítica se llevó a cabo un análisis espectrofotométrico. Muestras de L169K/G173Q CocE se agregaron a una placa permeable a UV de 96 pocillos, que contenía 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 CocE en un volumen final de 200 μl . La variación en absorbencia a 240 nm se midió durante 20 minutos, con lecturas cada 10 segundos, por un lector de placas UV SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) usando software SOFTmax Pro (Versión 3.1.2). La variación en absorbencia se convirtió en la variación en la concentración y se determinó además la tasa de descomposición por mol de enzima (K_{cat}). K_{cat} y K_{m} de la enzima se determinan empleando Prism (software GraphPad, San Diego). La mutación L169K/G173Q permite que cada molécula de la enzima transforme aproximadamente 6.000 moléculas de cocaína por minuto en metabolitos inactivos. El aumento en K_{cat} sobre la CocE natural ("*the wildtype*") y la mutación T172R/G173Q previa se acompaña por un incremento en K_{m} , lo cual resulta en una eficiencia catalítica similar a las dos, la CocE natural ("*the wildtype*") y la mutación T172R/G173Q (FIG. 34).

[0248] Determinación de la semivida *in vitro*. Para simular la temperatura corporal y la concentración de la enzima en el ratón NIH Swiss, se incubó CocE en un baño maría a 37 °C en una concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$ en plasma humano o en solución salina amortiguada con fosfato (PBS - *phosphate buffered saline*) pH 7.4. Las muestras se agregaron al agua a 37 °C directamente del almacenamiento a -80 °C en tiempos variables (0, 24, 48, 77, 96, 120 horas) y todas se analizaron en una concentración final de 10 ng/ml, como se describe más arriba.

[0249] La sustitución de una lisina y un glutamato en las posiciones 169 y 173, respectivamente, amplía la semivida *in vitro* a aproximadamente 72 horas, lo cual es 332 veces más que la enzima natural y 17 veces más

que la mutación T172R/G173Q (FIG. 35).

[0250] Determinación de la potencia *in vivo*. El incremento en K_{cat} se ha demostrado *in vivo* también. La CocE mutada L169K/G173Q protegió, en forma dependiente de la dosis, a los ratones contra dosis crecientemente letales 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 administraron en la cavidad intraperitoneal 1 minuto después. Este mutante ha demostrado ser más potente que los mutantes de CocE previos, manteniendo cierto grado de protección con dosis tan bajas como 0.01 mg. La potencia incrementada debería permitir utilizar menos enzima y, por lo tanto, disminuir las respuestas inmunológicas innatas de los animales a la proteína. La mayor potencia hace igualmente a esta enzima más efectiva contra dosis extremas de cocaína, que pueden observarse en una sobredosis humana, en concentraciones equivalentes a otra mutación de la enzima.

[0251] Evaluación de la semivida *in vivo*. La CocE se administra i.v. a la vena de la cola en un volumen de 0.2 ml. Los animales se someten a prueba de provocación ("***animals are challenged***") con 180 mg/kg de cocaína administrada intraperitonealmente en un tiempo dado luego de la administración de CocE. El mutante L169K/G173Q de CocE se probó en 1 mg frente a los otros mutantes, porque 1 mg de CocE mostró la máxima separación entre termoestabilidades *in vivo* de diferentes mutantes de CocE en estudios preliminares (datos no mostrados). El mutante L169K/G173Q de CocE (1 mg) protegió al 50% de los ratones NIH Swiss de la muerte durante un período de hasta 7.5 horas. Dosis más bajas de la mutación L169K/G173Q muestran una protección ampliada contra la mortalidad, comparada con mutaciones previas también (FIG. 37).

SEQ ID NO: 1 – Secuencia de aminoácidos de CocE *Rhodococcus*



1 mvdgnysvas nvmvpmrdgv rlavdlyrpd adgvpvllv rnpdkfdvf awstqstnwl
61 efvrldgyavv iqdtrglfas egefvphvdd eadaedtlsw ileqawcdgn vgmfgvsylg
121 vtqwqaavsg vggkaiaps masadlyrap wygpggalsv eallgwsali gtglitsrd
181 arpedaadvf qlaailndva gaasvtplae qpllgrlipw vidqvvdhpd ndeswqsisl
241 ferlgglatp alitagwydg fvgeslrftv avkdnadarl vvgpwshsnl tgrnadrkfg
301 iaatypiquea ttmhkaffdr hlrgetdala gvpkvrlfvm gidewrdetd wplpdtaytp
361 fylggsgaan tstgggtlst sisgtesadt ylydpadpvp slggtllfhn gdngpadqrp
421 ihdrddvlcy stevlt dpve vtgtvsarlf vssavtdtdf taklvdvfpd graialcdgi
481 vrmryretlv nptlieagei yevaidmlat snvflpghri mvqvsssnfp kydrnsntgg
541 viareqleem ctavnrihrg pehpshivlp iikr

REFERENCIAS

[0252] 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).

[0253] 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).

[0254] Bauman JL and DiDomenico RJ. J Cardiovasc Pharmacol Ther 7, 195-202 (2002).

[0255] Benowitz, N.L. Clinical pharmacology and toxicology of cocaine. Pharmacol Toxicol 72, 3-12(1993).

[0256] 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).

[0257] 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).

[0258] 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).

[0259] Carmona et al. *Drug Metabolism & Disposition* 28, 367-371 (2000).

[0260] 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).

[0261] Carrera, M.R. et al. Treating cocaine addiction with viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10416-21 (2004).

[0262] 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).

[0263] Carroll FI, Howell LL and Kuhar M.J. *J Med Chem* 42, 2721-2736 (1999).

[0264] Case, D.A. et al. AMBER 8. University of California, San Francisco (2004).

[0265] The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 760-3 (1994).

[0266] Comer, S.D. et al. Depot naltrexone: long-lasting antagonism of the effects of heroin in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 159, 351-60 (2002).

[0267] 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).

[0268] 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).

[0269] Deng, S.X., de Prada, P. & Landry, D.W. Anticocaine catalytic antibodies. *J Immunol Methods* 269, 299-310 (2002).

[0270] 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).

[0271] Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-32 (2004).

[0272] Gao Y. and Brimijoin S. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 310, 1046-1052 (2004).

[0273] Gao, Y. et al. Gene transfer of cocaine hydrolase suppresses cardiovascular responses to cocaine in rats. *Mol Pharmacol* 67, 204-11 (2005).

[0274] 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).

[0275] Gorelick, D.A. Enhancing cocaine metabolism with butyrylcholinesterase as a treatment strategy. *Drug Alcohol Depend* 48, 159-65 (1997).

[0276] Grabowski et al. *Addictive Behaviors* 29, 1439-1464 (2004).

[0277] Inaba T. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 67, 1154-1157 (1989).

[0278] Kantak, K.M. Anti-cocaine vaccines: antibody protection against relapse. *Expert Opin Pharmacother* 4, 213-8 (2003).

[0279] Knuepfer MM. *Pharmacol Ther* 97, 181-222 (2003).

[0280] Ko, M.C. et al. Cocaine esterase: interactions with cocaine and immune responses in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 320, 926-33 (2007).

[0281] Korkegian, A., Black, M.E., Baker, D. & Stoddard, B.L. Computational thermostabilization of an enzyme. *Science* 308, 857-60 (2005).

[0282] Kosten et al. *Vaccine* 20, 1196-1204 (2002).

[0283] 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).

[0284] 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).

- [0285] Landry, D.W., Zhao, K., Yang, G.X., Glickman, M. & Georgiadis, T.M. Antibody-catalyzed degradation of cocaine. *Science* 259, 1899-901 (1993).
- [0286] Larsen, N.A. et al. Crystal structure of a bacterial cocaine esterase. *Nat Struct Biol* 9, 17-21 (2002).
- [0287] Lynch, T. J. et al. Cocaine detoxification by human plasma butyrylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol* 145, 363-71 (1997).
- [0288] Mackay, J.B.L. Erythroxyton coca. *Tropical Agriculturist* 6, 249 (1886).
- [0289] Martin, L.A. Brief notes on the cultivation of coca. *Agronomia* 17, 77-80 (1952).
- [0290] Mattes, C.E. et al. Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol* 145, 372-80 (1997).
- [0291] 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).
- [0292] 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).
- [0293] 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).
- [0294] Newman, A.H. & Rothman, R.B. *Addiction*, 169-192 (Elsevier,

Amsterdam, London, 2007).

[0295] 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).

[0296] 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).

[0297] 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).

[0298] Sun et al. *Molecular Pharmacology* (2002a).

[0299] Sun et al. *Pharmacology & Experimental Therapeutics* 302, 710-716 (2002b).

[0300] Turner, J.M. et al. Biochemical characterization and structural analysis of a highly proficient cocaine esterase. *Biochemistry* 41, 12297-307 (2002).

[0301] Veronese, F.M. & Harris, J.M. Introduction and overview of peptide and protein pegylation. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 453-6 (2002).

[0302] Wilson LD and Shelat C. *J Toxicol Clin Toxicol* 41, 777-788 (2003).

[0303] 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).

[0304] Yang, G. et al. Anti-Cocaine Catalytic Antibodies: A Synthetic Approach to Improved Antibody Diversity. J. Am. Chem. Soc. 118, 5881-5890 (1996).

[0305] PCT publication WO/2008/008358.

[0306] En vista de lo anterior, se observará que se logran las varias ventajas de la invención y se obtienen otras ventajas.

[0307] Como podrían introducirse varios cambios en los métodos y composiciones ya indicados sin apartarse del ámbito de la invención, se pretende que todo el material contenido en la descripción que antecede y se muestra en los dibujos acompañantes se interpretará como ilustrativo y no en un sentido limitante.

[0308] Todas las referencias citadas en esta especificación se incorporan aquí por referencia. La discusión de las referencias contenidas en esta especificación tiene como finalidad únicamente resumir las afirmaciones hechas por los autores, y no se hace ninguna admisión en el sentido de que cualquier referencia constituya arte previo. Los solicitantes se reservan el derecho de cuestionar la exactitud y pertinencia de las referencias citadas.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Una composición que contiene una cocaína esterasa (CocE) y un compuesto, en donde la CocE en la presencia del compuesto es más termoestable que la CocE en la ausencia del compuesto.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la CocE comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 1.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la CocE comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 1.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde la CocE comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 1.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde la CocE comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde la CocE es un mutante termoestable de una CocE natural, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
7. La composición de la reivindicación 6, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por 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

98

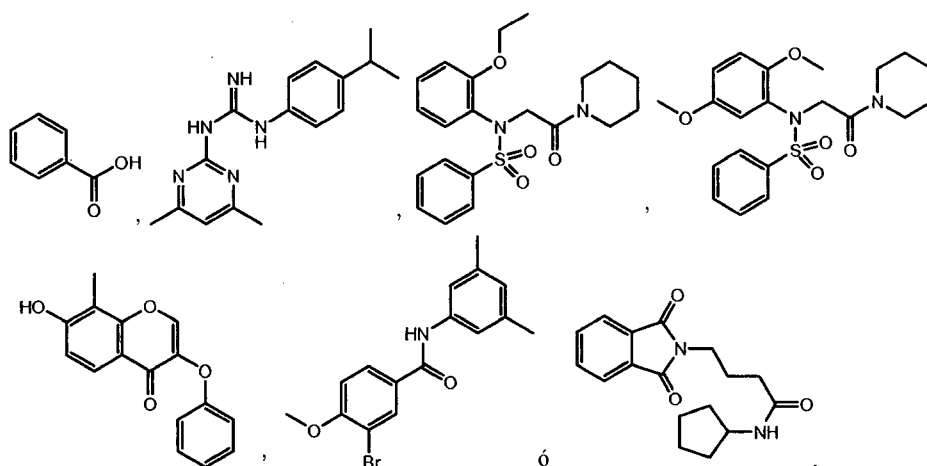
combinación de las mismas.

8. La composición de la reivindicación 6, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q.

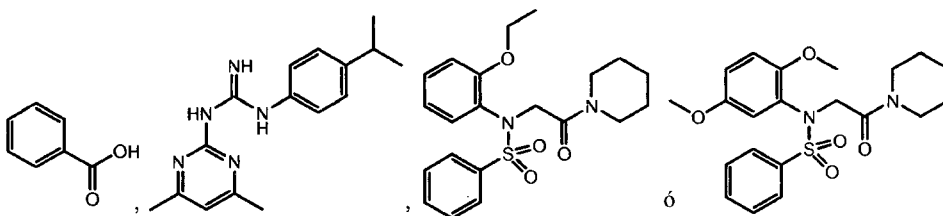
9. La composición de la reivindicación 6, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q.

10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la CocE es pegilada.

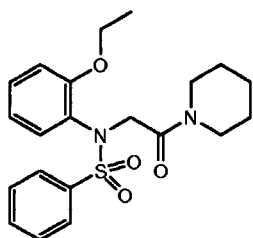
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el compuesto es



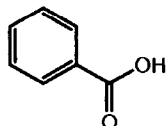
12. La composición de la reivindicación 11, en donde el compuesto es



13. La composición de la reivindicación 11, en donde el compuesto es



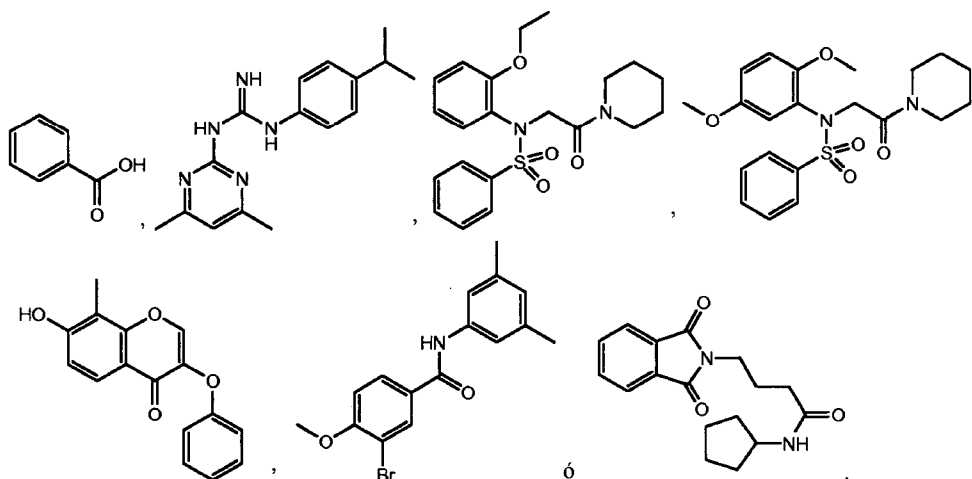
14. La composición de la reivindicación 11, en donde el compuesto es



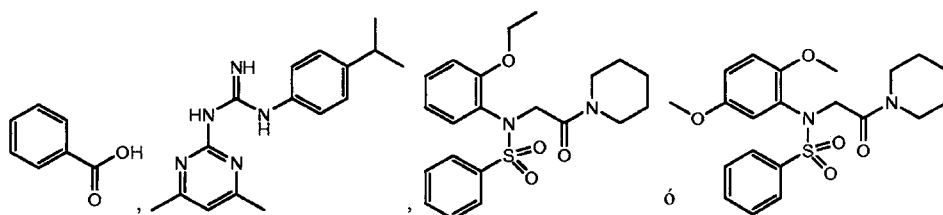
15. La composición de la reivindicación 11, que comprende más de uno de los compuestos.

16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable.

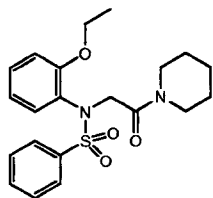
17. Un método de termoestabilizar una cocaína esterasa (CocE), método que comprende combinar la CocE con el compuesto



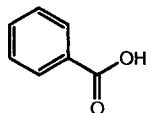
18. El método de la reivindicación 17, en donde el compuesto es



19. El método de la reivindicación 17, en donde el compuesto es



20. El método de la reivindicación 17, en donde el compuesto es



21. El método de la reivindicación 17, en donde la CocE se combina con más de uno de los compuestos.

22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17-21, en donde la CocE comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 1.

23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17-21, en donde la CocE comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 1.

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17-21, en donde la CocE comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 1.

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17-21, en donde la CocE comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17-24, en donde la CocE es un mutante termoestable de una CocE natural, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

27. El método de la reivindicación 26, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q.

28. El método de la reivindicación 26, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q.

29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17-28, en donde la CocE está *in vitro*.

30. El método de la reivindicación 29, en donde el compuesto se combina con la CocE durante la purificación de la CocE.

31. El método de la reivindicación 29, en donde el compuesto se combina con la CocE durante el almacenamiento de la CocE.

32. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17-27, en donde la CocE está en un mamífero vivo.

33. El método de la reivindicación 32, en donde el mamífero es un humano.

34. Un método de tratar un mamífero que sufre una enfermedad inducida por la cocaína, método que comprende administrar la composición de la reivindicación 16 al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la enfermedad inducida por la cocaína en el mamífero.

35. El método de la reivindicación 34, en donde el mamífero es un humano.

36. El método de la reivindicación 34 o 35, en donde la enfermedad inducida por la cocaína es sobredosis de cocaína, toxicidad de la cocaína, adicción a la cocaína, o dependencia de la cocaína.

37. El método de la reivindicación 36, en donde el mamífero es adicto a la cocaína.

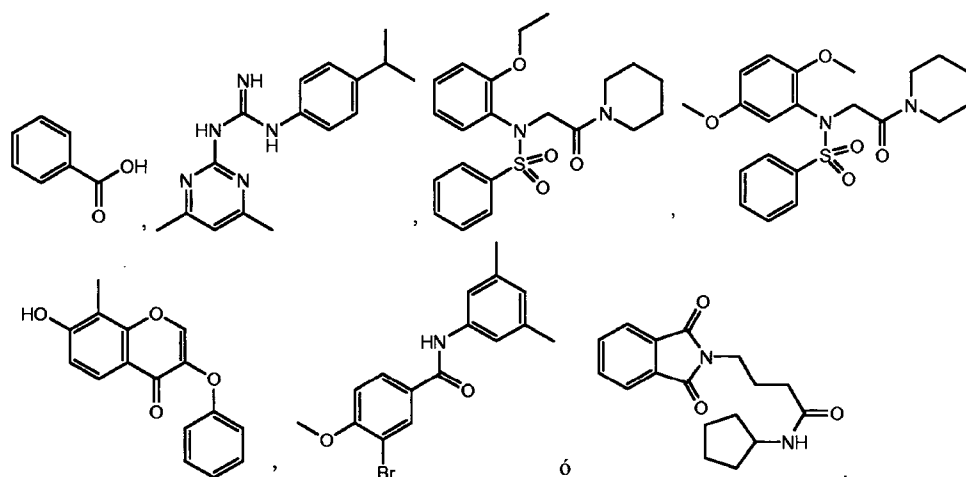
38. El método de la reivindicación 36, en donde el mamífero está sufriendo una sobredosis de cocaína.

39. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 34-38, en donde la CocE es un mutante termoestable de una CocE natural, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

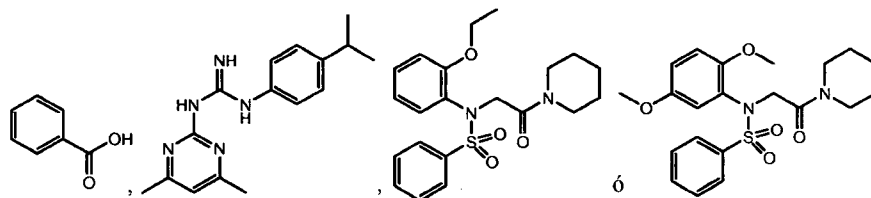
40. El método de la reivindicación 39, en donde CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q.

41. El método de la reivindicación 39, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q.

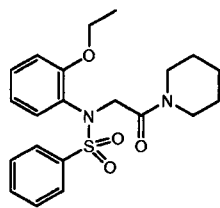
42. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 34-41, en donde el compuesto es



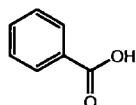
43. El método de la reivindicación 42, en donde el compuesto es



44. El método de la reivindicación 42, en donde el compuesto es



45. El método de la reivindicación 42, en donde el compuesto es



46. El método de la reivindicación 42, en donde la composición comprende más de uno de los compuestos.

47. Un método de tratar un mamífero que sufre una sobredosis de cocaína, método que comprende administrar la composición de la reivindicación 16 al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la cocaína en el mamífero.

48. El método de la reivindicación 47, en donde el mamífero es un humano.

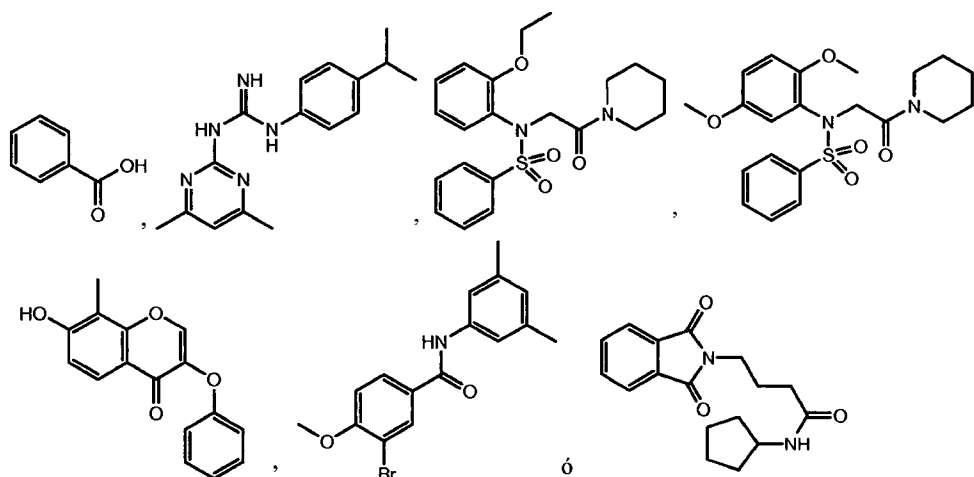
49. El método de la reivindicación 47 o 48, en donde la composición se administra al mamífero por vía intravenosa.

50. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 47-49, en donde la CocE es un mutante termoestable de una CocE natural, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

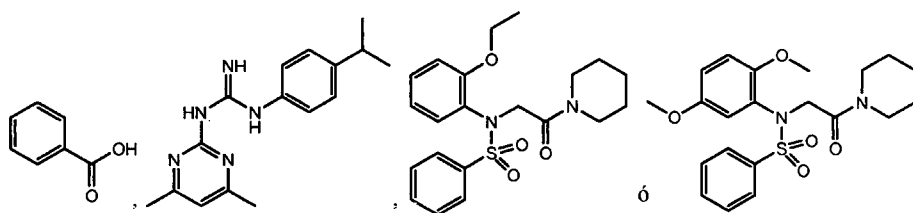
51. El método de la reivindicación 50, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q.

52. El método de la reivindicación 50, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q.

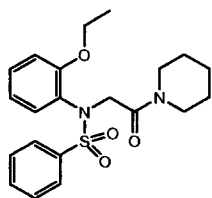
53. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 47-52, en donde el compuesto es



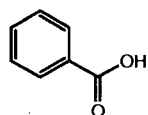
54. El método de la reivindicación 53, en donde el compuesto es



55. El método de la reivindicación 53, en donde el compuesto es



56. El método de la reivindicación 53, en donde el compuesto es



57. El método de la reivindicación 53, en donde la composición comprende más de uno de los compuestos.

58. Un método de tratar un mamífero que tiene una dependencia de la cocaína, método que comprende administrar la composición de la reivindicación 16 al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la dependencia de la cocaína en el mamífero.

59. El método de la reivindicación 58, en donde el mamífero es un

102

humano.

60. El método de la reivindicación 58 o 59, en donde la composición se administra al mamífero por vía intravenosa.

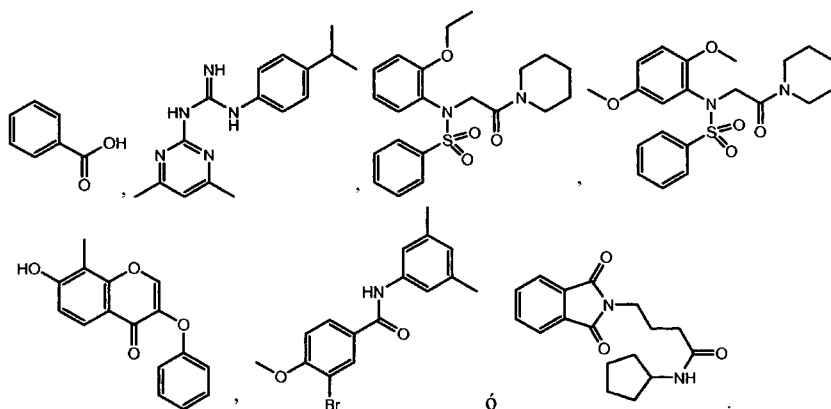
61. El método de la reivindicación 60, en donde la composición se administra a través de una bomba de mini-infusión.

62. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 58-61, en donde la CocE es un mutante termoestable de una CocE natural, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

63. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 58-62, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q o T172R/G173Q.

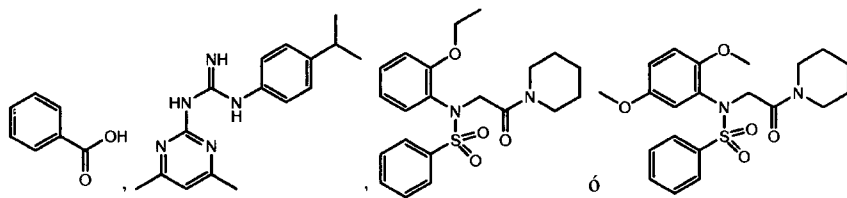
64. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 58-62, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q.

65. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 58-64, en donde el compuesto es

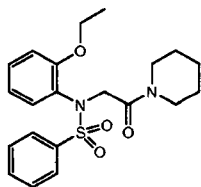


66. El método de la reivindicación 65, en donde el compuesto es

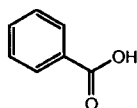
200



67. El método de la reivindicación 65, en donde el compuesto es



68. El método de la reivindicación 65, en donde el compuesto es



69. El método de la reivindicación 65, en donde la composición comprende más de uno de los compuestos.

70. Un método de determinar si un compuesto es un agente termoestabilizador para una proteína, método que comprende medir la termoestabilidad de la proteína con y sin el compuesto, en donde un compuesto, que hace que la proteína sea más termoestable, es un agente termoestabilizador para la proteína.

71. El método de la reivindicación 70, en donde la proteína es una enzima.

72. El método de la reivindicación 70, en donde la proteína es una proteasa.

73. El método de la reivindicación 70, en donde la proteína es una esterasa.

74. El método de la reivindicación 70, en donde la proteína es una cocaína esterasa

75. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 70-74, en donde el compuesto está presente en la composición en una concentración de menos de alrededor de 1 mM.

76. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 70-75, en donde el compuesto está presente en la composición en una concentración de menos de alrededor de 0.1 mM.

77. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 70-77, en donde el compuesto está presente en la composición en una concentración de menos de alrededor de 0.025 mM.

78. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 70-77, en donde la termoestabilidad se cuantifica midiendo la función de la proteína a una temperatura baja y una temperatura alta en la presencia y ausencia del compuesto,

en donde la temperatura baja está cerca de la temperatura óptima para la función de la proteína y

en donde la proteína es menos estable a la temperatura alta que a la temperatura baja.

79. El método de la reivindicación 78, en donde la función de la proteína es la actividad de la enzima.

80. El método de la reivindicación 78, en donde la función de la proteína es unión de ligando.

81. El método de la reivindicación 78, en donde la temperatura alta es alrededor de 37 °C.

82. El método de la reivindicación 78, en donde la temperatura alta es mayor que alrededor de 50 °C.

83. El método de la reivindicación 78, en donde la temperatura alta

105

es mayor que alrededor de 95 °C.

84. El método de la reivindicación 78, en donde la proteína es una esterasa y la temperatura alta es alrededor de 37 °C.

85. El método de la reivindicación 84, en donde la esterasa es una cocaína esterasa.

86. Uso de la composición de la reivindicación 16 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.

87. El uso de la reivindicación 86, en donde la enfermedad inducida por la cocaína es sobredosis de cocaína, toxicidad de la cocaína, adicción a la cocaína, o dependencia de la cocaína.

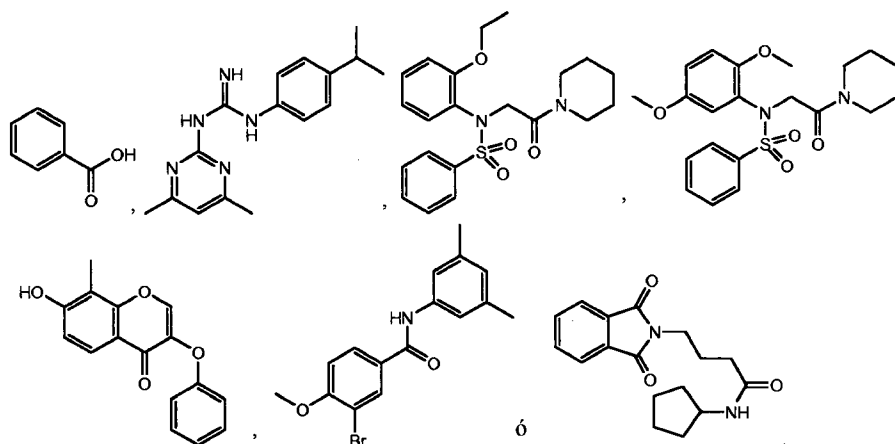
88. El uso de la reivindicación 86, en donde la enfermedad inducida por la cocaína es sobredosis de cocaína.

89. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 86-88, en donde la CocE es un mutante termoestable de una CocE natural, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

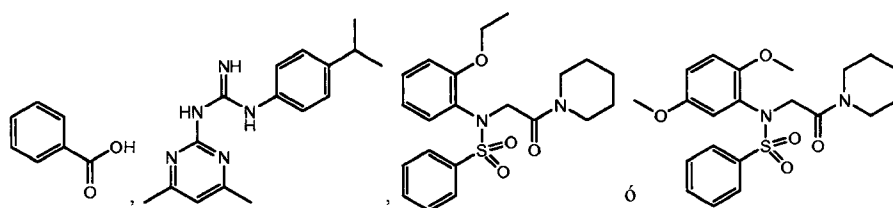
90. El uso de la reivindicación 89, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q.

91. El uso de la reivindicación 89, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q.

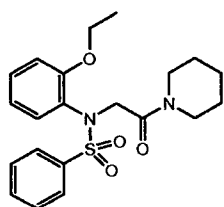
92. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 86-91, en donde el compuesto es



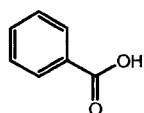
93. El uso de la reivindicación 92, en donde el compuesto es



94. El uso de la reivindicación 92, en donde el compuesto es



95. El uso de la reivindicación 92, en donde el compuesto es



96. El uso de la reivindicación 92, en donde la composición comprende más de uno de los compuestos.

97. Uso de la composición de la reivindicación 16 para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.

98. El uso de la reivindicación 97, en donde la enfermedad inducida por la cocaína es sobredosis de cocaína, toxicidad de la cocaína, adicción a la cocaína, o dependencia de la cocaína.

99. El uso de la reivindicación 97, en donde la enfermedad

208

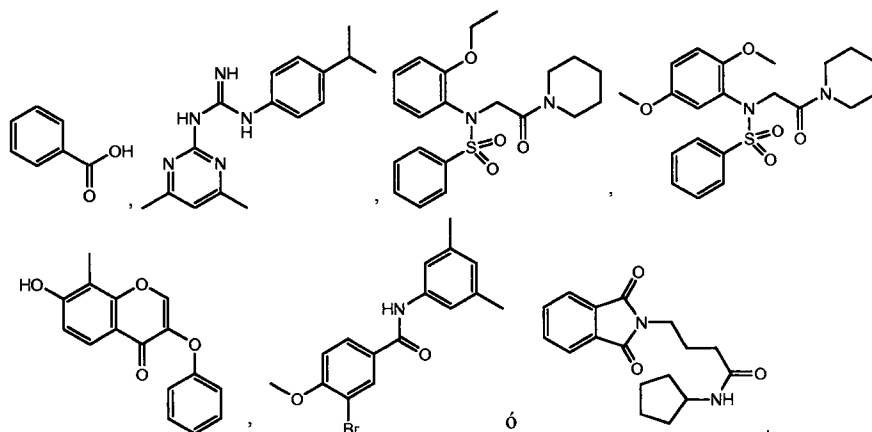
inducida por la cocaína es sobredosis de cocaína.

100. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 97-99, en donde la CocE es un mutante termoestable de una CocE natural, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

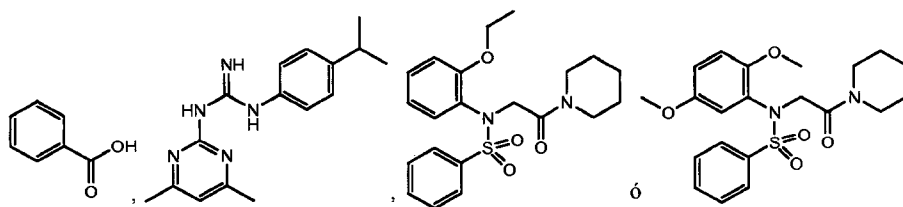
101. El uso de la reivindicación 100, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, o T172R/G173Q.

102. El uso de la reivindicación 100, en donde la CocE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 excepto por la sustitución L169K/G173Q.

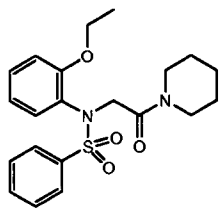
103. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 97-102, en donde el compuesto es



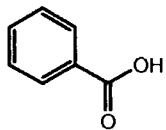
104. El uso de la reivindicación 100, en donde el compuesto es



105. El uso de la reivindicación 100, en donde el compuesto es



106. El uso de la reivindicación 94, en donde el compuesto es



107. El uso de la reivindicación 99, en donde más de uno de los compuestos está en la composición.

108. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de CocE que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido de CocE codificado tiene

- (a) las sustituciones L169K y G173Q, y
- (b) actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37 °C comparada con la CocE natural.

109. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 108, en donde la secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1.

110. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 108, en donde la secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1.

111. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 108, en donde la secuencia de aminoácidos tiene por lo menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1.

112. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 108, que codifica un polipéptido de CocE que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 excepto

por las sustituciones L169K y G173Q.

113. El polipéptido de la CocE codificado por el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 108-112.

114. Una composición que comprende el polipéptido de la CocE de la reivindicación 113 en una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable.

115. Un método de tratar un mamífero que sufre una enfermedad inducida por la cocaína, método que comprende administrar la composición de la reivindicación 114 al mamífero en una manera suficiente para reducir los efectos de la enfermedad inducida por la cocaína en el mamífero.

116. Uso de la composición de la reivindicación 114 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.

117. Uso de la composición de la reivindicación 114 para el tratamiento de una enfermedad inducida por la cocaína.

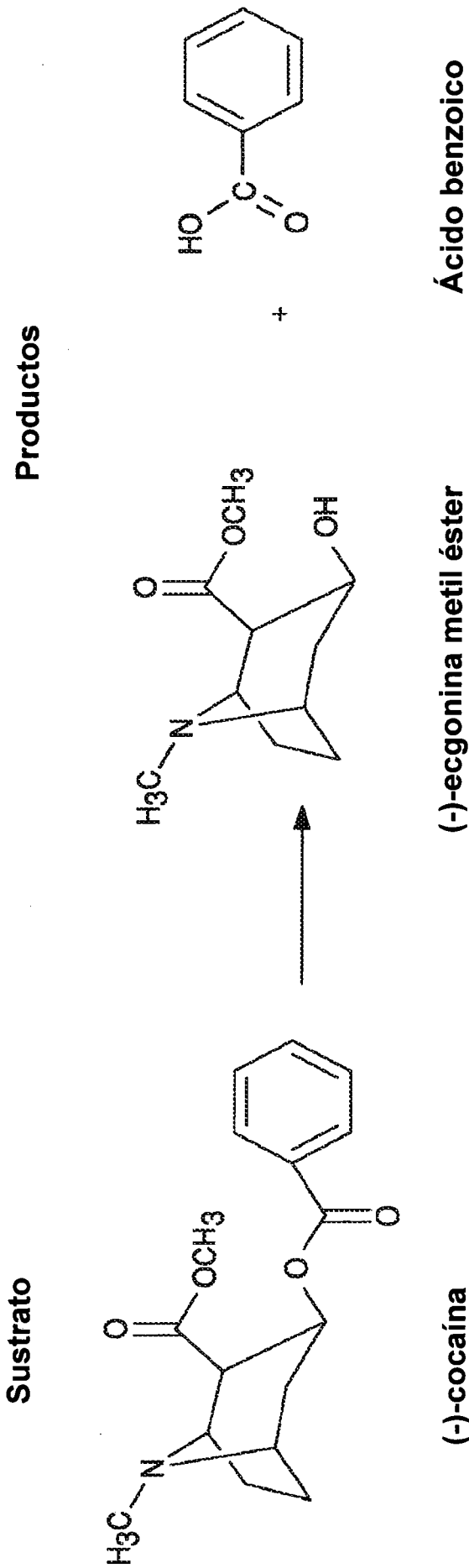


FIG. 1

11

2 / 37

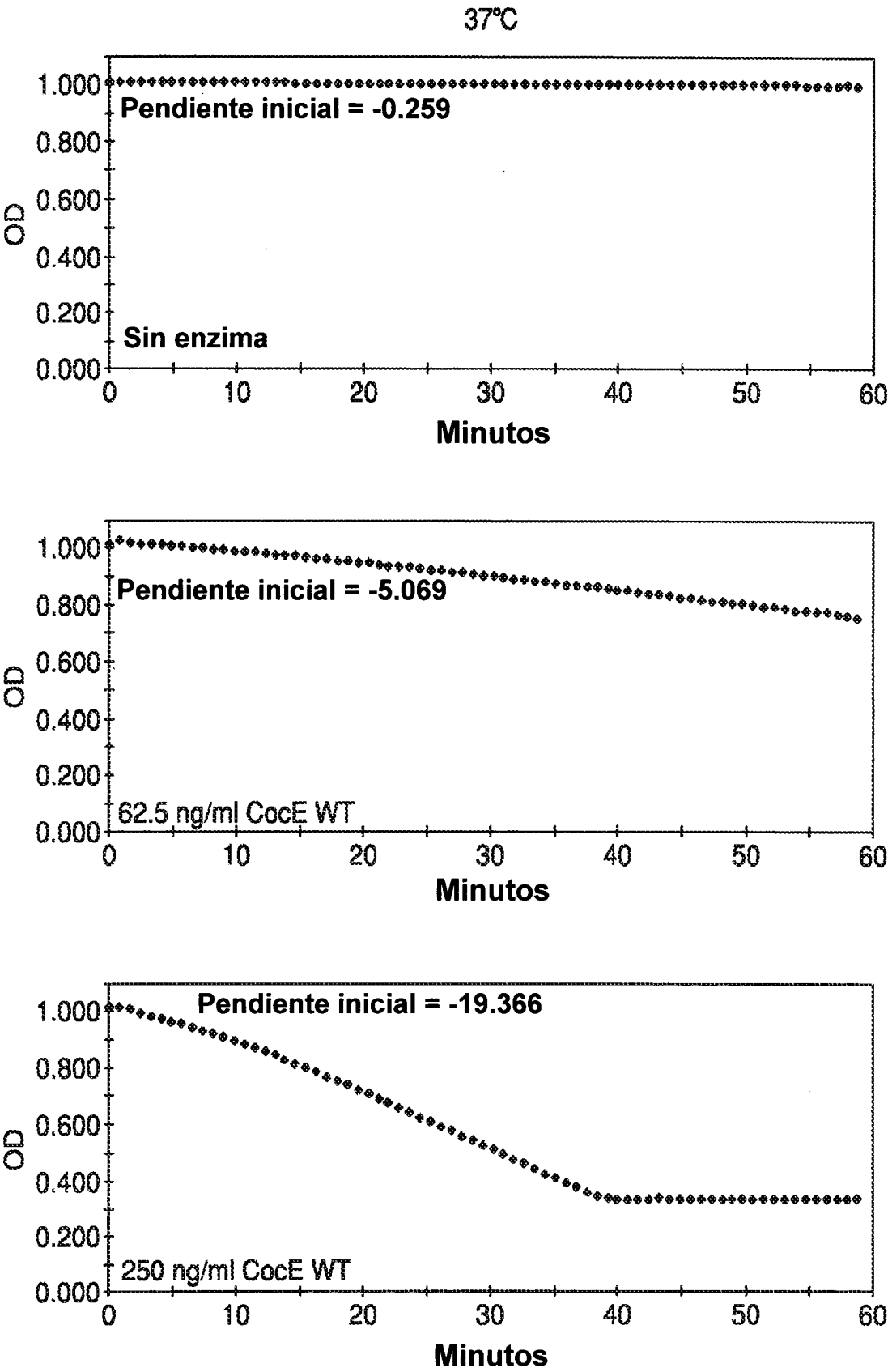


FIG. 2

112

3 / 37

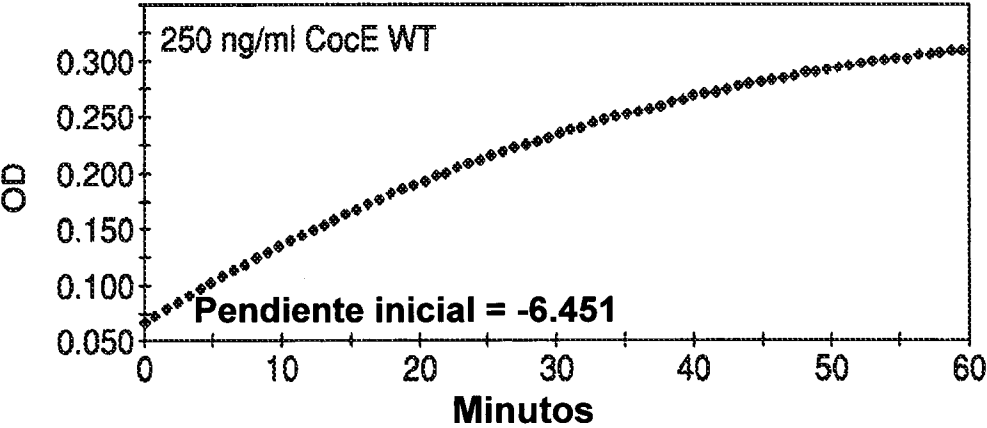
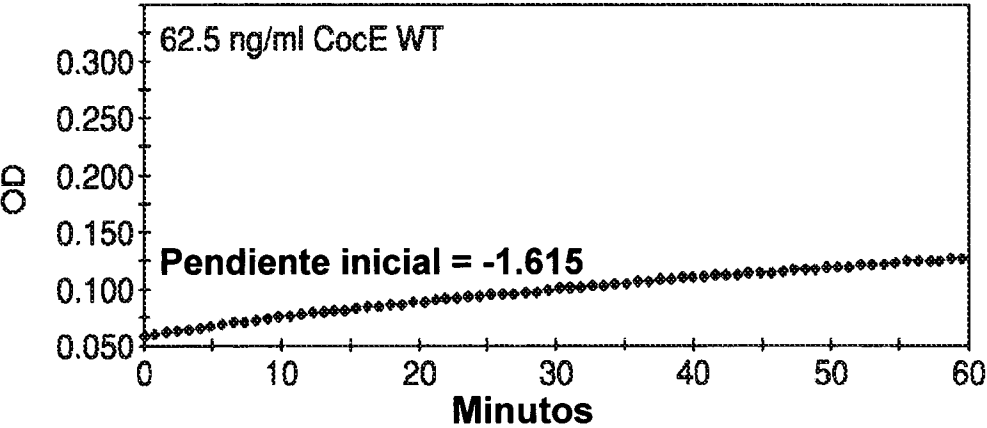
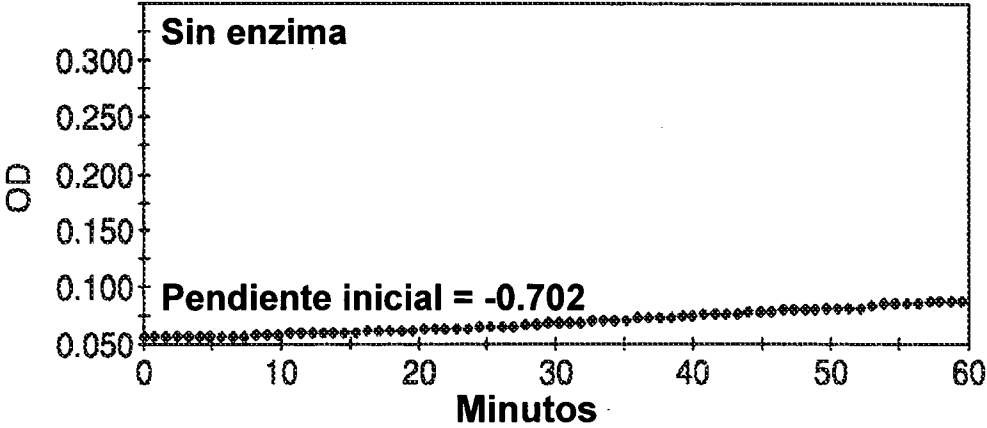
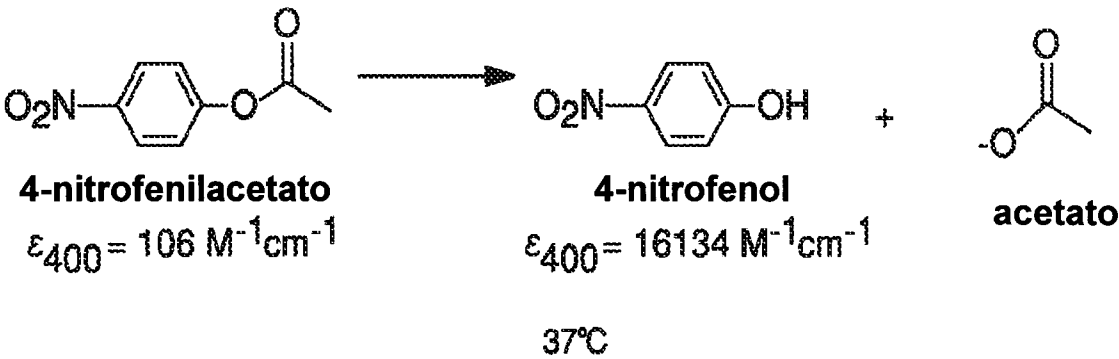


FIG. 3

113

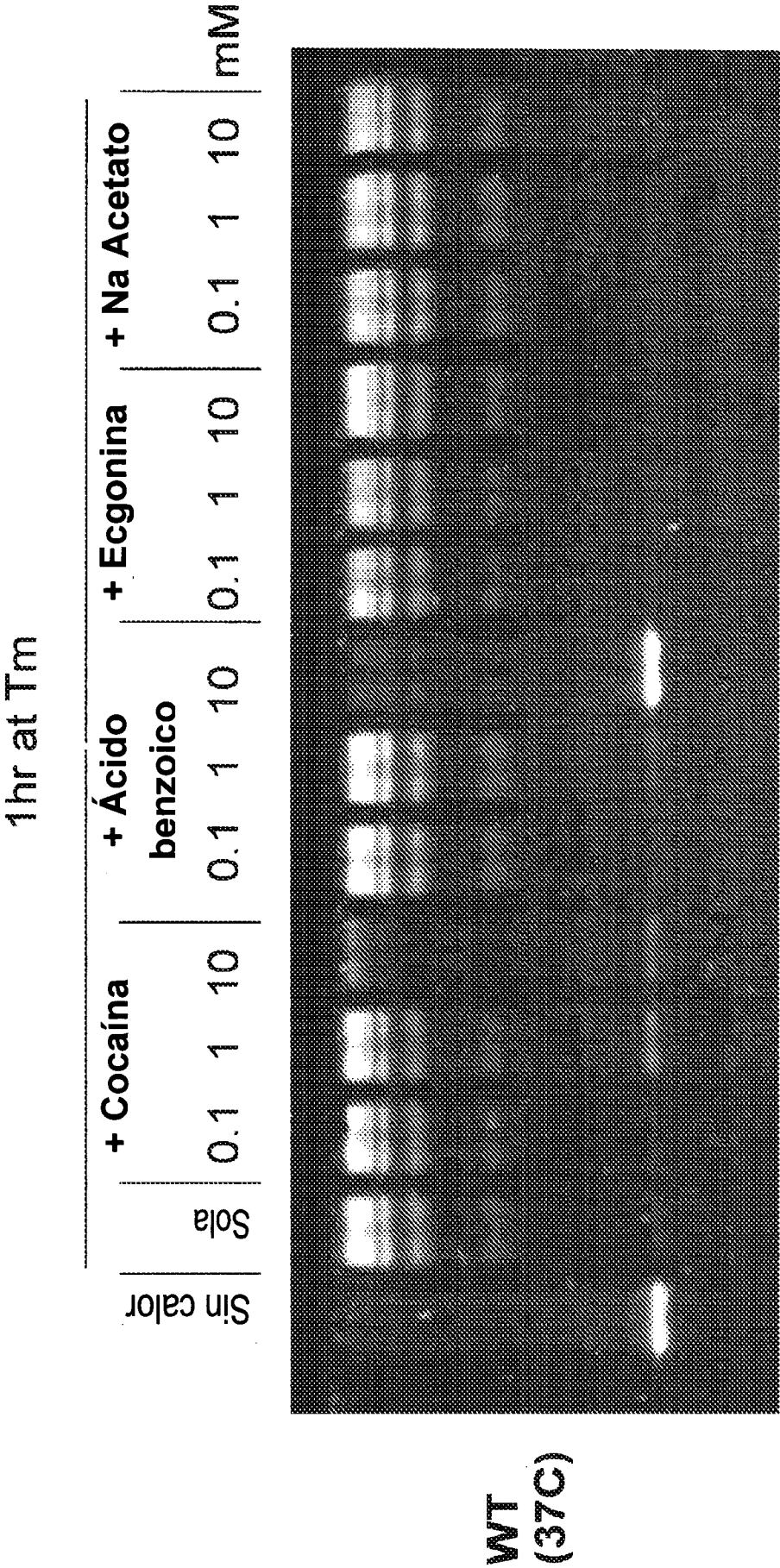


FIG. 4

214

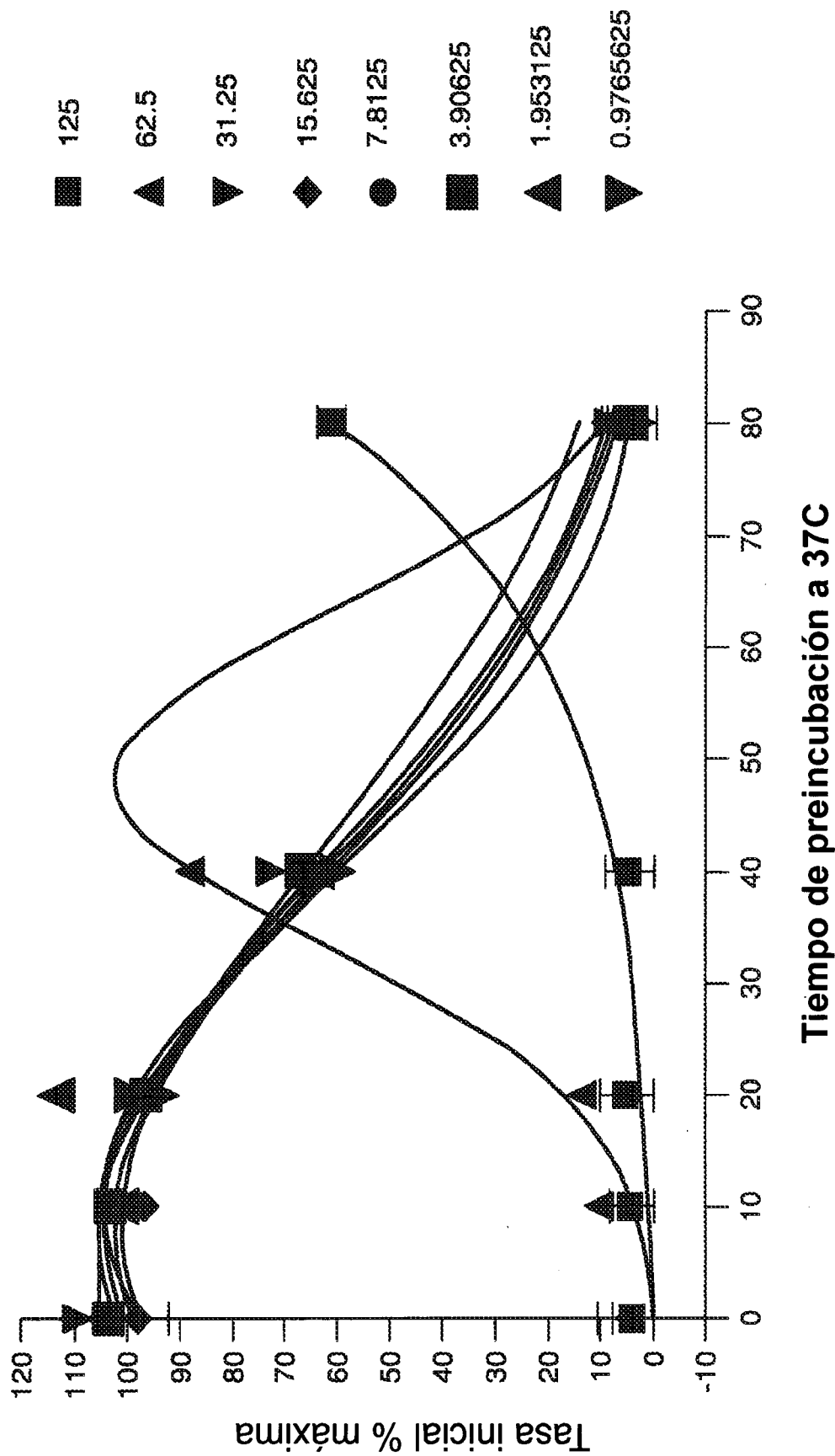


FIG. 5

215

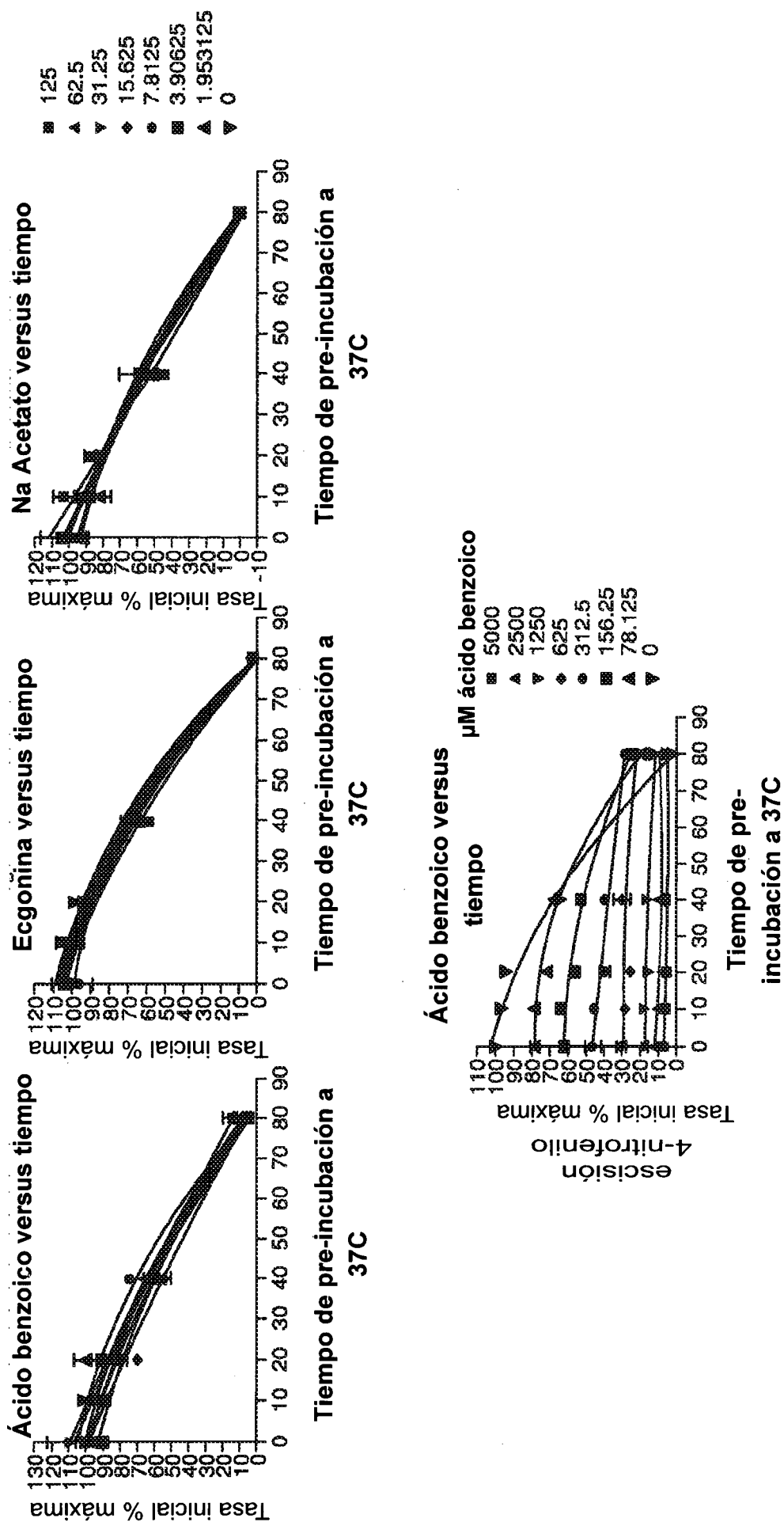
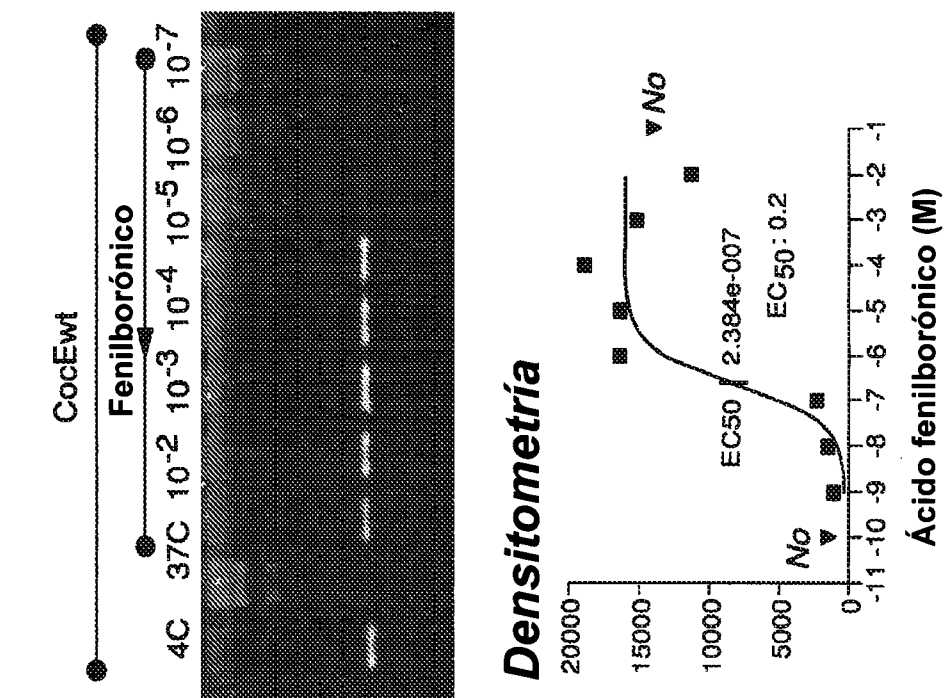
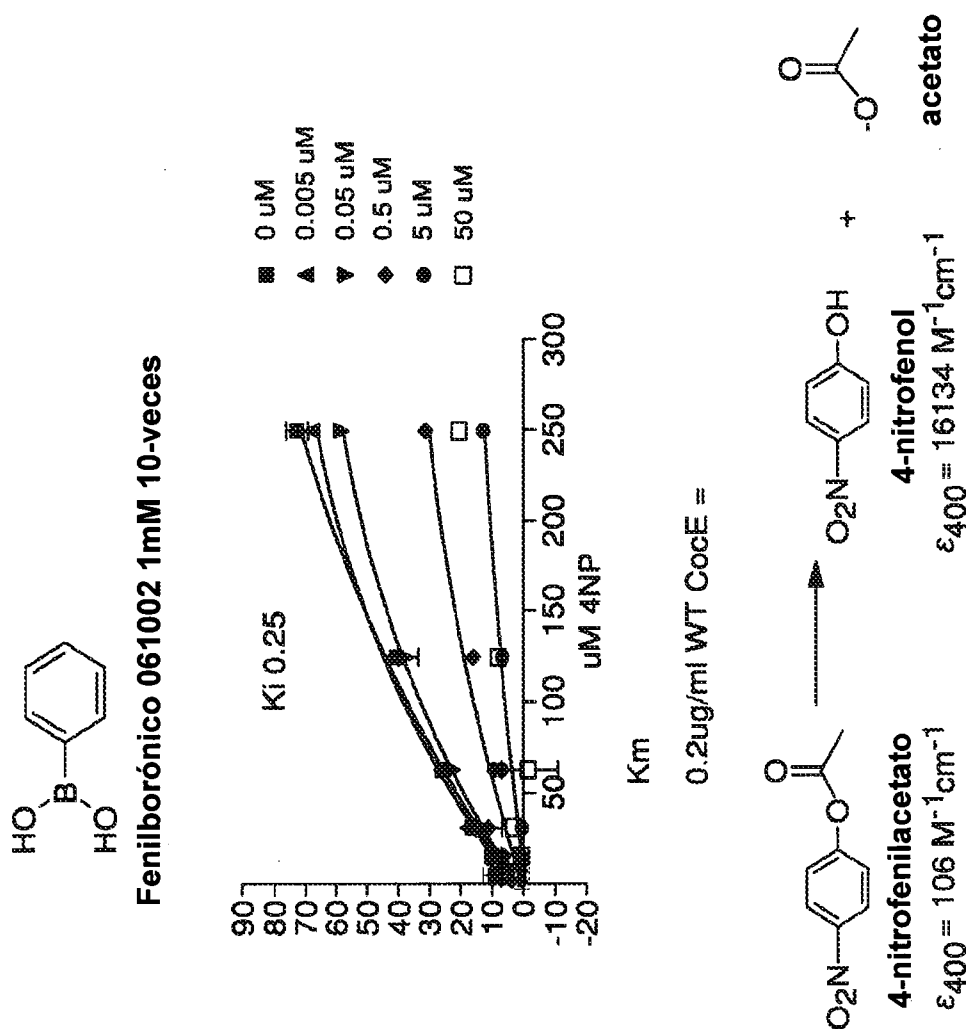


FIG. 6



Se correlaciona bien con



701

7/7

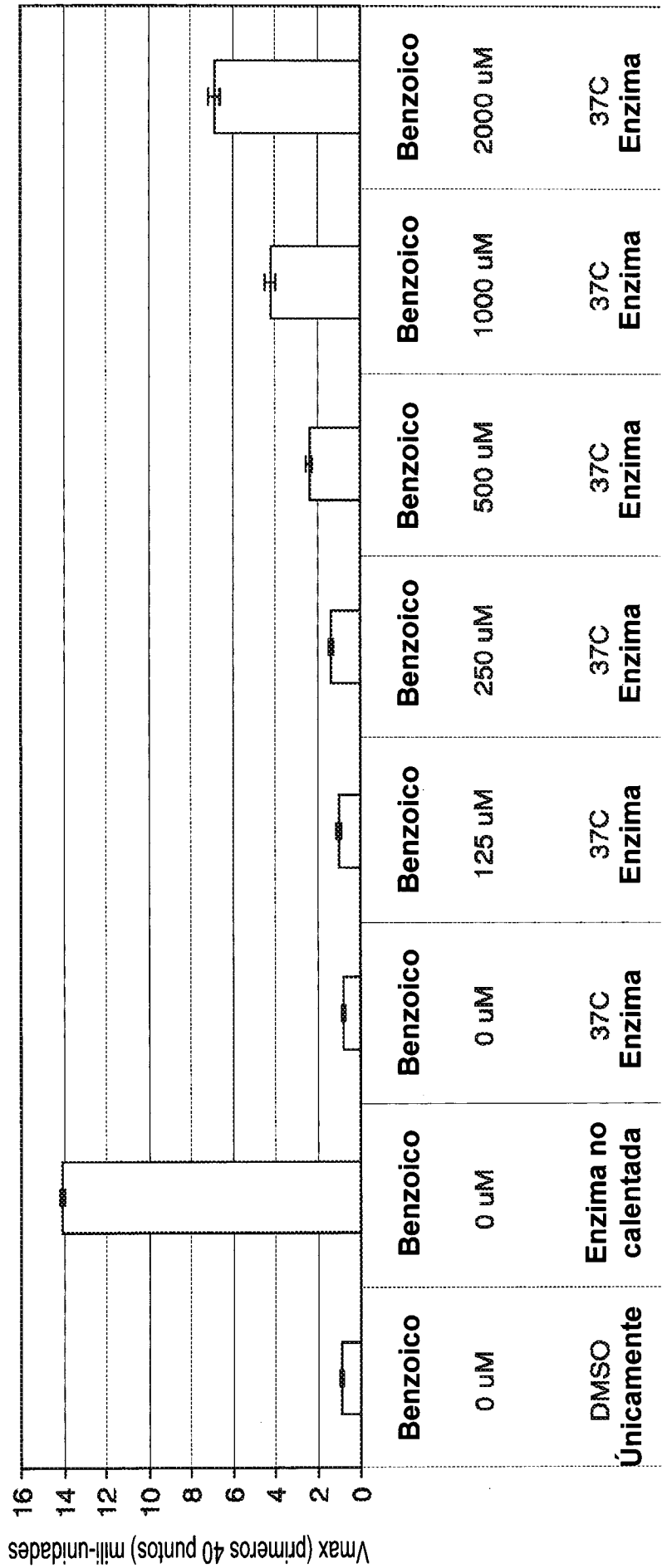


FIG. 8

178

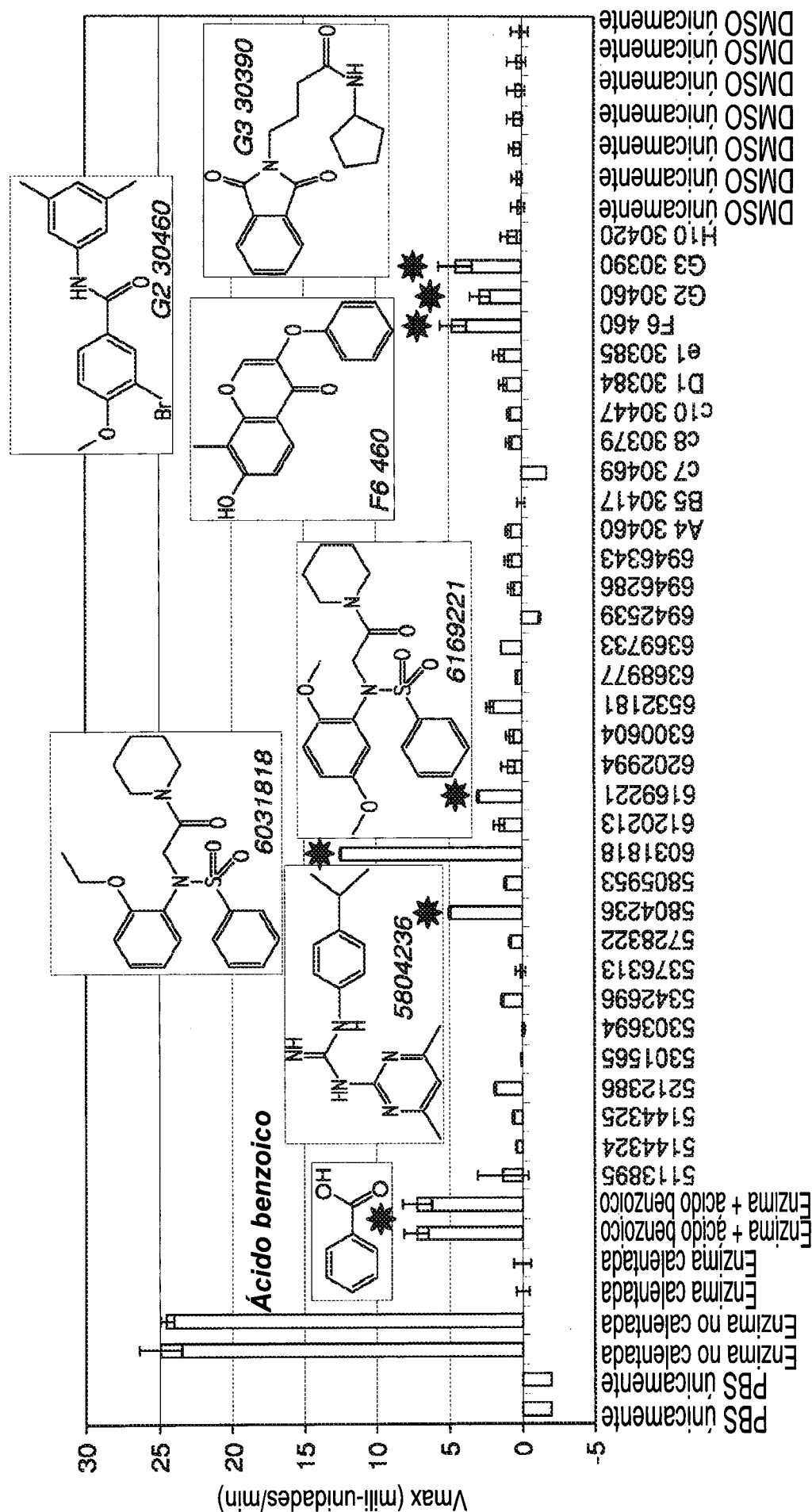


FIG. 9

119

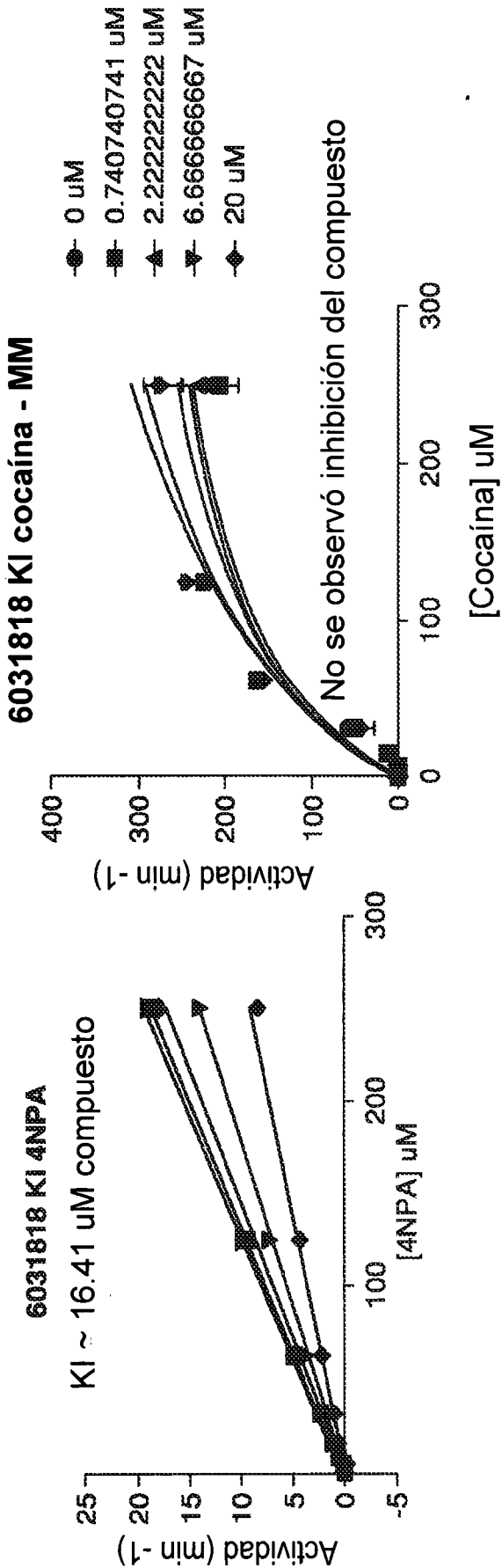
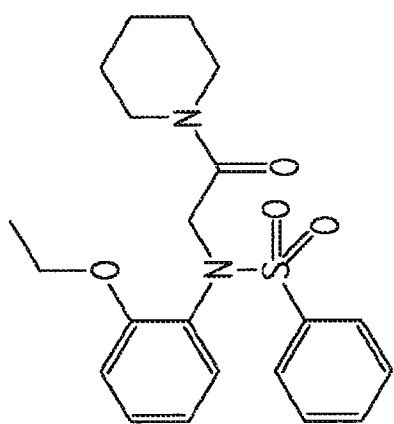
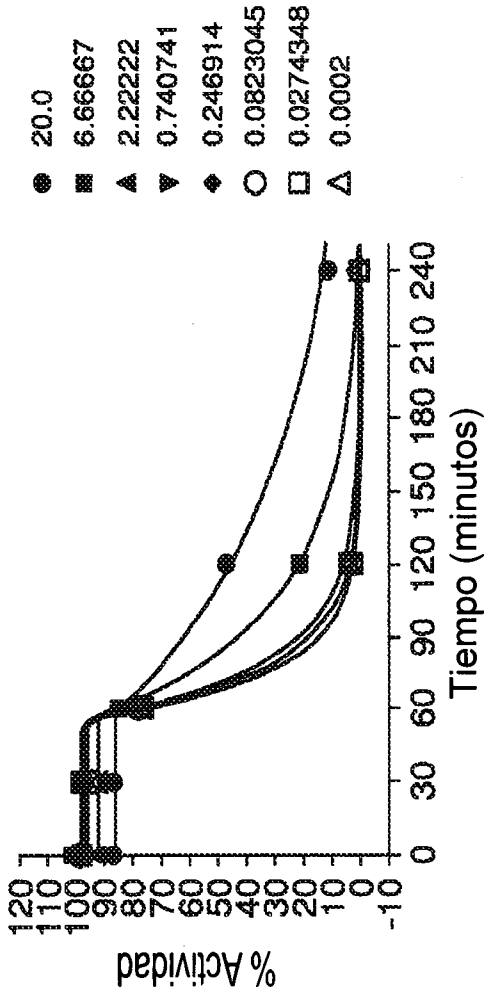


FIG. 10

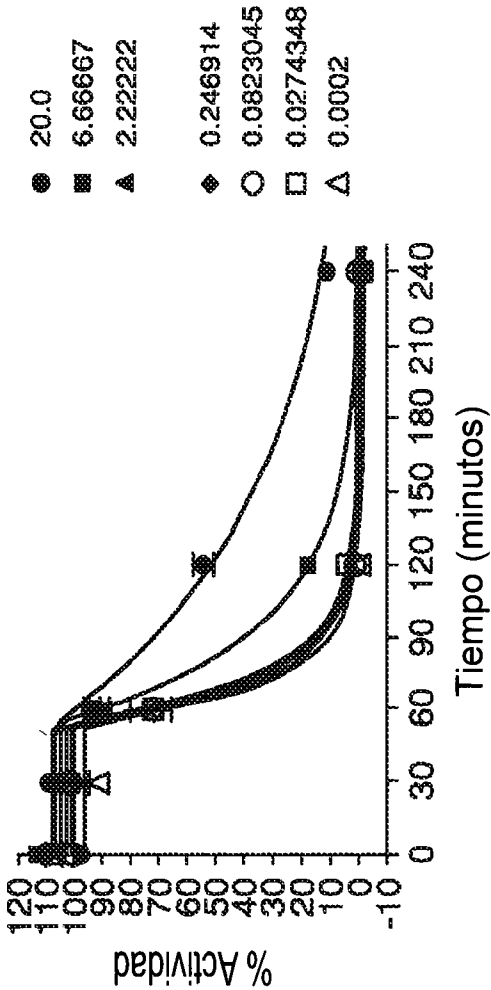
220

6031818 estabilización (pruebas en 4NPA)



Semivida
69.29
30.60
16.11
12.38
13.84
13.68
14.38
12.18

6031818 estabilización (pruebas en cocaína)



Semivida
64.05
25.39
12.94
11.61
10.76
11.97
14.10

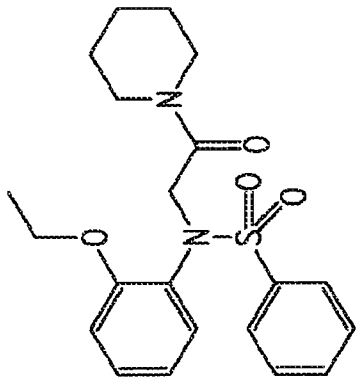


FIG. 11

12

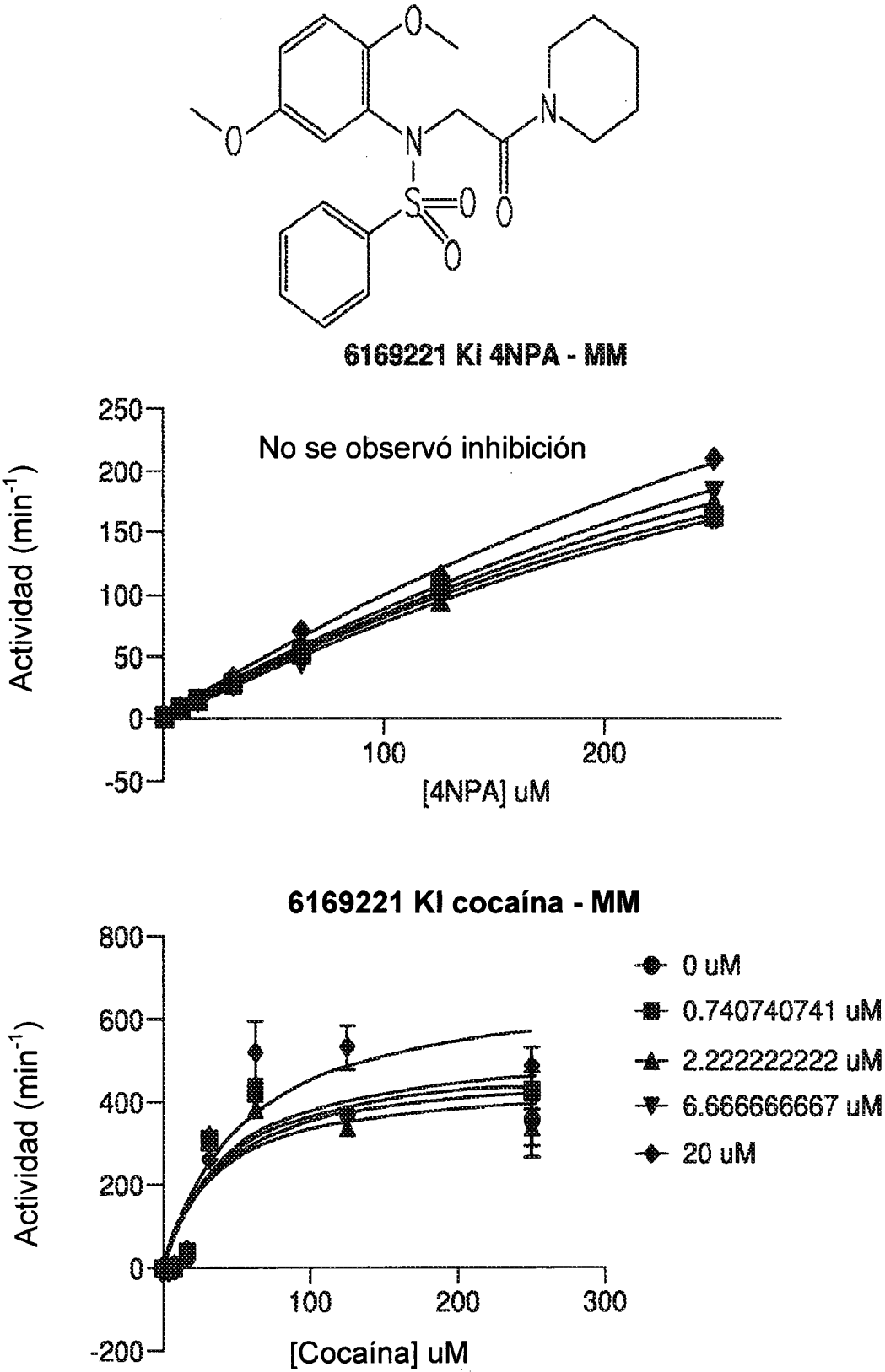
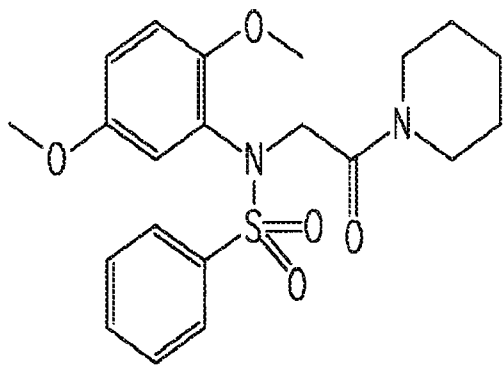
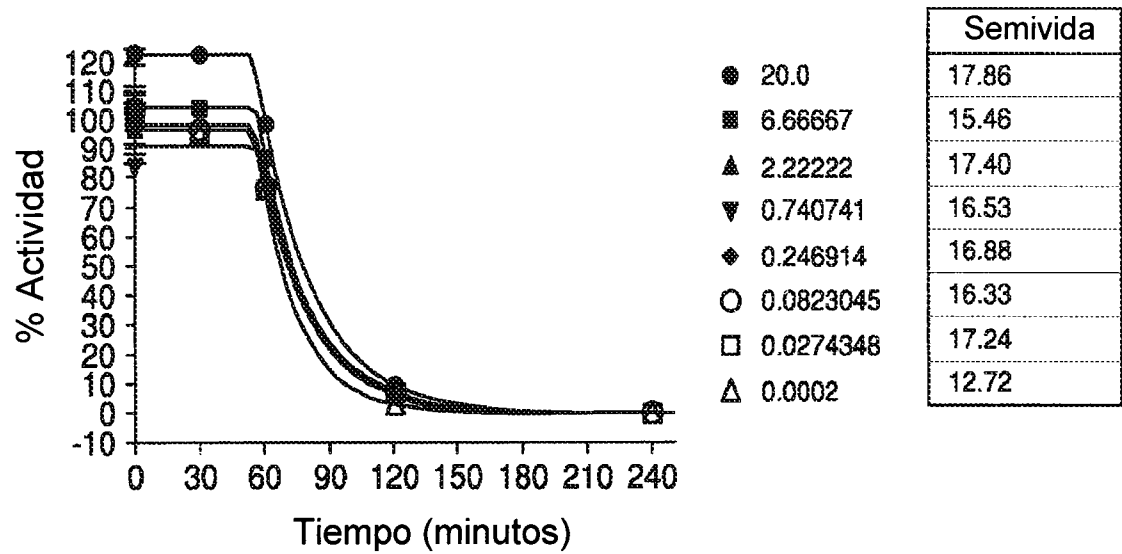


FIG. 12

122



6169221 estabilización (pruebas en 4NPA)



6169221 estabilización (pruebas en cocaína)

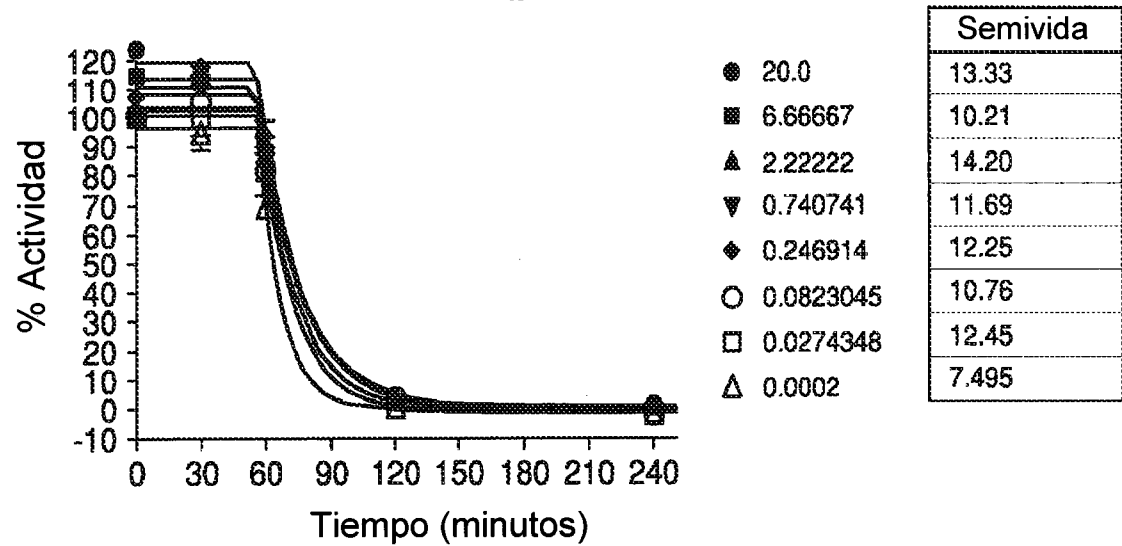


FIG. 13

123

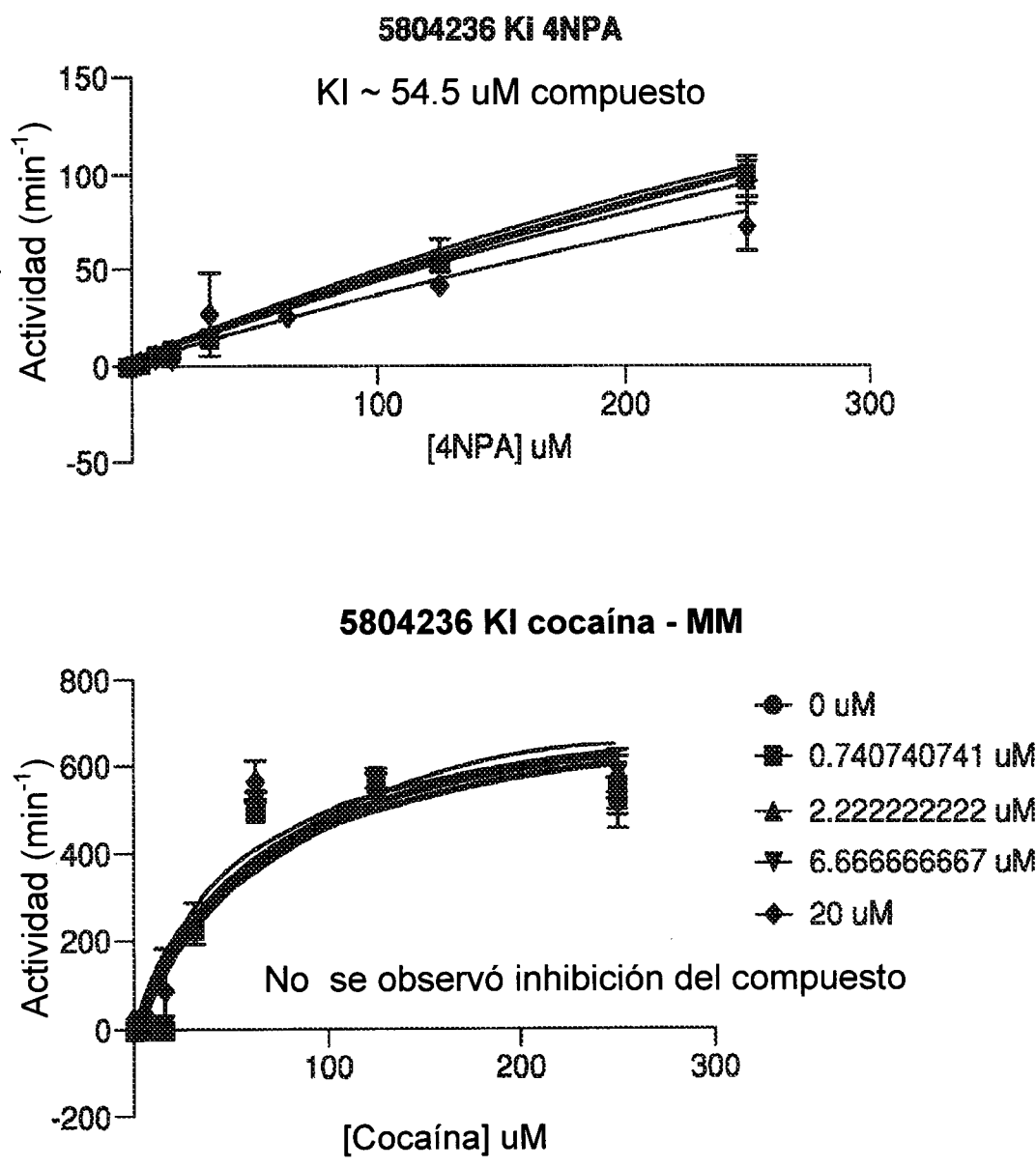
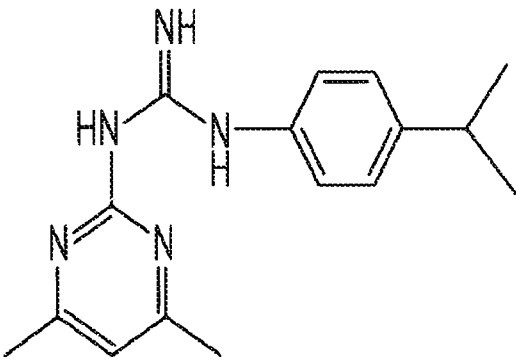


FIG. 14

724

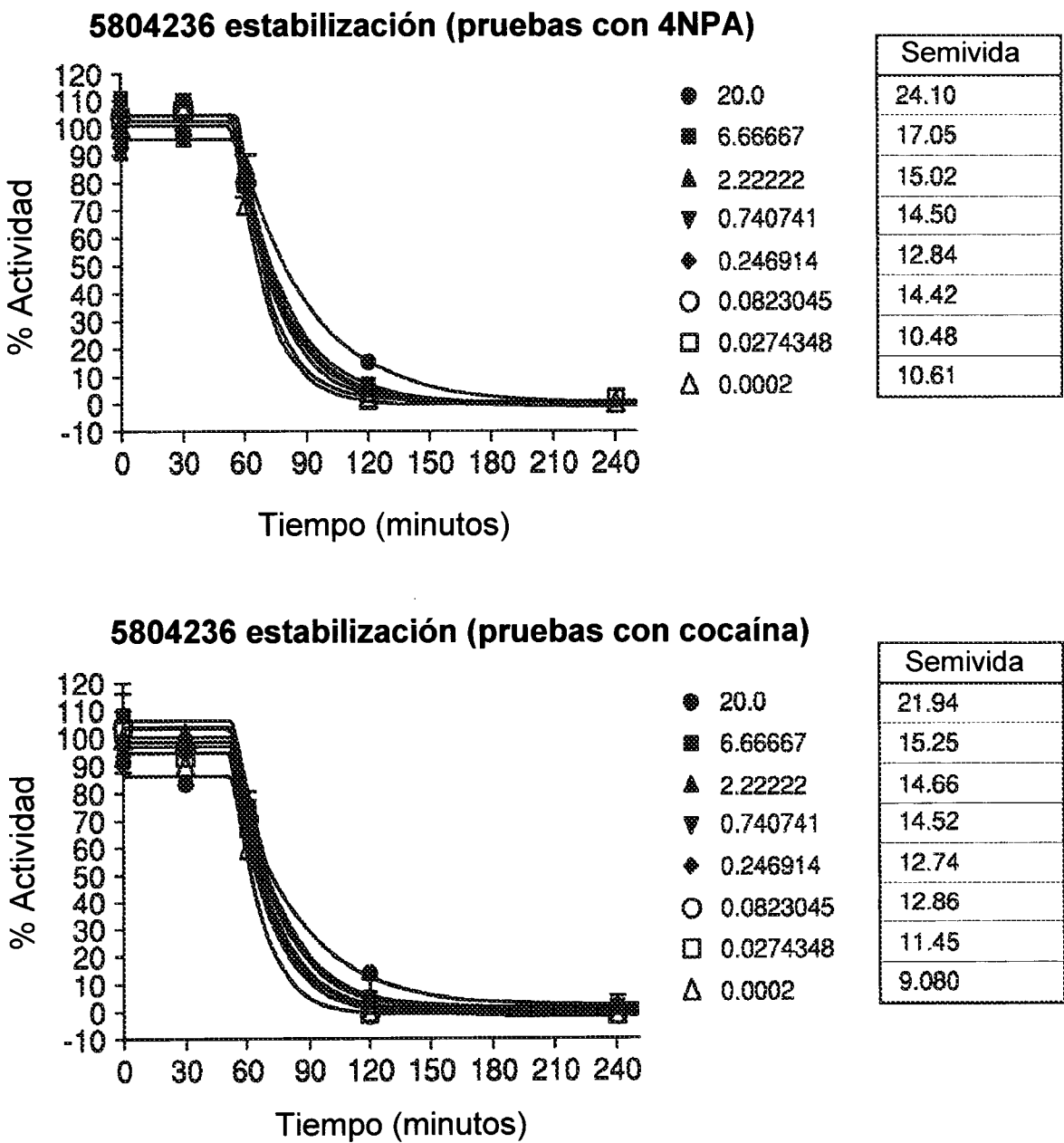
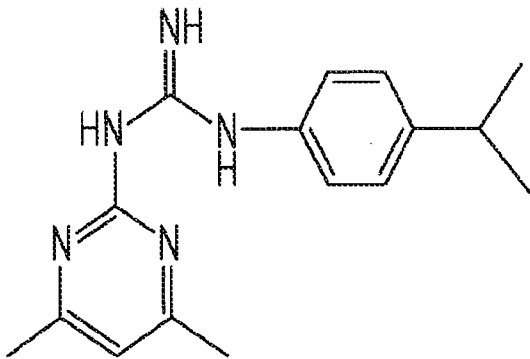


FIG. 15

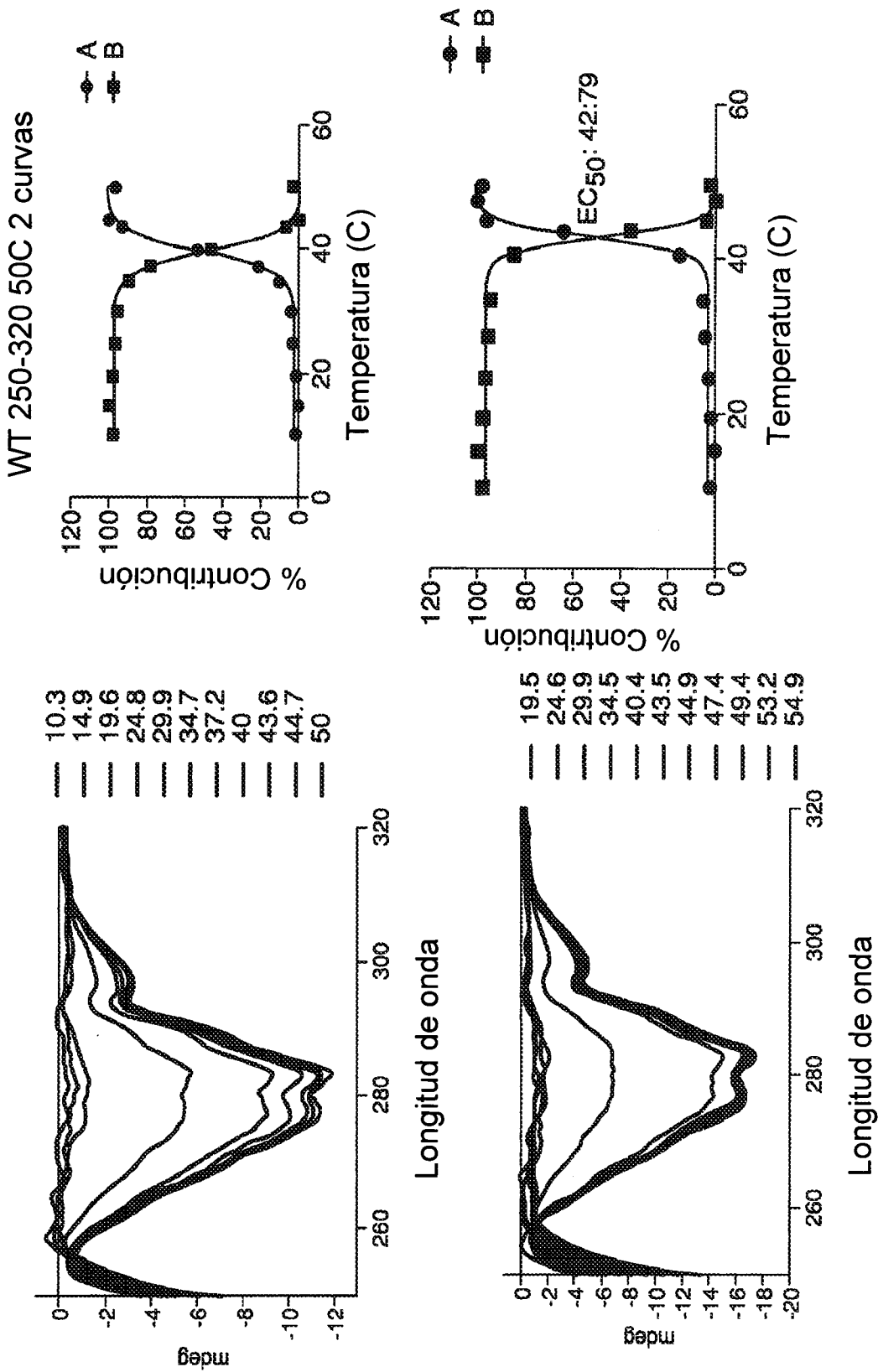


FIG. 16

726

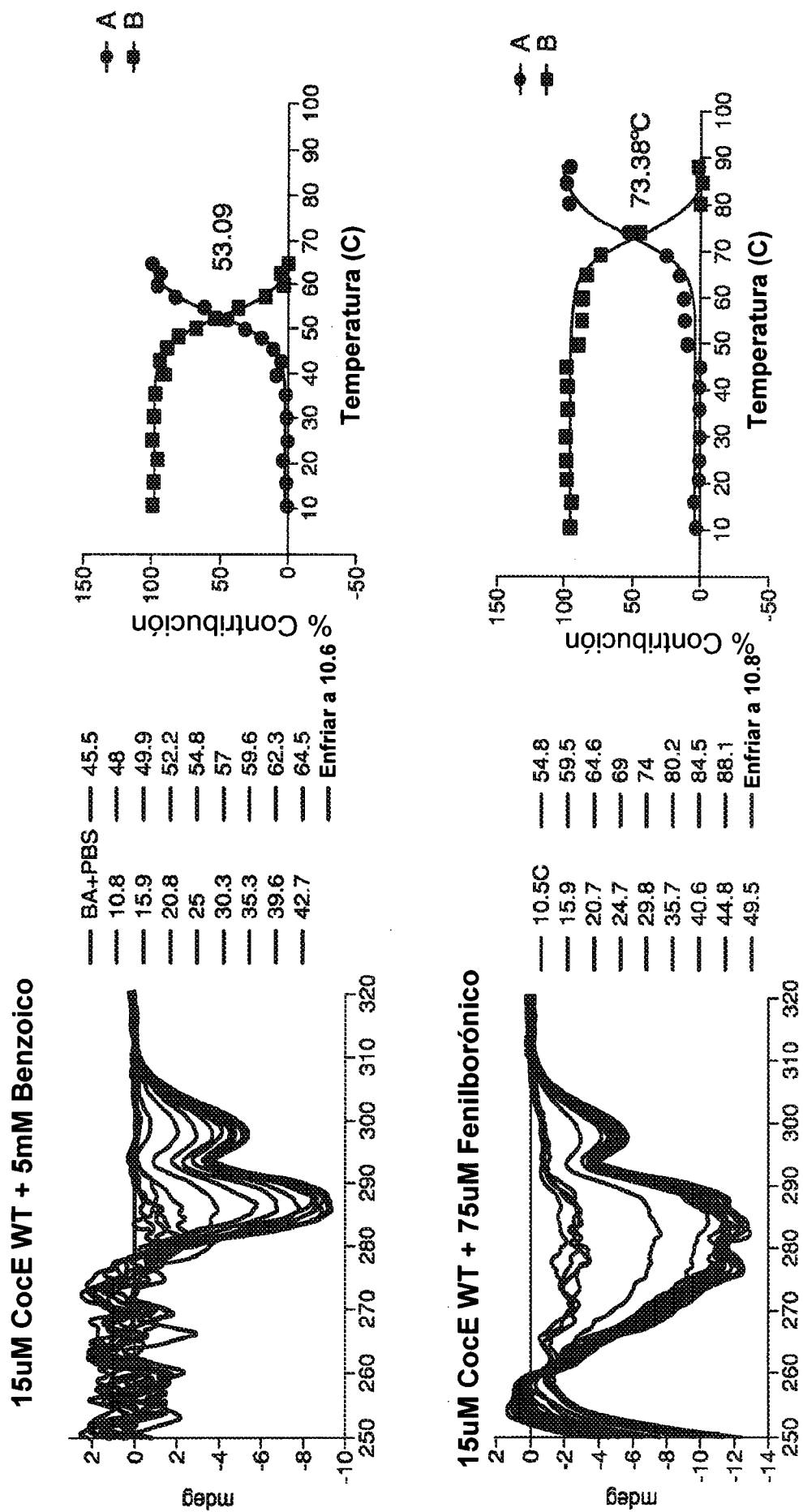


FIG. 17

22

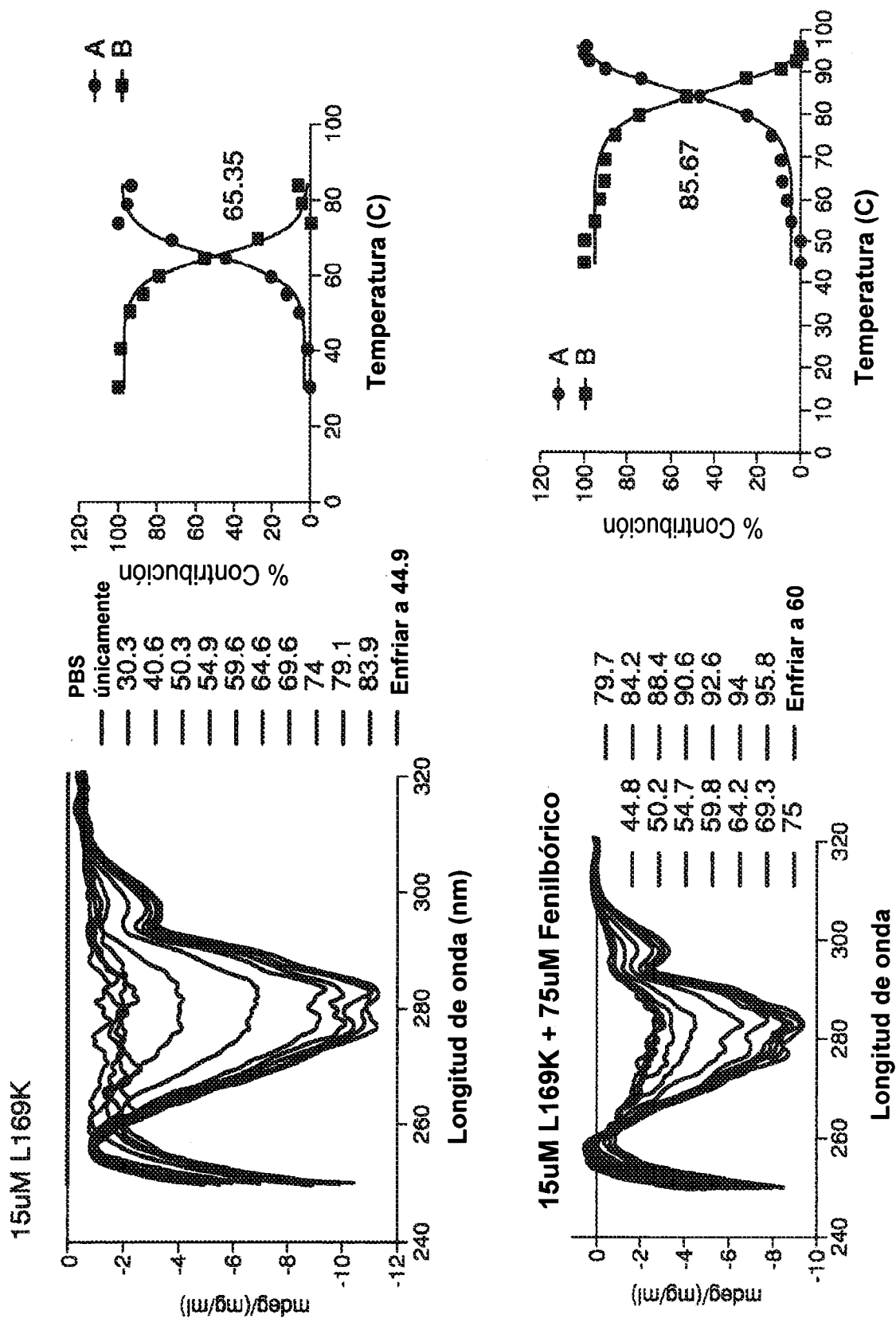
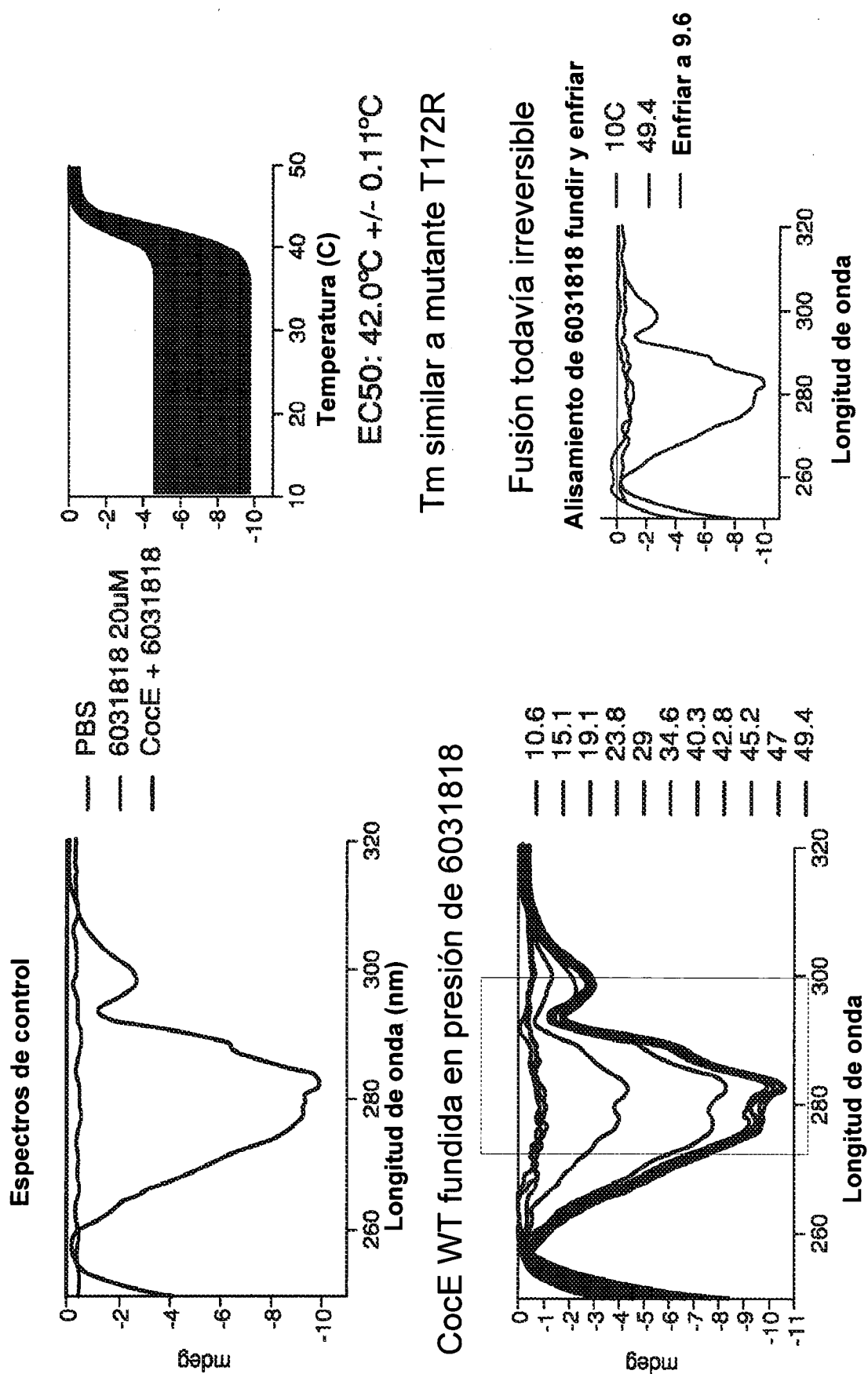


FIG. 18



உள்ளே

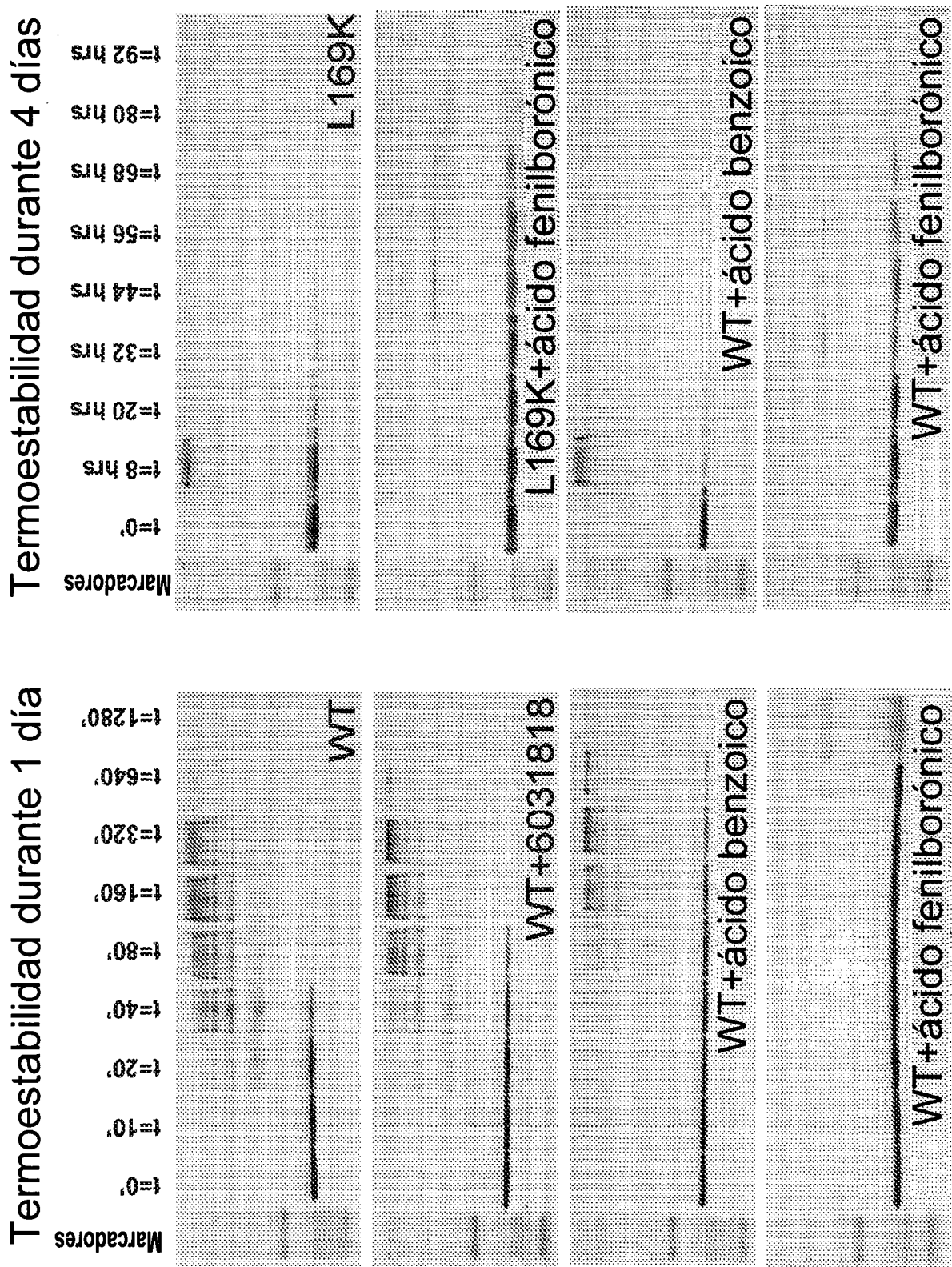
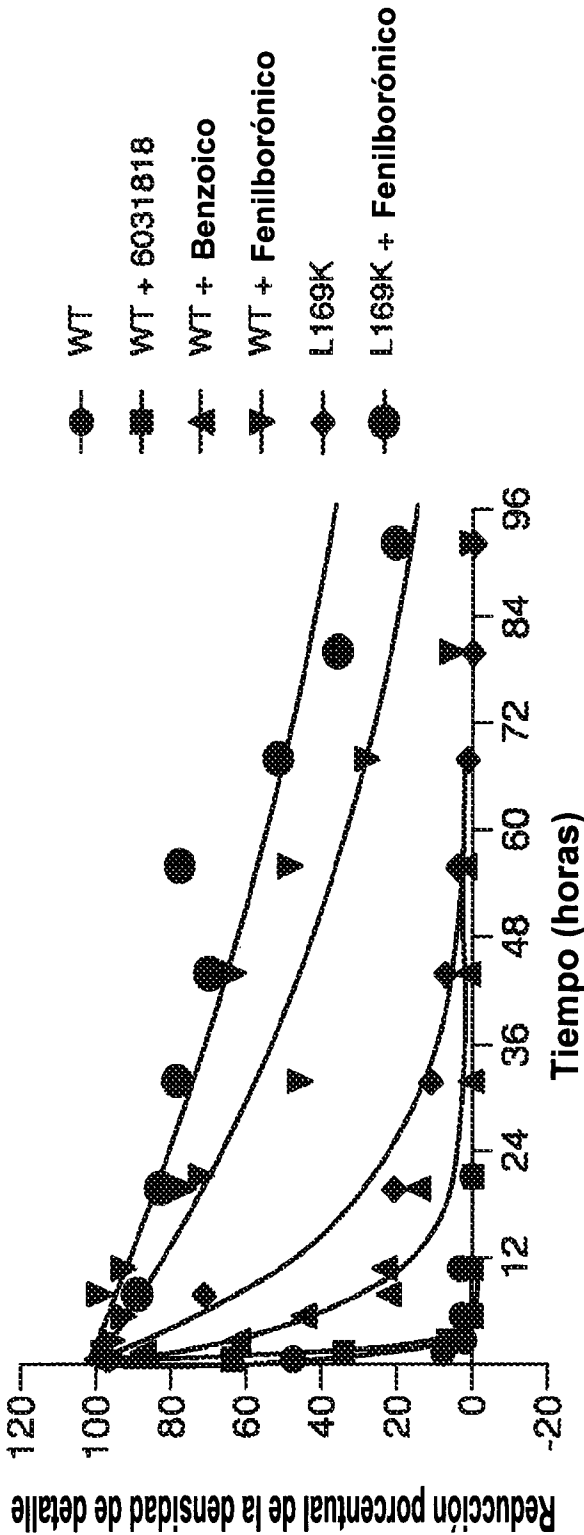


FIG. 20

770



Semivida	
WT	0.5730
WT + 6031818	0.8863
WT + Benzoico	4.223
WT + Fenilborónico	45.03
L169K	10.85
L169K + Fenilborónico	81.96

FIG. 21

131

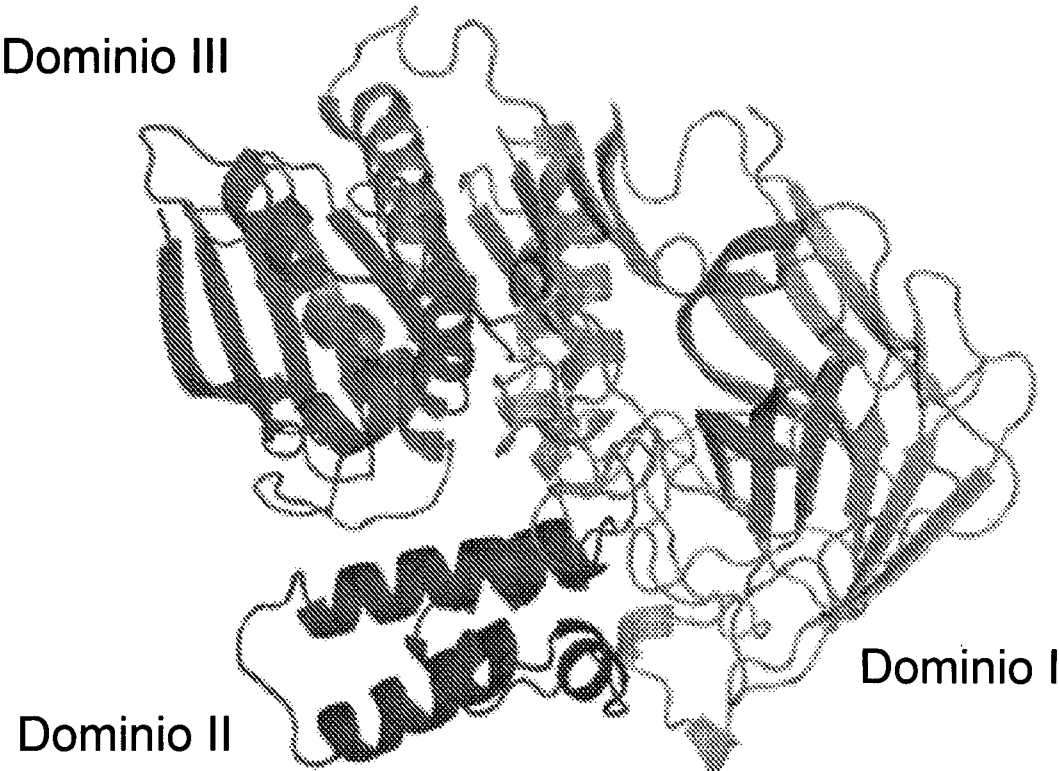


FIG. 22A

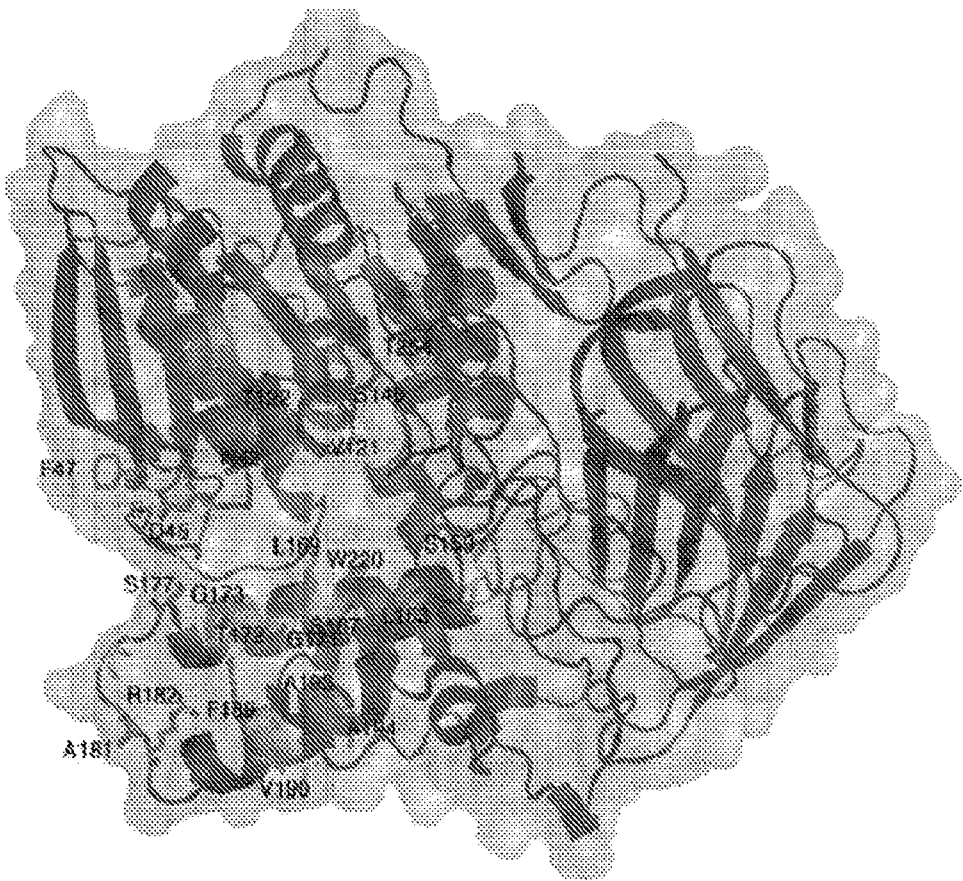


FIG. 22B

132

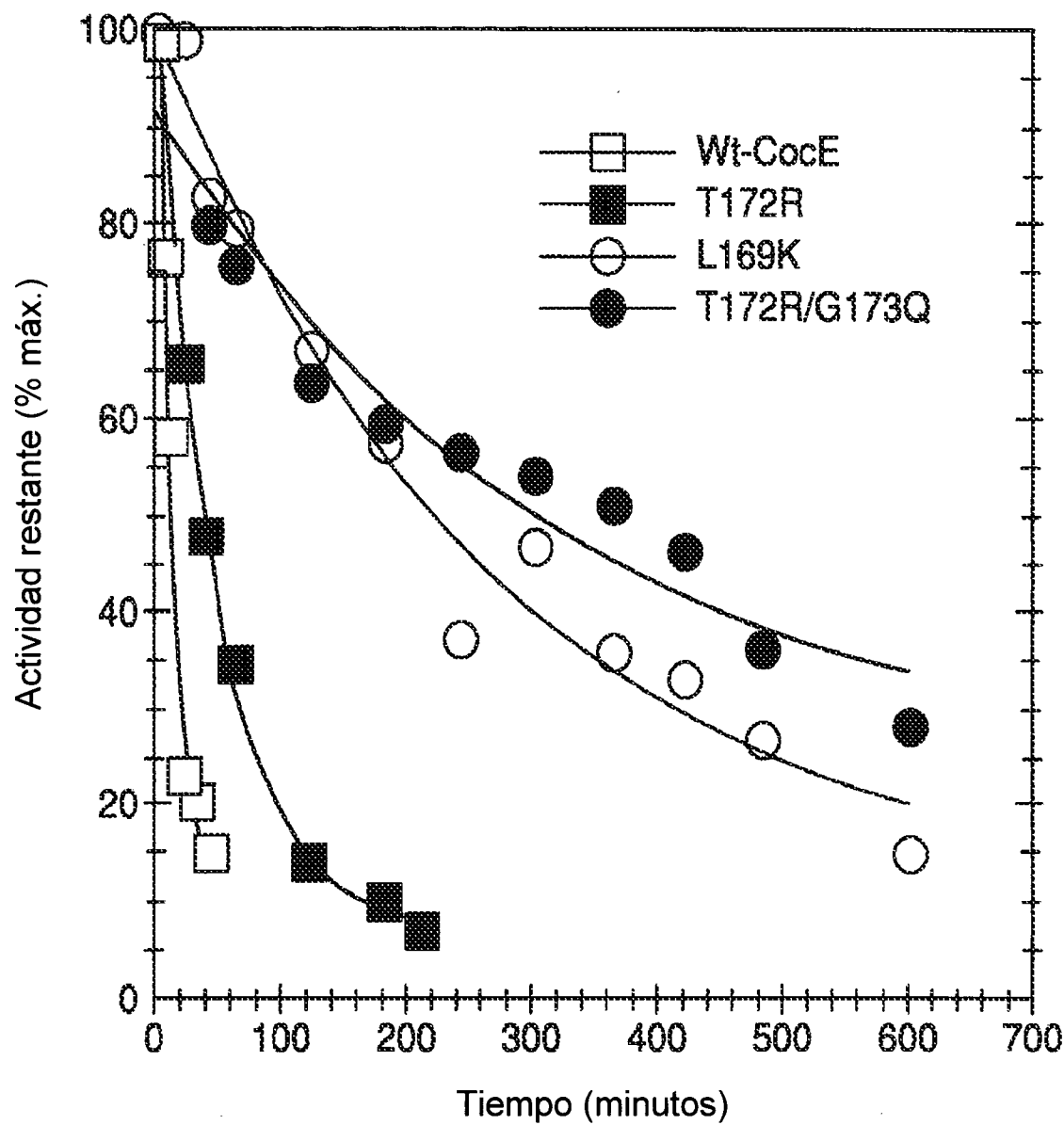


FIG. 23

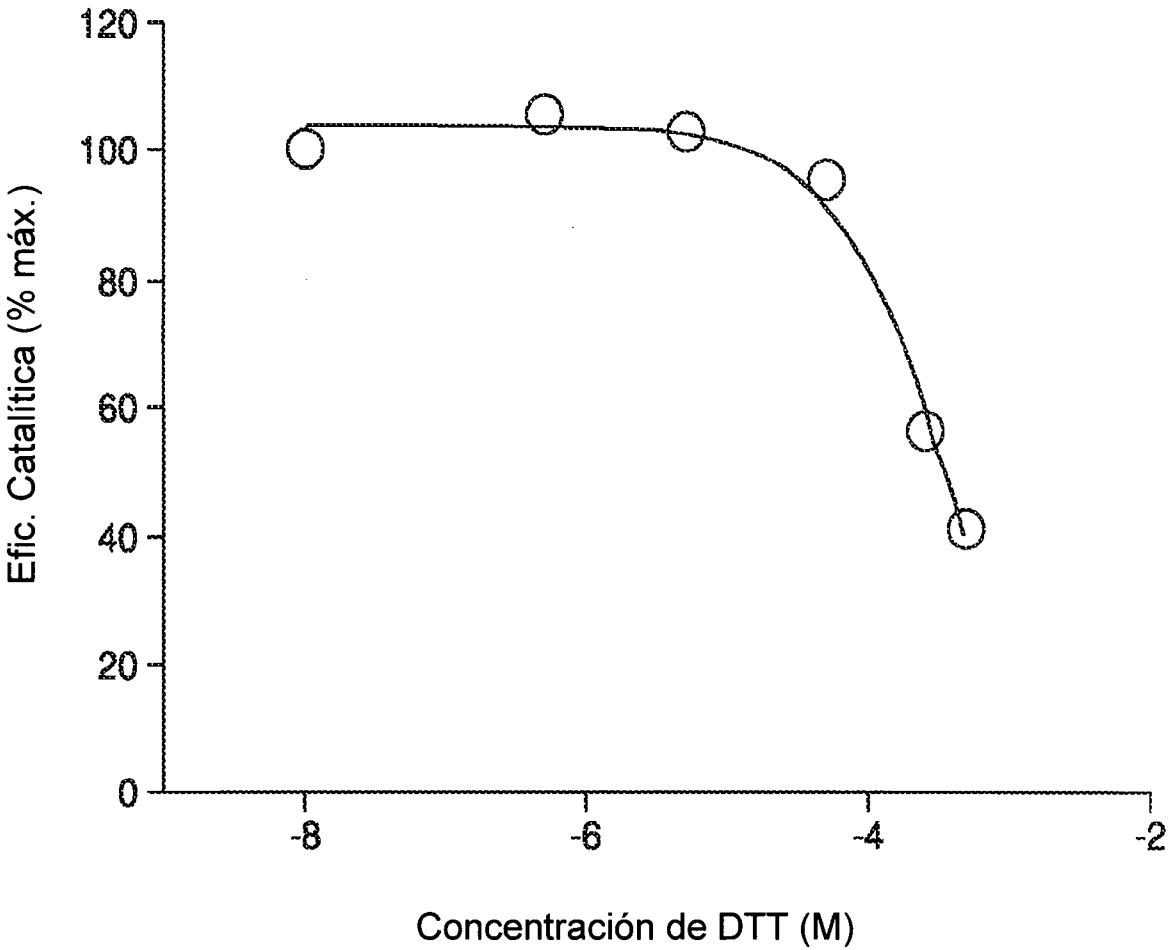


FIG. 24

By

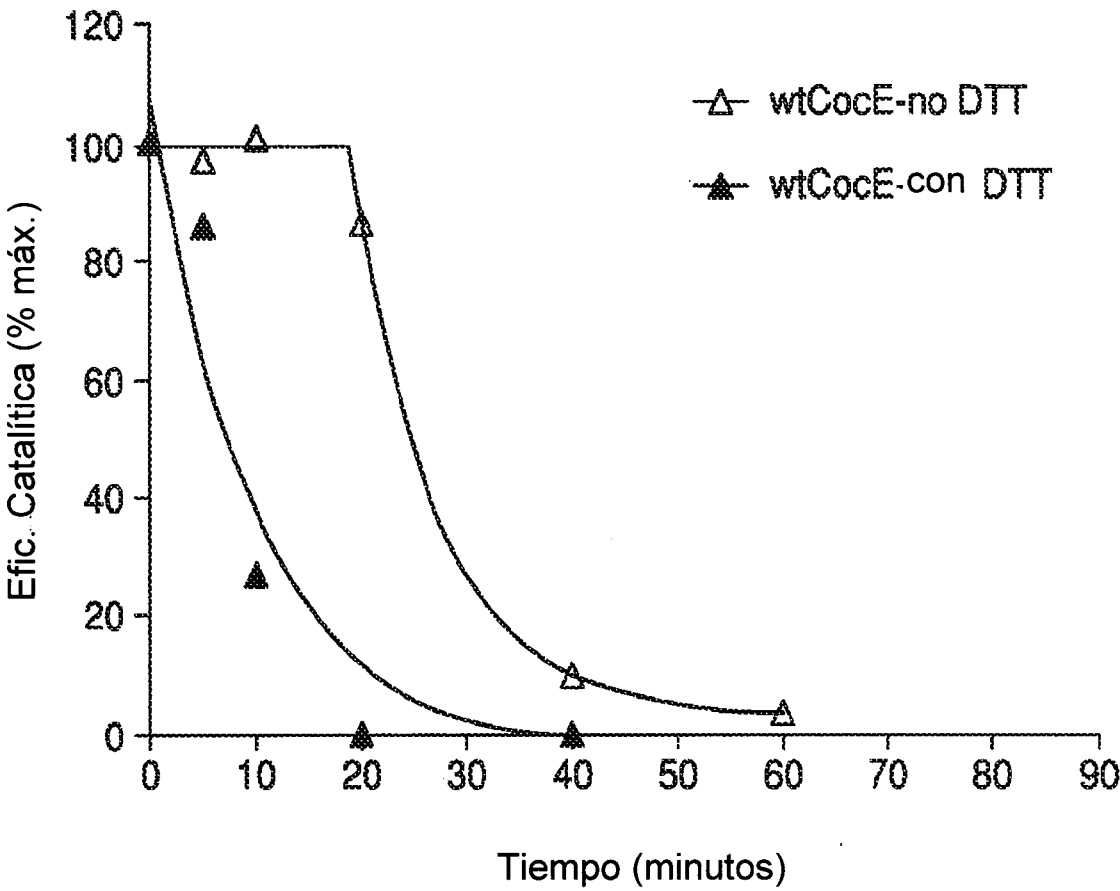


FIG. 25

135

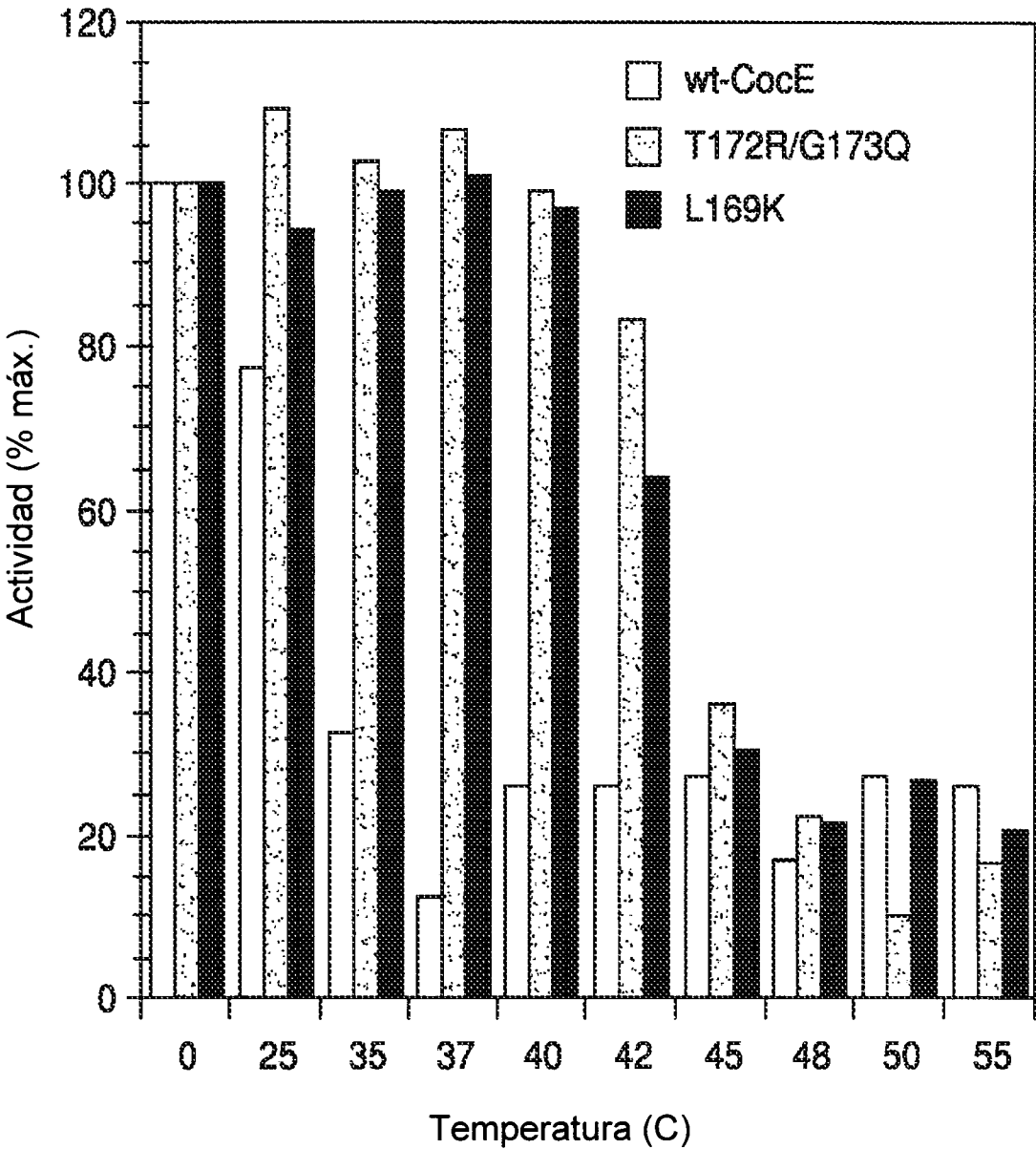


FIG. 26

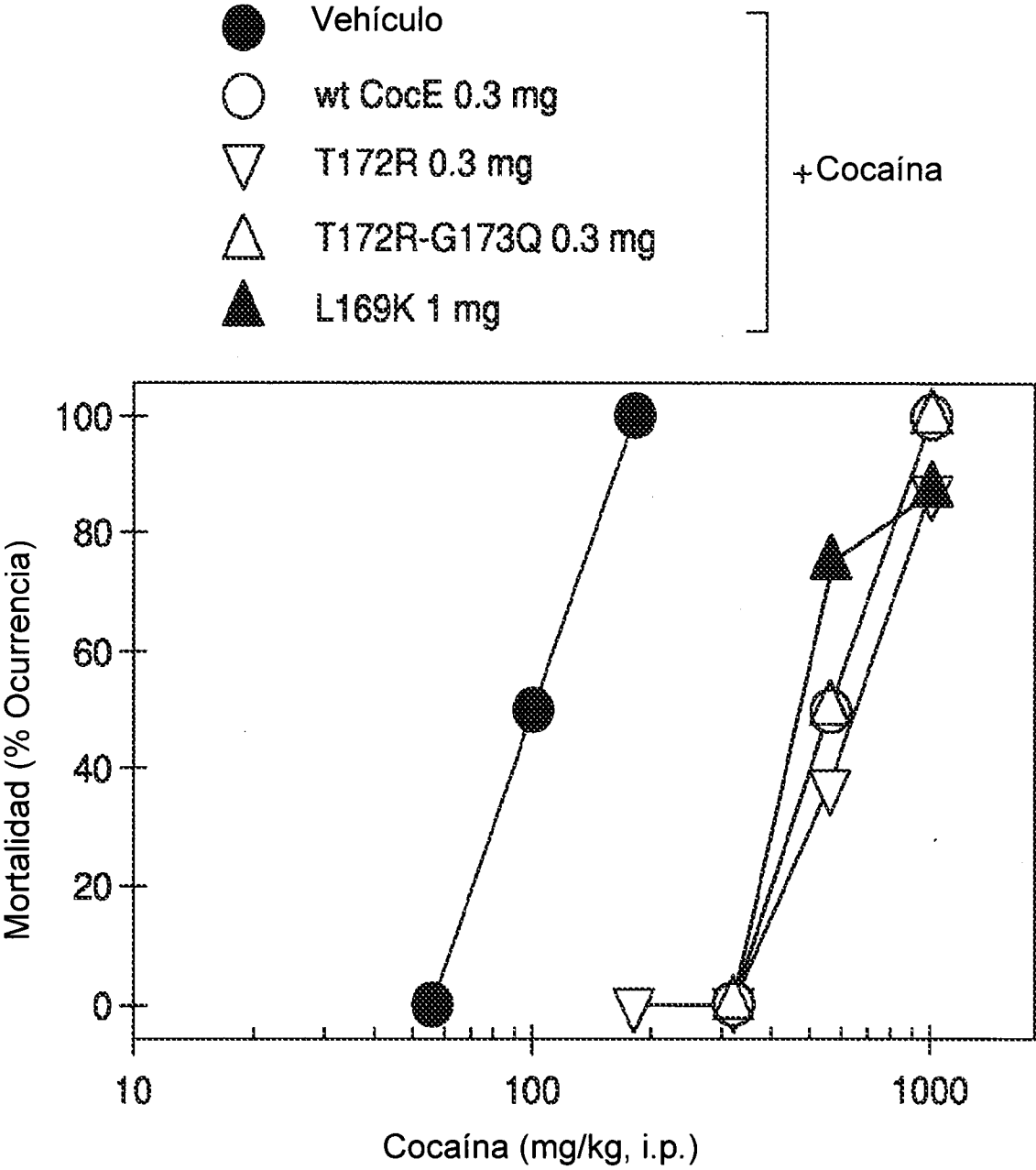


FIG. 27

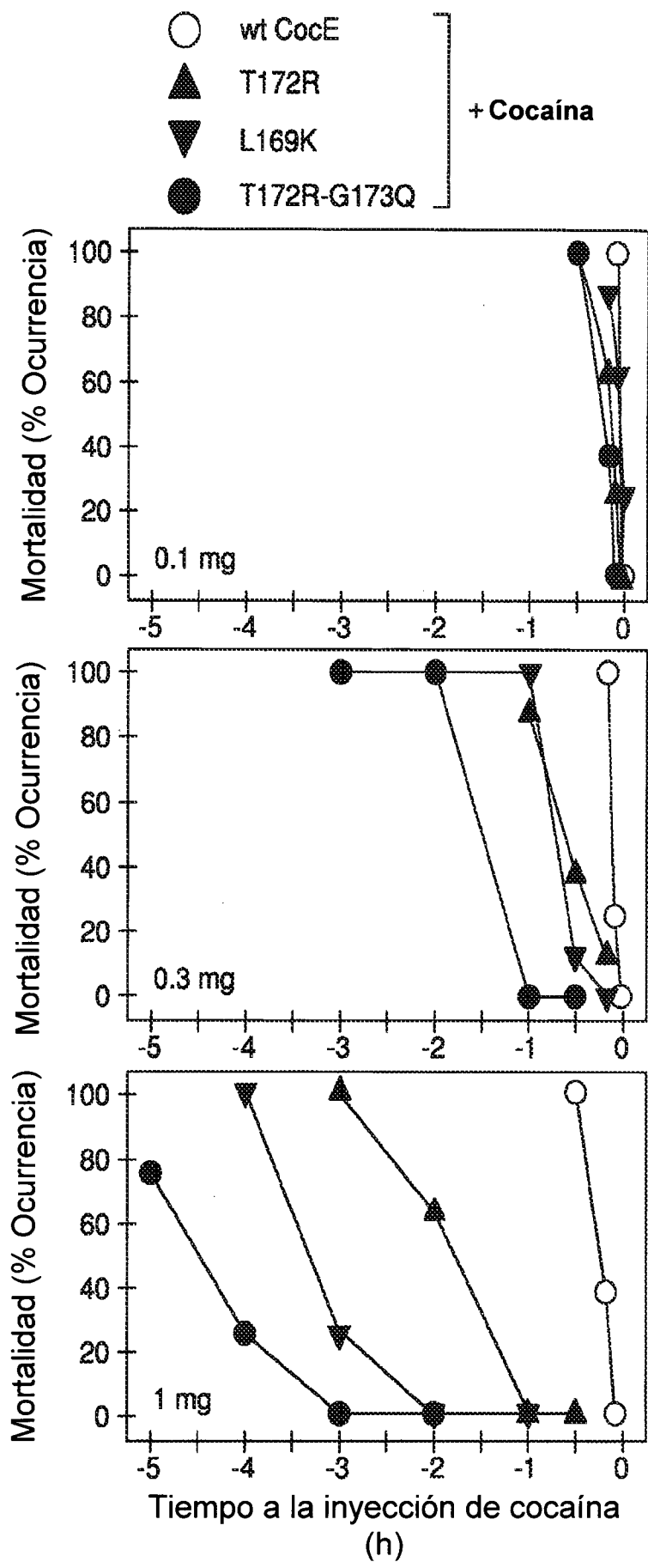


FIG. 28

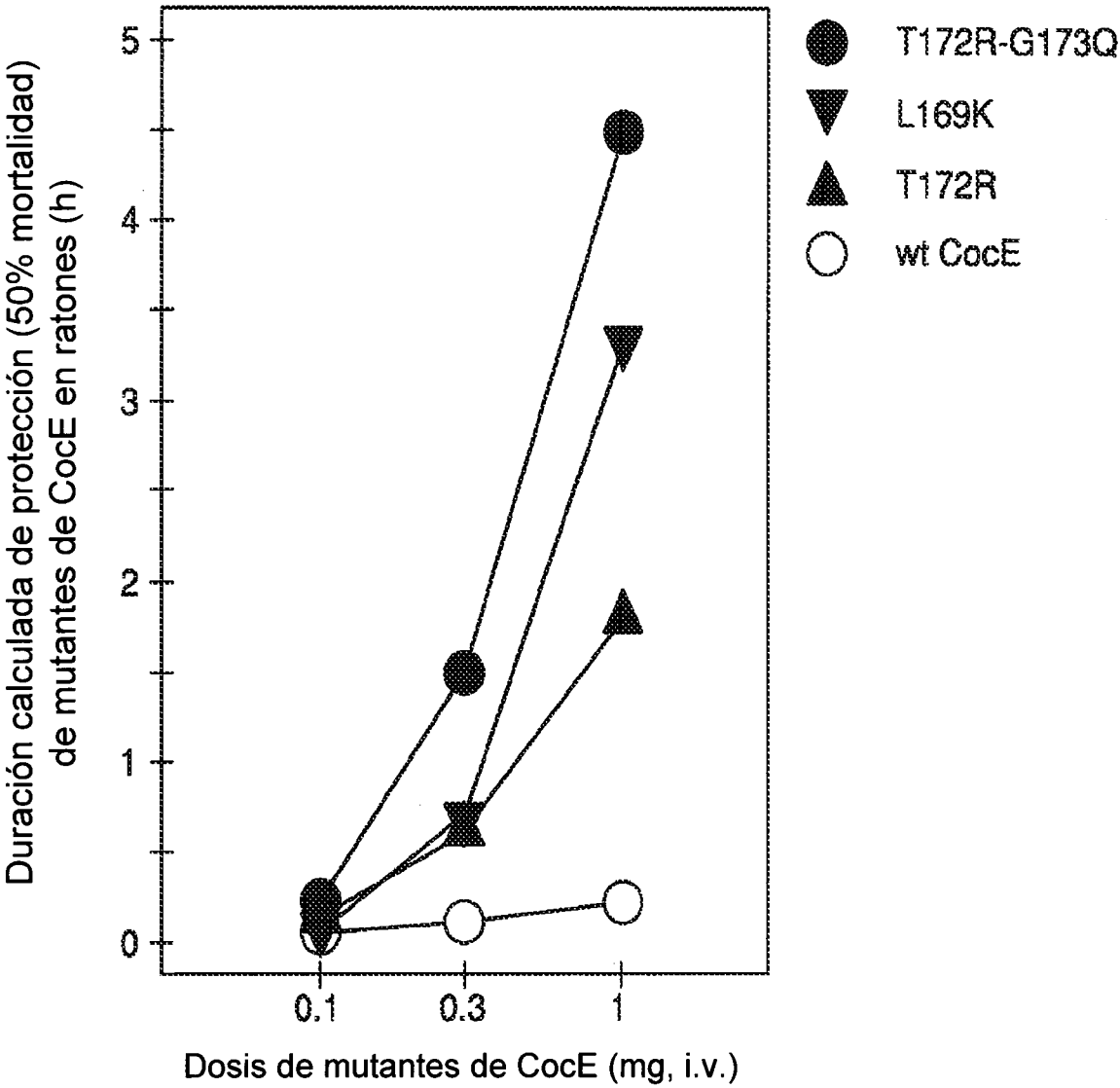


FIG. 29

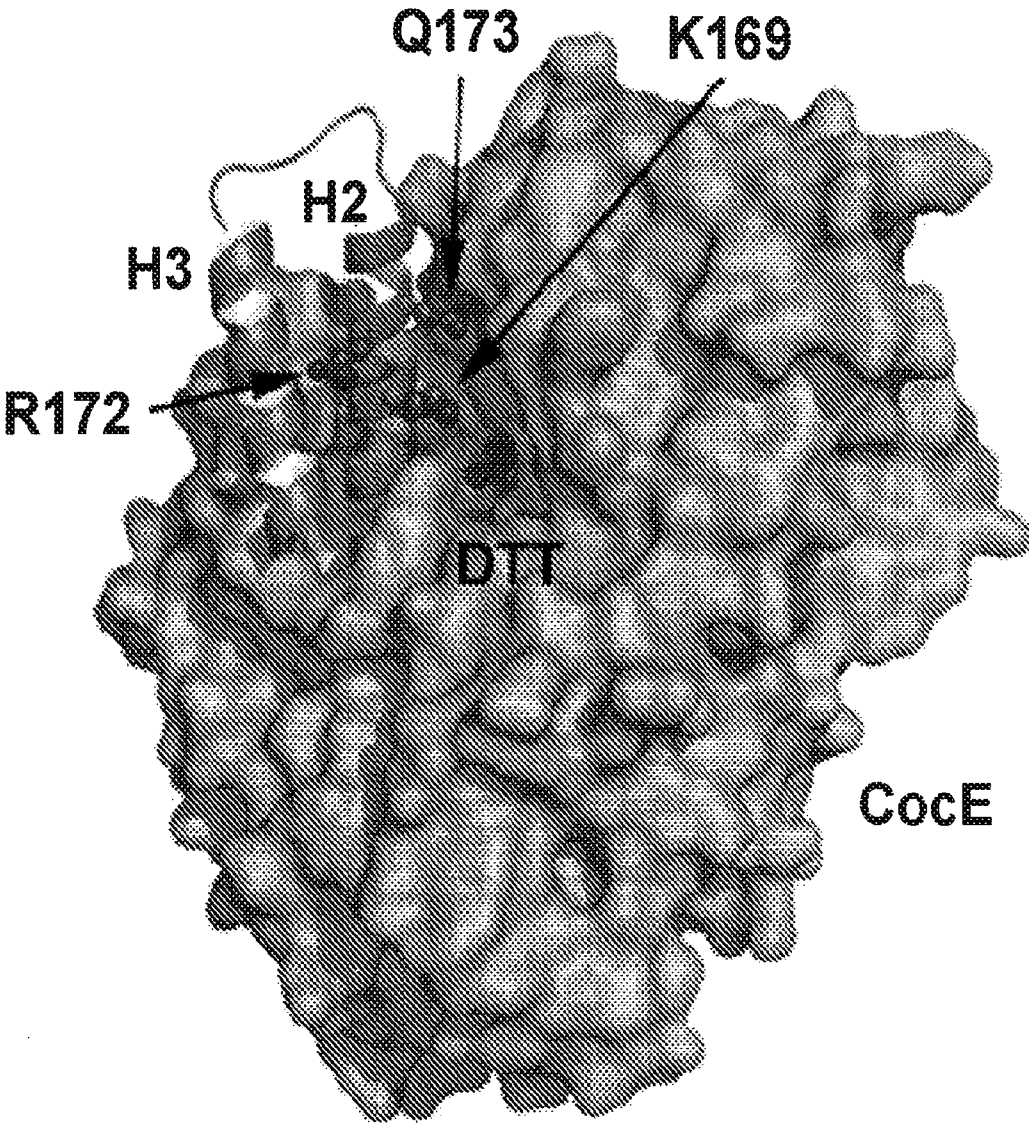


FIG. 30

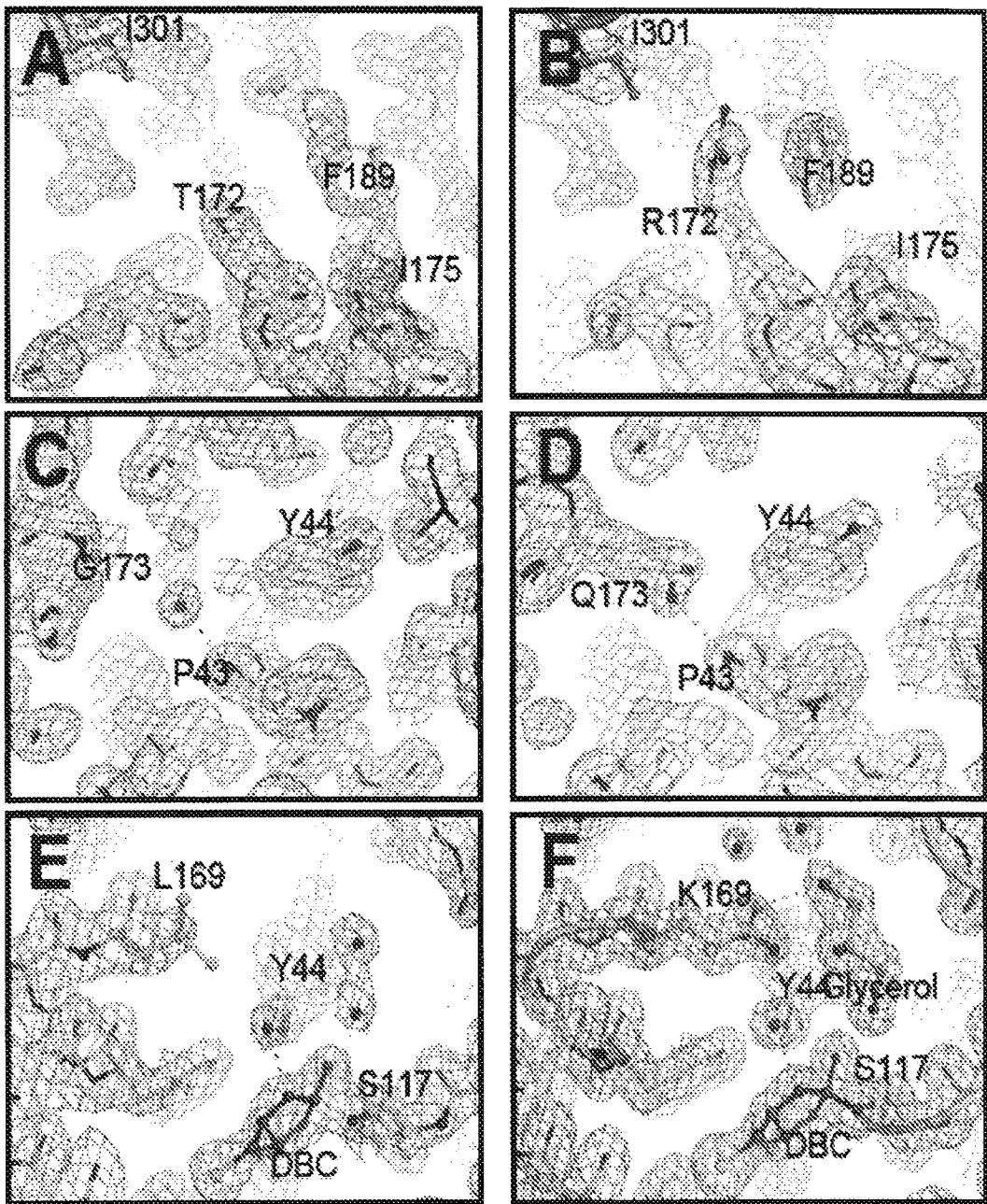


FIG. 31

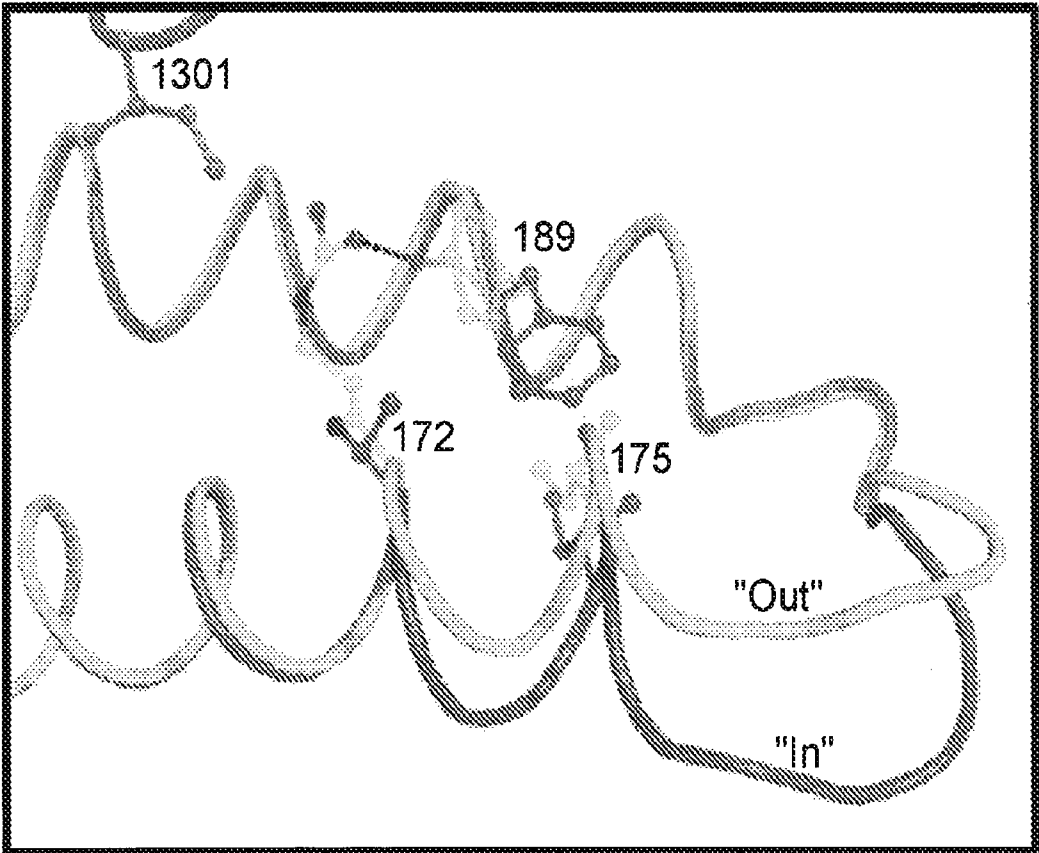


FIG. 32

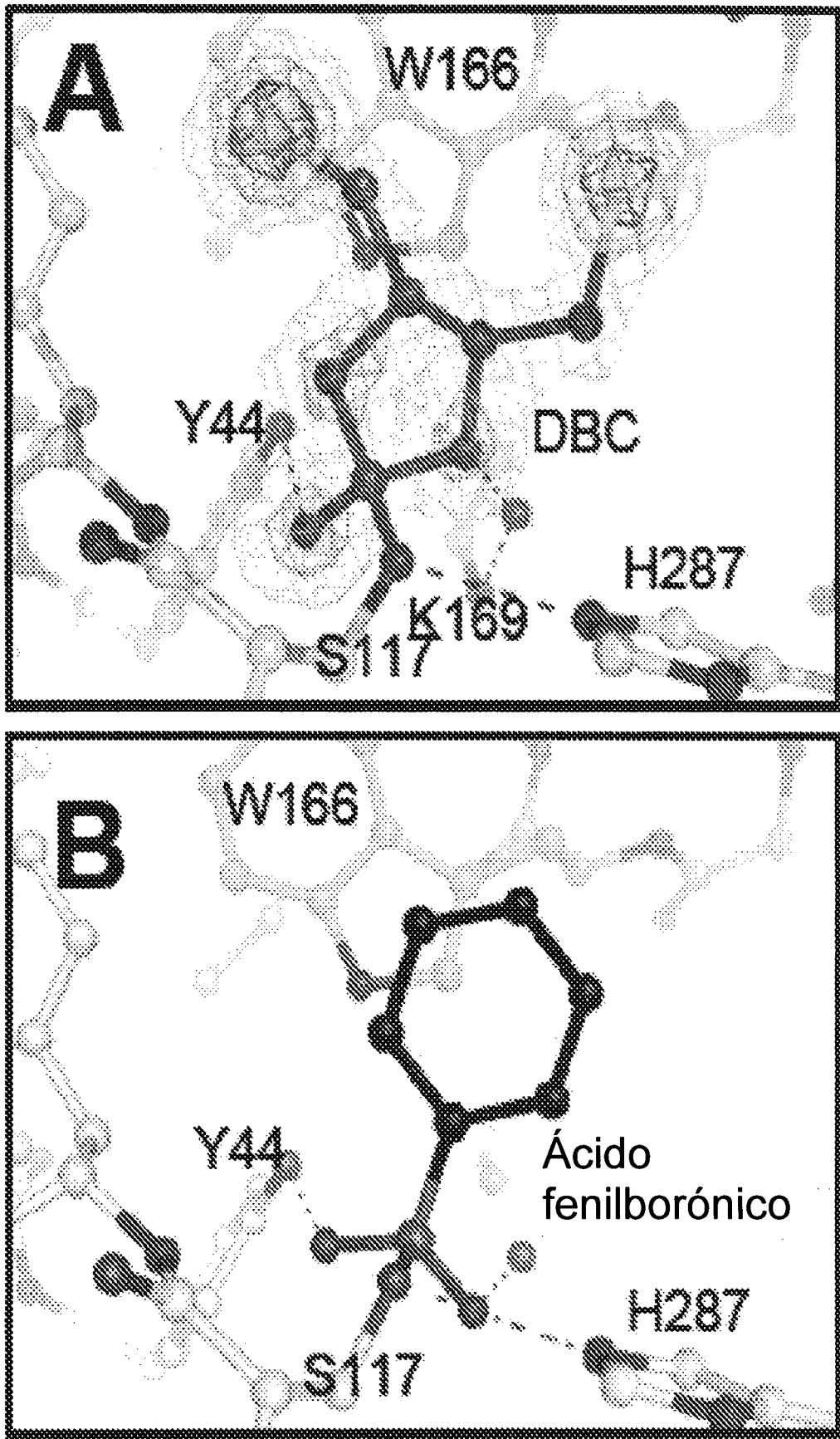
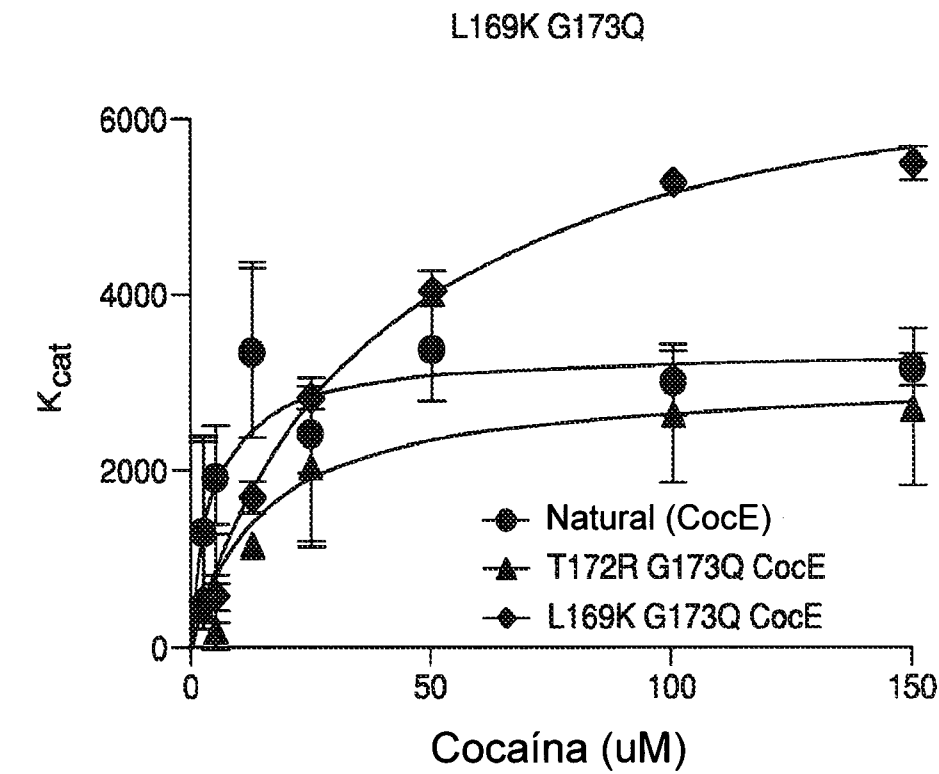


FIG. 33

143



Cocaina Esterasa	K _{cat} (min ⁻¹)	K _m (uM)	Eficiencia Catalítica K _{cat} (min ⁻¹)/K _m (M)
Natural	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

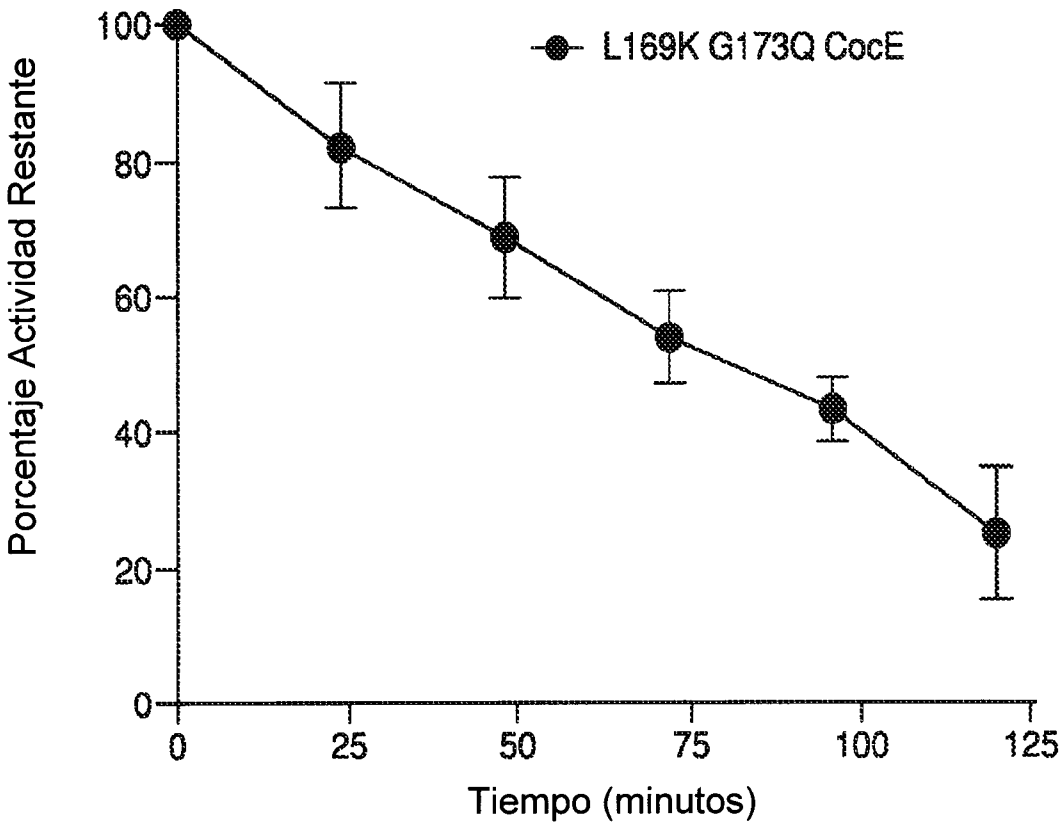
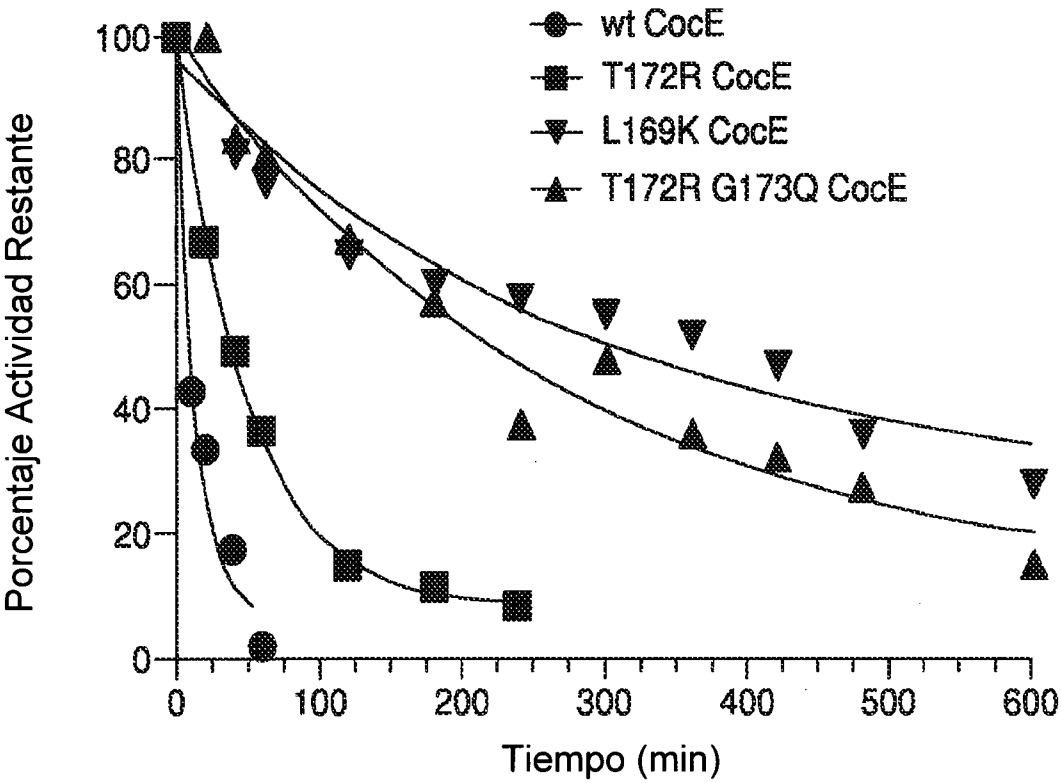


FIG. 35

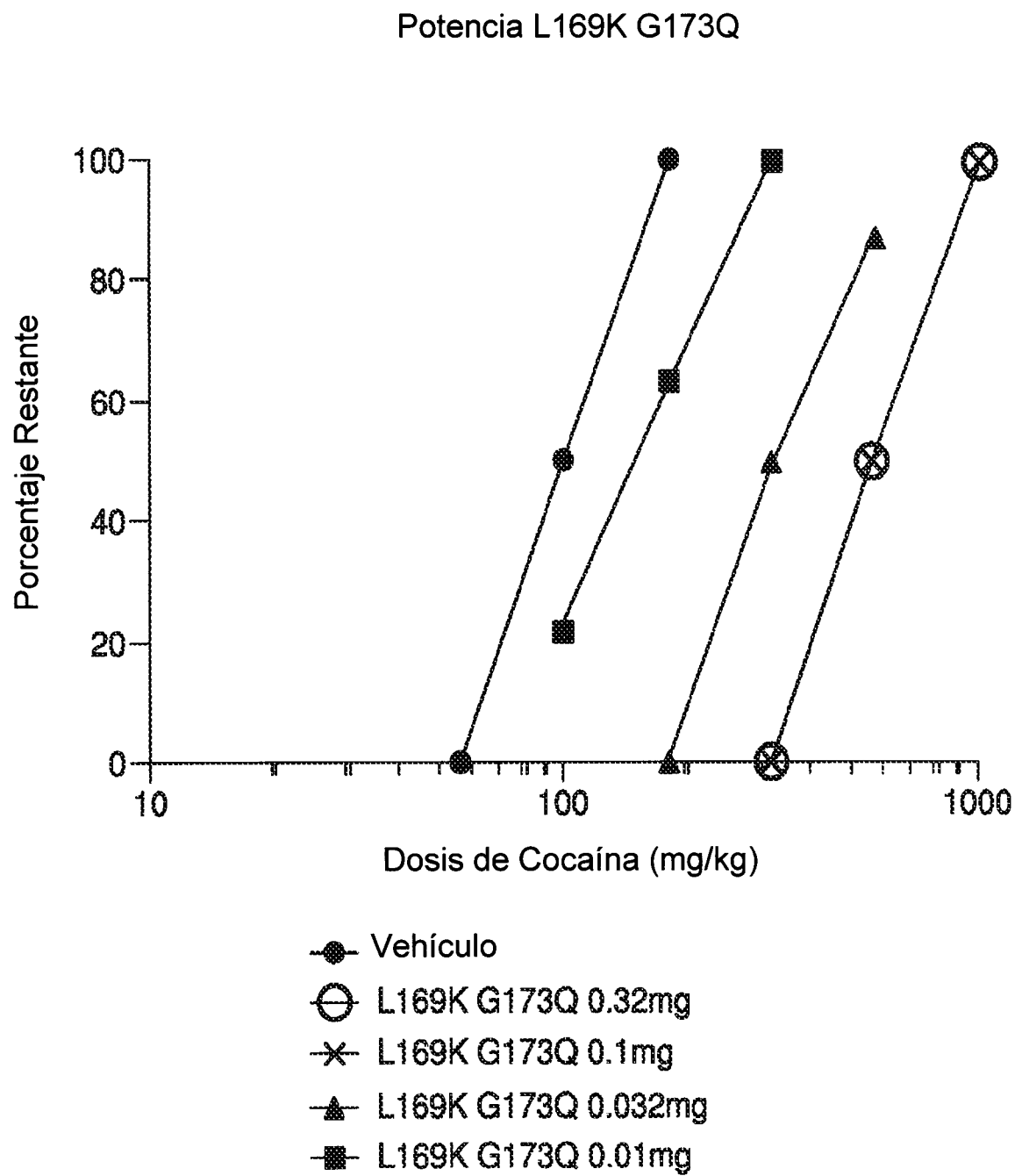


FIG. 36

FIG. 37A

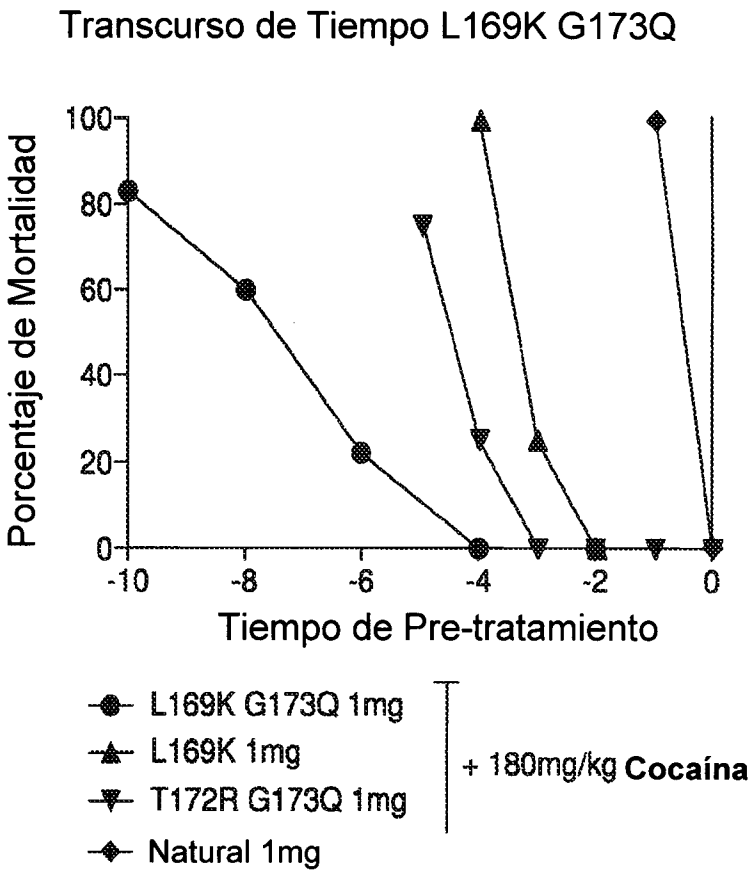
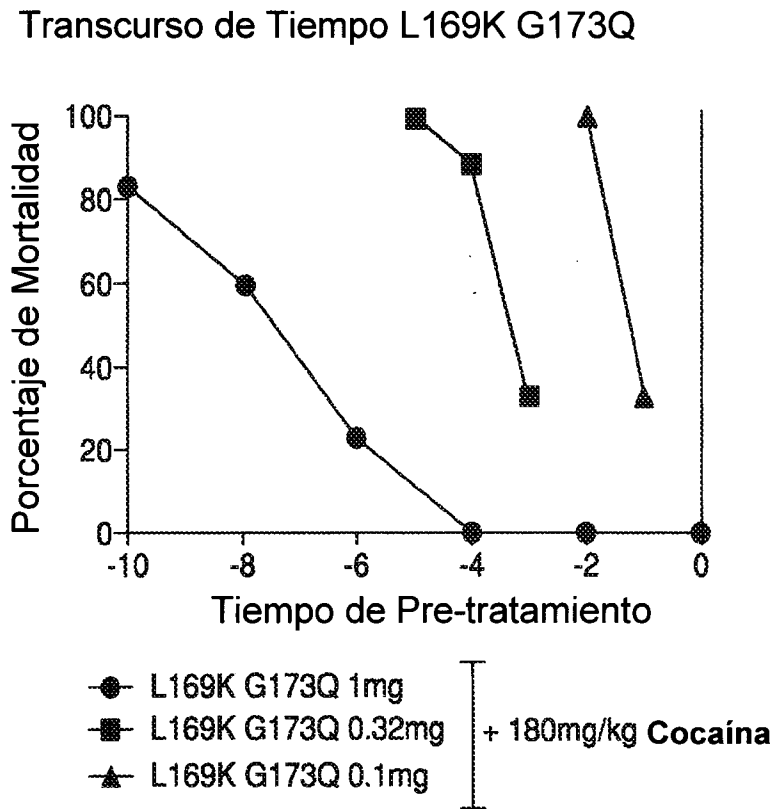


FIG. 37B



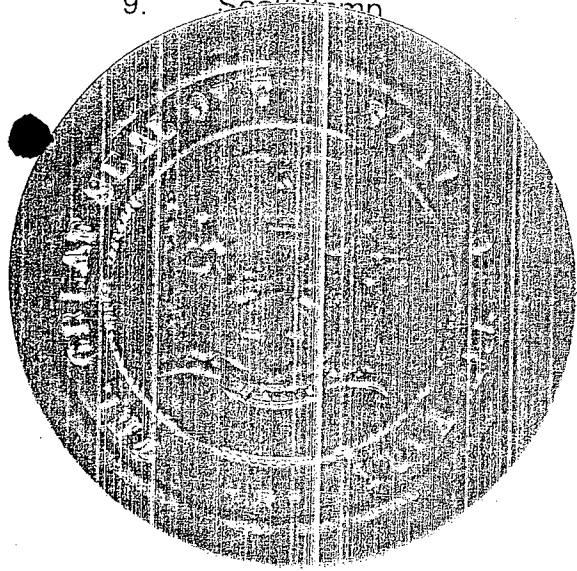
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

- 1. Country: **United States of America**
This public document
- 2. has been signed by **Norman Goodman**
- 3. acting in the capacity of **County Clerk**
- 4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

- 5. At New York, New York
- 6. the 14th day of July 2009
- 7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
- 8. No. NYC-10691669A
- 9. Seal/Stamp
- 10. Signature



James Bizzarri
James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State



TO BE USED IN Colombia

Brigard & Castro
BOGOTA - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros), The Trustees of Columbia University
in the City of New York

I (We), The Trustees of Columbia University in the
City of New York

domiciliado(s) en, 412 Low Memorial Library, 535 West
116th Street, Mc4308, New York, NY 10027, Estados
Unidos de América

domiciled in, 412 Low Memorial Library, 535 West 116th
Street, Mc4308, New York, NY 10027, United States of
America

Nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E.
TORRES CARDOZO, de Bogotá, Colombia, apoderados
verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente,
para recabar de las oficinas y autoridades colombianas
administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia
o recurso, la obtención de patentes de invención, registros
de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad,
depósitos de nombres comerciales, lemas comerciales y
enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre
los mismos, obtención de certificados de obtentor de
variedades vegetales, así como sus prórrogas,
renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de
nombre, domicilio y/o dirección; elaborar, tramitar y registrar
contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases;
intervenir como demandante o como demandado en
cualquier instancia y recurso ante cualquier juez,
corporación, funcionario público o autoridad en acciones
judiciales, administrativas y de policía tales como:
oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad,
cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones
derivadas de la obtención o explotación de licencias;
acciones de competencia desleal; demandas penales;
acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y
observaciones a solicitudes de patentes, diseños
industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas
cautelares y en otras acciones o medidas similares.

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN
E. TORRES CARDOZO, of Bogotá, Colombia, my (our)
true and lawful attorneys with special, ample and sufficient
power to obtain from the Colombian administrative, judicial
and police offices and authorities, in any instance, privileges
of patents of invention, registration of trademarks, industrial
designs and utility models; registration of commercial
names, slogans and emblems, registration of copyright and
contracts related thereto, certificates of obtainers of
vegetables varieties, as well as extensions, renewals and
recordal of assignments and changes of name, domicile
and/or address related to the above; to prepare, prosecute
and register licenses of any kind; to act as plaintiff or
defendant in any instance or recourse, and before any
judge, corporation, public official or authority in judicial,
administrative and police actions, such as: oppositions to
the registration of trademarks; caducity, cancellation and
nullity actions; claim actions derived from the obtaining or
exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal
proceedings, actions for payment of damages; claims or
observations on patent applications, models, industrial
designs and utility models; in the exercise of preventive
measures and in other actions or similar proceedings.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes,
formular descripciones, enmiendas, protestas,
declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades,
apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y
gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a
derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda
clase de documentos y valores, dando el descargo
respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades
todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas
las medidas que creyeran conducentes al resguardo de mis
(nuestros intereses), con todas las demás facultades legales
necesarias.

To that effect they hereby empowered to file applications,
formulate descriptions, amendments, protests, declarations,
oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to
pay taxes, quotas and assessments prescribed by law,
renounce or waive the rights granted or in the process of
granting; to receive all kinds of documents and valuables,
giving the respective release of receipt, and, in general, to
take before said authorities the necessary steps to such
effect, and any measures that they may deem pertinent to
the safeguard of my (our) interest(s) with all the other
necessary legal powers.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en
mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de
desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o
en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos)
a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H.
PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO,
domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 71-21, Torre B, Piso 4,
mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades
para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o
extrajudiciales.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist,
settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute
this power in whole or in part and to revoke substitutions. At
the same time I (We) hereby appoint JUAN PABLO
CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO
EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO,
domiciled in Carrera 7 No. 71-21, Torre B, Piso 4, my (our)
attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and
to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Otorgado y firmado en
hoy de de 200_
Firma
Nombre
Cargo

Granted and signed in New York, NY USA
this 16th of April 2009
Signature
Name
Title
Jeffrey M. Sears, Ph.D.
Associate General Counsel
Columbia University

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
dejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
22 JUL. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

NEW YORK
COUNTY

719140 Form 1

State of New York
County of New York

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal,
DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

Craig Zaly

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

JUL 14 2009

FEE PAID \$3.00

Norman Goodman
County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

~~En la ... Cuarenta de este Circuito se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
22 JUL. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Arate~~

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí de
a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él (ella) es

On this 16 day of April of 2009 personally appeared before me
Sebastian Paura
to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the

de, The Trustees of Columbia University in the City of New York

of, The Trustees of Columbia University in the City of New York

Sociedad legalmente constituida para un periodo de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a las pruebas de la existencia de la sociedad.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

Estado de
con fecha

State of New York
under date of April 16, 2009

y que quien confiere el presente poder es su representante.

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

Notario Público (sello)

CRAIG ZRALY
Notary Public State of New York
No. 01ZR6038118
Qualified in New York County
Commission Expires March 6, 2010

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

Hoy de de , compareció(eron) ante mí

On this day of personally appeared before me

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

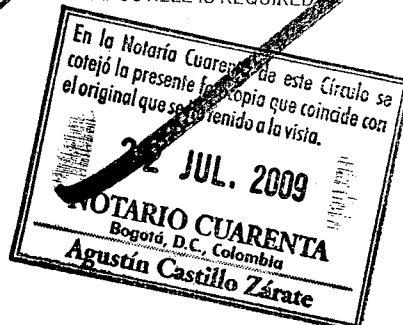
who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Notario Público (sello)

Notary Public (Seal)

LEGALIZACIÓN POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED



TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE PODER OTORGADO
POR **THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW
YORK**, con domicilio en 412 Low Memorial Library, 535 West 116th Street,
Mc 4308, New York, NY 10027, Estados Unidos de América.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

- 1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
- 2. ha sido firmado por NORMAN GOODMAN
- 3. actuando en capacidad de SECRETARIO DEL CONDADO
- 4. lleva el sello/timbre de EL CONDADO DE NEW YORK

CERTIFICADO

- 5. en New York, New York
- 6. a los 14 días del mes de julio de 2009
- 7. por el Secretario Especial Delegado del Estado, Estado de New York
- 8. No. NYC-10691669A
- 9. Sello/timbre

10. Firma

(firma)

James Bizzarri

Secretario Especial Delegado del Estado

Lleva un sello que dice:
EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE NEW YORK

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:

CRAIG ZRALY
Notario Público, Estado de New York
No. 01ZR6038118
Titulado en el Condado de New York
Mi comisión vence el 6 de marzo de 2010

No. 719140

Estado de New York
Condado de New York

Yo, NORMAN GOODMAN, Secretario del Condado y Secretario de la Suprema Corte del Estado de New York, en y para el Condado de New York, un Tribunal de Registro teniendo por ley un sello,

POR LA PRESENTE CERTIFICO que, de conformidad con la Ley Ejecutiva del Estado de New York,

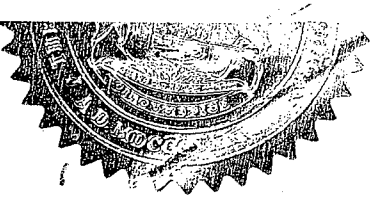
CRAIG ZRALY

cuyo nombre se suscribe a la declaración juramentada, declaración extrajuicio, certificado de reconocimiento o prueba anexa, era un NOTARIO PÚBLICO al momento de tomar el mismo en y para el Estado de New York debidamente comisionado, había tomado juramento y estaba titulado para actuar como tal; que de conformidad con la ley, se ha presentado en mi oficina una comisión o un certificado de su carácter oficial con su firma; que al momento de tomar dicha prueba, reconocimiento o juramento, él fue debidamente autorizado para tomar el mismo; que conozco bien la letra de dicho NOTARIO PÚBLICO o he comparado la firma sobre el instrumento anexo con su firma autografiada depositada en mi oficina y creo que dicha firma es genuina.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he puesto en el presente mi firma y sello oficial este,

14 de julio de 2009

(firma)
Secretario del Condado y Secretario de la Suprema Corte, Condado de New York.



PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros), THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

I (We), THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

domiciliado(s) en 1214 S. University Avenue, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América.

domiciled 1214 S. University Avenue, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48104, United States of America.

Nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, lemas comerciales, nombres comerciales, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio y/o dirección; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names, slogans and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name, domicile and address related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO, domiciliado(s) en la 7 No. 71-21, Torre B, Piso 4, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby, appoint JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO, domiciled in Carrera 7 No. 71-21, Torre B, Piso 4, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Otorgado y firmado en

Granted and signed

hoy de de 200_

this 2nd day of July 2009

Firma

Signature

Nombre

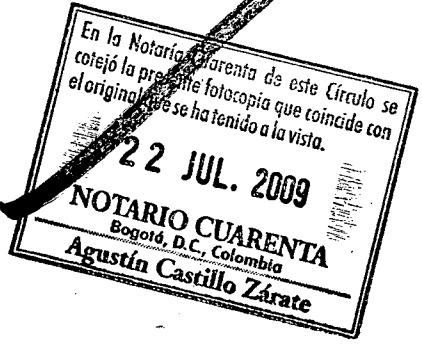
Name

Cargo

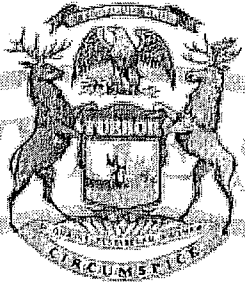
Title

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED
Director of Licensing
UM Technology Transfer



State of Michigan



DEPARTMENT OF STATE APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: **UNITED STATES OF AMERICA**

This public document

2. has been signed by:

SALLY A INGALLS

3. acting in capacity of:

Michigan Notary Public

4. bears the seal of:

SALLY A INGALLS

WASHTENAW County, Michigan

CERTIFIED:

5. at Lansing, Michigan

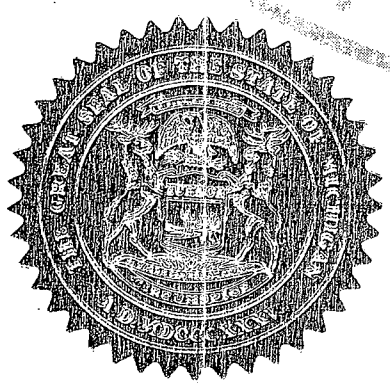
6. the 10th of July, 2009

7. by Secretary of State, State of Michigan

8. NO. 47815-1-149649-OGS

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Terri Lynn Land
Terri Lynn Land

This certification attests only to the authenticity of the signature of the official who signed the affixed document, the capacity in which that official acted, and where appropriate, the identity of the seal or stamp which the document bears. This certification is not intended to imply that the contents of the document are correct, nor that they have the approval of the State of Michigan.



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de personalmente compareció ante mí

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él (ella) es

de THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

Sociedad legalmente constituida para un periodo de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad.

Estado de con fecha

y que quien confiere el presente poder es su representante.

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL PERSONA NATURAL

Hoy de de , compareció(eron) ante mí

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 2nd day of July of 2009 personally appeared before me

Ruth L. Rasor
to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the

Director of Licensing
of THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney: that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of Michigan Constitution Art. 8 Sect. 5
under date of Jan. 1963

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

Sally A. Ingalls
Public Notary (Seal) July 2, 2009

SALLY A. INGALLS
NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
COUNTY NOTARIAL CERTIFICATE
My Commission expires 05 January 2015
Acting in the County of

On this day of personally appeared before me

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public (Seal)

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED



TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE PODER OTORGADO
POR THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN – THE
UNIVERSITY OF MICHIGAN, con domicilio en 1214 S. University Avenue,
2nd Floor Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América.

ESTADO DE MICHIGAN
DEPARTAMENTO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por SALLY A. INGALLS
3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO DE MICHIGAN
4. lleva el sello/timbre de SALLY A. INGALLS, CONDADO DE
WASHTENAW, MICHIGAN

CERTIFICADO

5. en Lansing, Michigan
6. a los 10 días del mes de julio de 2009
7. por el Secretario de Estado, Estado de Michigan
8. No. 47815-1-149649-OGS
9. Sello/timbre
10. Firma

(firma)

Terri Lynn Land

Esta certificación acredita únicamente la autenticidad de la firma del funcionario quien firma el documento adjunto, la capacidad en la cual actúa y, donde corresponda, la identidad del sello o estampilla que lleva el documento. Esta certificación no supone que el contenido del documento sea correcto o que tenga la aprobación del Estado de Michigan.

Lleva un sello que dice:
EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE MICHIGAN



No. 10-002809- -00000-0000

Fecha: 2010-01-13 16:23:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 157



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá,
2020

159

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

REFERENCIA	Radicación No.	10 2809
	Solicitud internacional	PCT/US2008/069659
	Fecha inicio fase nacional	10/02/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>04764</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

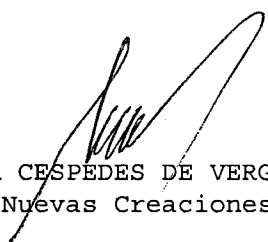
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...



Radicación No.:10 2809

160


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____
adpall 09 ABR. 2010