



No. 09-010531- -00009-0000

Fecha: 2012-12-20 15:44:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 236

As. 109.391

Señor

DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

D.

REF: Expediente No. **09-10531-** solicitud de patente de invención a favor de **COLUMBIA UNIVERSITY** Título **COMPOSICIONES ANTI-COCAINA Y TRATAMIENTO**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al oficio número 13982 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 14 de Agosto de 2012.

Con el ánimo de subsanar las objeciones planteadas por el señor Examinador, nos permitimos presentar un nuevo pliego reivindicatorio compuesto por veinticuatro (24) reivindicaciones, en donde no se amplía en ningún momento la materia inicialmente divulgada, y se encuentra enteramente sustentado en la descripción. De esta manera, las reivindicaciones 21 y 22 han sido eliminadas en el nuevo pliego reivindicatorio con el fin de superar la objeción de excepción a la patentabilidad impuesta por su Despacho.

Adicionalmente, estamos procediendo con la presentación de una solicitud divisional para estudio de su Despacho.

Claridad

La nueva reivindicación 1 ha sido modificada de tal manera que se aclara que revela un polipéptido de cocaína esterasa (CocE) mutante aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que presenta por lo menos una sustitución, adición o delección en donde dicha sustitución, adición o delección se selecciona del grupo que consiste de L163V; V225I; I218L; A310D; A149S; S159A; S265A; S56G; W220A; S140A;

22
V

F189L; A193D; T254R; N42V; V262L; L508G; Y152H; V160A; T172R; Y532F; T74S; W285T; L146P; D533S; A194R; G173Q; C477T; K531A; R41I; L119A; K46A; F84Y; T172R-G173Q; L169K; F189A; N197K; R182K; F189K; V190K; Q191K; A194K; I175-G-G-A186; y T176-G-G-D185; y el polipéptido mutante CocE tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C comparado con el CocE de tipo silvestre que presenta una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

Así las cosas, el sustento para la inclusión de la materia relacionado con sustituciones, adiciones o deleciones en dicha reivindicación se encuentra tanto en la reivindicación 5, como en la tabla 7 y el ejemplo 17 de la descripción, en donde se establece una asociación entre dichas sustituciones, adiciones o deleciones con la termoestabilidad del péptido reivindicado.

En este orden de ideas, consideramos que la afirmación del señor Examinador referente a que la descripción no se constituye como un sustento para la presente invención no es cierta. Lo anterior debido a que como es bien expresado en la presente solicitud, la invención reivindicada brinda mutantes termoestables del polipéptido CocE, en donde se establece claramente que los polipéptidos mutantes termoestables fueron diseñados y generados mediante el incremento de la estabilidad termodinámica a través de la disminución del ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado) del polipéptido CocE, o disminución de la tasa de desdoblamiento a través del incremento de la energía libre de activación del proceso de desdoblamiento de CocE, lo cual se encuentra debidamente expuesto en el párrafo [0076] de la siguiente manera,

"Pueden diseñarse mutaciones termoestabilizadoras de CocE o bien para aumentar la estabilidad termodinámica de un polipéptido disminuyendo la ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado) o disminuir la tasa de desdoblamiento incrementando la energía libre de activación del proceso de desdoblamiento. La ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado) es la diferencia de energía libre entre el estado desdoblado y el estado plegado. Para un polipéptido termodinámicamente estable, ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado) debe ser un valor negativo. Generalmente, entre menor sea el valor ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado), más estable es el estado plegado. Tal energía libre de activación del proceso de desdoblamiento es la diferencia de energía libre entre el estado plegado y el estado de transición del desdoblamiento (Steipe, 1999)."

3
2/2/2

Por otra parte, el ejemplo 3 de la descripción enseña la metodología de simulaciones de dinámica molecular empleada para el desarrollo del CocE mutante termoestable, en donde se incluye el procedimiento y los resultados obtenidos mediante la aplicación del mismo, lo cual se resume en la tabla 2.

Así, los mutantes CocE fueron diseñados mediante una estrategia de enfoque triple, tal como lo establece la descripción,

*"Polipéptidos CocE mutantes con termoestabilidad incrementada pueden diseñarse y generarse por una variedad de métodos conocidos en el arte, incluidos, por ejemplo, diseño racional, evolución dirigida (por ejemplo, mutagénesis aleatoria, mutagénesis del organismo hospedero de CocE), o una combinación de las mismas. La evolución dirigida puede lograrse mediante mutación y recombinación, seguidas por detección sistemática del rasgo deseado o aplicando una presión selectiva para obtener el rasgo de interés (véase a este respecto, Lehmann and Wyss, 2001). La mutagénesis puede llevarse a cabo en el gen específico de interés o mediante mutagénesis y selección de un organismo hospedero, de modo que la propiedad obtenida por técnicas de ingeniería se confiere a la proteína de interés. Preferiblemente, la termoestabilidad de los mutantes CocE se manipula por técnicas de ingeniería mediante una estrategia de enfoque triple ("**through a three-prong approach**") de (i) diseño racional mediante mutagénesis dirigida al sitio, asistida por computador (véase a este respecto, Ejemplo 3; Ejemplo 4), (ii) mutagénesis aleatorio del gen CocE y detección selectiva de gran productividad (véase a este respecto, Ejemplo 4; Ejemplo 15); y (iii) mutagénesis del organismo hospedero de CocE, seguida por selección genética (véase a este respecto, Ejemplo 14)."*

Por tanto, el señor Examinador puede notar que la descripción incluye todo el sustento requerido por el normalmente versado en la materia para la reproducción de la invención reivindicada, contrario a lo establecido en el Oficio Técnico.

Ahora bien, en lo referente a la caracterización de la presente invención mediante la estructura del polipéptido mutante CocE el señor Examinador puede notar que a partir de la modificación de la reivindicación 1, dicho polipéptido se encuentra debidamente caracterizado por su estructura, al definirse la secuencia de aminoácidos correspondiente junto con las sustituciones, adiciones o deleciones que presenta, de acuerdo con el sustento dado por la descripción.

Adicionalmente, la nueva reivindicación 1 brinda una caracterización técnica funcional del polipéptido de la presente invención, estableciendo que el mismo tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C en comparación con el CocE de tipo silvestre, lo cual se constituye como la ventaja de la presente invención, y por tanto hace parte de las características esenciales de la misma.

Así bien, el nuevo pliego reivindicatorio brinda la caracterización estructural específica requerida por el señor Examinador, por lo que damos por superadas las objeciones al respecto.

Por otra parte, frente a la objeción del señor Examinador en referencia a la falta de información sobre la actividad y termoestabilidad de las sustituciones, deleciones y adiciones sobre la secuencia de aminoácidos, reiteramos que la nueva reivindicación 1 contiene las modificaciones en mención que se encuentran expuestas en la descripción, y por tanto la objeción impuesta pierde toda validez.

En lo que se refiere al ácido nucleico reclamado por el pliego reivindicatorio nos permitimos mostrar nuestro total desacuerdo frente a la apreciación del señor Examinador mediante la cual establece que el normalmente versado en la materia no se encuentra en capacidad de establecer la estructura de la molécula, al tener en cuenta que el pliego reivindicatorio y la descripción de la presente solicitud brindan el sustento requerido para la realización y el uso de un ácido nucleico que codifique el polipéptido CocE mutante de las reivindicaciones 1-6, o que presente por lo menos un 85% de identidad de la secuencia SEQ NO:2.

Por ejemplo, la descripción establece, entre otra información, lo siguiente,

"Moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión CocE mutantes se encuentran igualmente dentro de la invención. Tales ácidos nucleicos pueden elaborarse preparando un constructo (por ejemplo, un vector de expresión) que exprese la proteína de fusión CocE mutante cuando se introduzca en un hospedero apropiado. Por ejemplo, tal a constructo puede hacerse ligando un primer polinucleótido que codifica la proteína CocE mutante fusionada sin alteración en el marco de lectura ("in frame") con un segundo polinucleótido que codifica otra proteína de tal modo que la expresión del constructo en un sistema de expresión adecuado produzca una proteína de fusión."

924

Por tanto, aclaramos al señor Examinador que al tener en consideración todo el sustento dado por la descripción, la materia revelada por las reivindicaciones no puede considerarse amplia, ya que un normalmente versado en la materia entiende cómo generar una secuencia de aminoácidos, que codifique un polipéptido mutante CocE mutante termoestables, sin requerir de la aplicación de una excesiva experimentación.

En lo que se refiere a la composición farmacéutica reivindicada, al tener en cuenta que el polipéptido de la reivindicación 1 fue debidamente caracterizado, las reivindicaciones 15 y 18 se encuentran igualmente caracterizadas por sus componentes, por lo que consideramos que no es apropiada la objeción una vez modificado el pliego reivindicatorio.

Ahora bien, nos permitimos referir nuevamente al señor Examinador a la descripción, en donde se encuentra todo el sustento buscado por el Despacho para la encapsulación del polipéptido en un glóbulo rojo,

"La CocE mutante puede encapsularse en glóbulos rojos (RBC) con el fin de aumentar la duración de la acción y la estabilidad al calor, y disminuir la inmunogenicidad. La cocaína, justamente a medida que atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica, transita también rápidamente la membrana plasmática del RCB, y esta captura se ha demostrado en un estudio de administración de cocaína intravenosa en el hombre (Javaid et al. (1978) Journal of Chromatography 15, 105-113). Además, las concentraciones de cocaína en RBC excedieron las concentraciones en el plasma (Javaid et al. (1978) Journal of Chromatography 15, 105-113). Como tal, la encapsulación en RBC puede utilizarse para blindar formas termoestables de CocE contra la depuración.

Los eritrocitos se han aprovechado extensivamente por sus potenciales aplicaciones como sustancias portadoras de medicamentos (Wang et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). Siendo las células más abundantes del cuerpo humano, el RBC ofrece ventajas sin precedentes para funcionar como sustancia portadora de medicamentos. En primer lugar, los eritrocitos son completamente biocompatibles y biodegradables, particularmente cuando se utilizan células autólogas para carga de medicamentos. Además, la forma de disco bicóncavo de los eritrocitos los dota con la máxima relación de superficie a volumen (1.9×10^4 cm²/g) (Guyton, AG & Hall, JE (1996) Textbook of Medical Physiology, 425-433) utilizable para encapsulación de medicamentos. De igual forma la encapsulación en RBC evita que el medicamento cargado se inactive por factores endógenos, así como protege los organismos de los efectos tóxicos del

medicamento encapsulado (Wang et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). Más aún, la encapsulación en RBC permite evitar respuestas inmunitarias indeseables (es decir, antigenicidad e inmunogenicidad) que pueden desencadenarse por cuerpos extraños (Wang et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). Adicionalmente, los eritrocitos poseen una vida media en circulación más prolongada en comparación con otras sustancias portadoras sintéticas. Por ejemplo, se informa que la expectativa de vida normal de un eritrocito en la circulación sistémica es de alrededor de 120 días (Guyton, AG & Hall, JE (1996) Textbook of Medical Physiology, 425-433).

La encapsulación de CocE mutante en eritrocitos puede realizarse de acuerdo con varias técnicas conocidas en el arte, incluidas electroporación, endocitosis inducida (por ejemplo, por primaquina) del medicamento, y ósmosis (véase a este respecto, Green, R. and Widder, KJ (1987) Methods In Enzymology, Vol. 149). Estos métodos pueden incluir dilatar y romper la membrana celular, liberar el contenido interior incluyendo principalmente hemoglobina y el citoesqueleto, atrapar el medicamento y luego volver a sellar la membrana para producir el RBC en forma de copa, esférico, de color rosado o blanco (denominado generalmente "RBC-Ghost").

Alternativamente, pueden emplearse péptidos que penetran la membrana para encapsular CocE mutante en eritrocitos (véase a este respecto, Ejemplo 12). Péptidos que penetran la membrana, o péptidos de dominio de transducción de la proteína (PTD - protein transduction domain) son una familia de péptidos pequeños (que consisten normalmente de residuos de 10-15 aminoácidos) incluidos TAT, LMWP, y otros péptidos catiónicos ricos en arginina (véase generalmente, Dietz, GPH and Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131). Se sabe en el arte que, enlazando covalentemente PTD a casi cualquier tipo de especie molecular, incluidas proteínas (MW>150 kDa; ya se han probado más de 60 diferentes proteínas (Dietz, GPH and Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131) y nano-portadores (por ejemplo, liposomas), PTD puede transbordar la especie enlazada a través de la membrana celular de todos los tipos de órganos, incluido el cerebro (Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572). PTD no es tóxico ni inmunógeno (Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572), y la internalización de células mediada por PTD no induce perturbación o alteración de la membrana celular de los eritrocitos (Suzuki et al. (2002) Journal of Biological Chemistry 25, 2437-2443). El PTD se ha utilizado con éxito en cargar RBC con proteínas, y resulta en eritrocitos con atributos físicos y químicos inalterados (véase a este respecto, Li et al. (2003) American Pharmaceutical Review 6, 22-26). En consecuencia, la conjugación del

X
226

péptido PTD a CocE mutante puede facilitar la encapsulación de RBC. La encapsulación de RBC puede llevarse igualmente a cabo usando CocE mutante pegilada".

Finalmente, en lo que respecta al método de detección selectiva de gran productividad para la identificación de polipéptidos CocE mutantes termoestables, las reivindicaciones relacionadas con el mismo han sido modificadas para establecer una temperatura entre 37 y 50°C, el cual corresponde a un rango de temperatura al cual el polipéptido CocE de tipo silvestre presenta una estabilidad reducida, y por tanto dicho método es de gran utilidad para la evaluación de la termoestabilidad del objeto de la presente invención.

En conclusión, consideramos que el alcance de las nuevas reivindicaciones se encuentra debidamente sustentado en la totalidad de las enseñanzas de la descripción, más aun teniendo en cuenta que la misma cuenta con ejemplos que ilustran la invención, y brindan toda la guía requerida por el normalmente versado en la materia, en donde los mismos no deben considerarse limitativos de la materia reivindicada, por la cual solicitamos respetuosamente aceptar el nuevo pliego reivindicatorio como claro y conciso.

Nivel inventivo

De acuerdo con las modificaciones realizadas sobre la nueva reivindicación 1, la cual establece un polipéptido CocE mutante aislado de SEQ ID NO:1 que presenta modificaciones seleccionadas de un grupo específico, que le confieren actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C en comparación en el CocE de tipo silvestre ya conocido, consideramos que ninguna de las referencias citadas por su Despacho afectan el nivel inventivo de la presente invención por las razones expuestas a continuación.

Como primera medida nos permitimos recordar al señor Examinador que la presente invención centra la materia revelada en proveer una CocE altamente eficiente, termoestable y de larga duración, que proteja contra los efectos tóxicos y reforzantes de la cocaína, al considerar que la CocE de tipo silvestre presenta una disminución de la estabilidad al ser sometida a altas temperaturas.

En este sentido, la presente solicitud revela mutantes CocE termoestables los cuales fueron diseñados y generados mediante el incremento de la estabilidad termodinámica a través de la disminución del ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado) del polipéptido CocE, o disminución de la tasa de desdoblamiento a través del incremento de la energía libre de

227

activación del proceso de desdoblamiento de CocE, en donde para dicho diseño se aplicó la estrategia de enfoque triple expuesta previamente, que permitió superar la falencia del arte previo en la generación de enzimas CocE con termoestabilidad incrementada, y por tanto corresponde con una metodología en la que se requirió la aplicación de nivel inventivo.

En lo referente a los documentos citados a lo largo del Oficio Técnico, notamos que **D1 (Bresler M. et al.)** centra la materia revelada en el polipéptido CocE de tipo silvestre, siendo silencioso frente a la generación de sustituciones, adiciones o deleciones como las especificadas por la nueva reivindicación de la presente invención. De hecho, al realizar una lectura objetiva de dicho documento es posible identificar en el párrafo 194 la secuenciación original del gen CocE de tipo silvestre de *Rhodococcus* MB1 mediante la subclonación de fragmentos de genes en *Rhodococcus erythropolis* CW25, la cual corresponde a un bacteria que no posee la habilidad para metabolizar cocaína, pero que en lugar de esto es capaz de crecer en presencia de éster metílico de ecgonina y benzoato, siendo estos últimos subproductos de la esterasa de cocaína.

Así las cosas, la referencia D1 solo se encuentra enseñando polipéptidos CocE de tipo silvestre, así como el correspondiente a la SEQ ID NO:1, sin ampliar en ningún momento las enseñanzas hacia la generación, o siquiera la mención, de CocE mutantes que presenten la inserción o delección de residuos aminoacídicos que confieran al polipéptido la retención de la actividad esterasa, siendo termoestables al ser expuestos a temperaturas superiores a los 37°C, mediante la aplicación de la estrategia de enfoque triple que consta de (i) diseño racional mediante mutagénesis dirigida al sitio, asistida por computador, (ii) mutagénesis aleatorio del gen CocE y detección selectiva de gran productividad, y (iii) mutagénesis del organismo hospedero de CocE, seguida por selección genética.

Por su parte la referencia **D2 (Larsen et al.)** incluye dentro de la materia revelada la estructura cristalográfica de un polipéptido CocE bacterial de tipo silvestre, sin incluir otro tipo de información acerca de la vía para generar modificaciones estructurales, que permitan la obtención de un polipéptido mutante.

En este orden de ideas, consideramos que la aseveración del señor Examinador según la cual establece que "D2 plantea que debe investigarse en la toxicidad de la enzima y la vida media en plasma de la misma, sugiriéndose así que la enzima debía modificarse", parece ser más una apreciación meramente subjetiva, la cual no se encuentra

9 

técnicamente sustentada, pues no se muestra de ninguna manera el proceder para la realización de mutaciones puntuales que permitan obtener un polipéptido con características como las enseñadas por la presente invención. Así las cosas, al tener en cuenta que el Instructivo de Patentabilidad establece claramente que durante el examen de nivel inventivo se debe responder a la pregunta de si en el estado de la técnica en su conjunto hay un segundo documento que **contiene una enseñanza que indicaría (no sólo que podría indicar, sino que indicaría)** a la persona medianamente versada en la materia, enfrentada al problema técnico, **como modificar o adaptar el estado de la técnica más cercano** para resolver el problema, de la forma reivindicada, **sin realizar una actividad inventiva**, consideramos que la afirmación del señor Examinador corresponde más con una conclusión que se encuentra influenciada por el conocimiento que ya se tiene de la invención, lo cual no es correcto de acuerdo a los lineamientos del instructivo en mención.

Además, D2 realmente establece lo siguiente,

"Dos de los parámetros in vivo más importante que deben abordarse son la toxicidad y la vida media plasmática de la enzima. **Vidas medias plasmáticas cortas serían suficientes para limpiar la cocaína del sistema de un paciente que experimenta una sobredosis, evitando una respuesta inmune adversa humoral y celular.** La vida media plasmática puede ser alargada, si es necesario, por modificaciones covalentes de CocE con poli etilenglicol (PEG), el cual enmascararía la enzima ante el sistema inmune"

Es así como es evidente que el señor Examinador emitió una interpretación completamente subjetiva de la materia revelada por D2, llevando a cabo un análisis en retrospectiva, en donde, a partir del conocimiento de la presente invención se buscaron de manera independiente las características técnicas esenciales reivindicadas, con el fin de afectar el nivel inventivo, pero sin siquiera considerar la totalidad de las enseñanzas de, este caso, D2.

Así las cosas, D2 enseña que contar con una enzima CocE con una baja vida media plasmática es deseable para lograr evadir respuestas inmunes adversas, lo que se consideraría como una desmotivación para el versado en la materia en cuanto a la generación de técnicas para prolongar la vida media plasmática del polipéptido CocE. Por otra parte, notamos que en cuanto a la pegilación D2 establece que "si es necesario" la

10 ~~08~~
229

enzima puede pegilarse para extender la vida media plasmática, mientras que en contraste la presente invención revela que la pegilación de CocE se lleva a cabo con el fin de generar una mejora de la termoestabilidad, adicional a la conseguida con las mutaciones generadas.

Por tal razón, D2 no brinda una guía tal para que el normalmente versado en la materia pueda realizar mutaciones puntuales como las expuestas en la reivindicación 1 que generen un polipéptido termoestable, pues dicho versado no contaría con las herramientas para conocer los residuos críticos que deben ser objeto de modificación, por lo que consideramos que la afirmación del señor Examinador no cuenta con el peso requerido para afectar el nivel inventivo de la presente invención, pues no es de ninguna utilidad frente a la solución del problema técnico referido por la presente solicitud, que en contraste el polipéptido reivindicado solucionada mediante **modificaciones en residuos aminoacídicos específicos** que proveen un CocE con vida media prolongada, y que en definitiva no se encuentran en ninguna de las referencias citadas por su Despacho.

Ahora bien, el documento **D3 (Lehman et al.)** corresponde con una referencia que provee una serie de herramientas y reportes aislados relacionados con la termoestabilidad de proteínas particulares, pero que es silencioso frente a polipéptidos como CocE u otros que presenten actividad esterasa.

Particularmente D3 establece en la página 371, que el diseño racional revelado puede ser efectivo con proteínas pequeñas que exhiban alta homología y una pronunciada diferencia en termoestabilidad, pero a su vez refiere la existencia del problema de "identificar las mutaciones termoestabilizantes relevantes en conjuntos de proteínas más grandes y de menor homología". Así, el señor Examinado puede notar que en el caso de la presente solicitud, el polipéptido CocE no es similar en tamaño y homología a las proteínas de choque frío de *Bacillus* que ilustran el diseño racional enseñado por D3.

En este orden de ideas, y considerando que D3 establece además que "la naturaleza no se basa en una única estrategia para estabilización, (...) una serie de publicaciones en esta área han llegado a conclusiones variables y contradictorias", dicha referencia concluye que es poco probable que se provea información útil para la predicción exacta de mutaciones termoestabilizantes, incluyendo comentarios finales que establecen que los esfuerzos futuros en la materia deben enfocarse en cómo combinar adecuadamente el diseño racional, la evolución directa y los genes sintéticos de consenso, dando solo una idea

limitada de dicha posibilidad como una idea general que no asegura la viabilidad en su aplicación.

Por tanto, la referencia D3 se encuentra seriamente limitada en sus enseñanzas al no poder afirmarse que el mismo enfoque podría ser necesariamente exitoso con otras proteínas, lo cual se ratifica con la mención de los diferentes inconvenientes asociados con los enfoques descritos dentro de la materia revelada. Es por esto, que consideramos que no puede asegurarse que el normalmente versado en la materia alcanzaría el éxito en el aumento de la termoestabilización de CocE mediante la aplicación de los enfoques dados en D3, tal como lo consigue mediante la aplicación de la metodología empleada en la presente invención, por lo que en definitiva el llegar exitosamente a la materia de la presente invención requirió del desarrollo de nivel inventivo.

Finalmente, consideramos que la referencia **D4 (Marshall et al.)** es similar en contenido a la referencia D3, y por tanto la misma tampoco contempla al polipéptido CocE ni proteínas similares con actividad esterasa. Así, D4 se centra en brindar técnicas diferentes que pueden ser usadas de manera genérica para alterar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, siendo silenciosa frente a la viabilidad de la metodología expuesta para la generación de una enzima CocE termoestable, como la aquí reivindicada.

De esta manera, es evidente que ninguna de las referencias D1 a D4, contemplan ni sugieren la realización de mutaciones puntuales sobre la CocE de tipo silvestre, con la aplicación de un diseño con estrategia de enfoque triple que consta de (i) diseño racional mediante mutagénesis dirigida al sitio, asistida por computador, (ii) mutagénesis aleatorio del gen CocE y detección selectiva de gran productividad, y (iii) mutagénesis del organismo hospedero de CocE, seguida por selección genética, por lo que la presente invención debe considerarse inventiva a la luz del arte previo.

Para concluir queremos recordarle respetuosamente al señor Examinador que el Instructivo de Patentabilidad establece lo siguiente,

"Durante el examen de nivel inventivo debe hacerse un juicio de valor y un análisis objetivo de las divulgaciones previas del estado de la técnica, no influenciados por el conocimiento que ya se tiene de la invención que se está evaluando. Por tanto, con el fin de minimizar la subjetividad y evitar que se realice un análisis en retrospectiva ("hindsight" ó "a posteriori"), el examen debe relacionar la invención con la solución de un problema técnico."

12
29/1

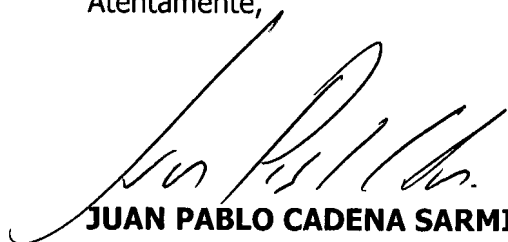
En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicitamos el retiro de las objeciones de la presente solicitud y la concesión del privilegio solicitado, ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la decisión 486.

Anexos

Nuevo pliego reivindicatorio.

Del Señor Director

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.SJ.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de cocaína esterasa (CocE) mutante aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que presenta por lo menos una sustitución, adición o delección en donde por lo menos una sustitución, adición o delección se selecciona del grupo que consiste de L163V; V225I; I218L; A310D; A149S; S159A; S265A; S56G; W220A; S140A; F189L; A193D; T254R; N42V; V262L; L508G; Y152H; V160A; T172R; Y532F; T74S; W285T; L146P; D533S; A194R; G173Q; C477T; K531A; R41I; L119A; K46A; F84Y; T172R-G173Q; L169K; F189A; N197K; R182K; F189K; V190K; Q191K; A194K; I175-G-G-A186; y T176-G-G-D185; y el polipéptido mutante CocE tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C comparado con el CocE de tipo silvestre que presenta una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
2. El polipéptido CocE aislado de la reivindicación 1, en donde se sustituyen por lo menos dos residuos de aminoácido.
3. El polipéptido CocE aislado de la reivindicación 2, en donde se sustituyen por lo menos tres residuos de aminoácido.
4. El polipéptido CocE aislado de la reivindicación 3, en donde se sustituyen por lo menos cuatro residuos de aminoácido.
5. El polipéptido CocE aislado de la reivindicación 4, en donde se sustituyen por lo menos cinco residuos de aminoácido.
6. Un polipéptido de cocaína esterasa mutante aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 3 (L163V); SEQ ID NO: 7 (V225I); SEQ ID NO: 8 (I218L); SEQ ID NO: 9 (A310D); SEQ ID NO: 10 (A149S); SEQ ID NO: 11 (S159A); SEQ ID NO: 12 (S265A); SEQ ID NO: 13 (S56G); SEQ ID NO: 14 (W220A); SEQ ID NO: 16 (S140A); SEQ ID NO: 17 (F189L); SEQ ID NO: 18 (A193D); SEQ ID NO: 19 (T254R); SEQ ID NO: 20 (N42V); SEQ ID NO: 21 (V262L); SEQ ID NO: 22 (L508G); SEQ ID NO: 23 (Y152H); SEQ ID NO: 24 (V160A); SEQ ID NO: 25 (T172R); SEQ ID NO: 26 (Y532F); SEQ ID NO: 27 (T74S); SEQ ID NO: 28 (W285T); SEQ ID NO: 29 (L146P); SEQ ID NO: 30 (D533S); SEQ ID NO: 31 (A194R); SEQ ID NO: 32 (G173Q); SEQ ID NO: 33 (C477T); SEQ ID NO: 34 (K531A); SEQ ID NO: 35 (R41I); SEQ ID NO: 36 (L119A); SEQ ID NO: 37 (K46A); SEQ ID NO: 38 (F84Y),

233
14

SEQ ID NO: 39 (T172R-G173Q); SEQ ID NO: 40 (L169K); SEQ ID NO: 41 (F189A), SEQ ID NO: 42 (N197K), SEQ ID NO: 43 (R182K), SEQ ID NO: 44 (F189K), SEQ ID NO: 45 (V190K), SEQ ID NO: 46 (Q191K), y SEQ ID NO: 47 (A194K), o un fragmento funcional de las mismas.

7. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido CocE mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica, que se hibridiza a SEQ ID NO: 2 o al complemento de SEQ ID NO: 2 bajo condiciones de alta restricción, en donde el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido CocE mutante que tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C, comparado con CocE tipo silvestre.
9. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido CocE mutante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido CocE mutante codificado tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C, comparado con CocE tipo silvestre.
10. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 7 en donde la identidad de secuencia se selecciona del grupo conformado por 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% por lo menos.
11. El polipéptido o ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en donde el aumento en termoestabilidad del polipéptido CocE mutante sobre la CocE tipo silvestre es por lo menos alrededor de 2.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.3 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.4 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.5 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.6 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.7 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.8 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.9 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.0 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.3 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.4 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.5 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.6 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.7 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.8 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.9 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.0 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.3 kcal/mol, por lo menos

15 234

alrededor de 4.4 kcal/mol, o por lo menos alrededor de 4.5 kcal/mol.

12. El polipéptido o ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en donde el polipéptido CocE mutante tiene inmunogenicidad reducida, comparado con la CocE tipo silvestre.
13. El polipéptido o ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en donde el polipéptido CocE mutante tiene por lo menos alrededor de 60%, por lo menos alrededor de 65%, por lo menos alrededor de 70%, por lo menos alrededor de 75%, por lo menos alrededor de 80%, por lo menos alrededor de 85%, por lo menos alrededor de 90%, por lo menos alrededor de 95%, por lo menos alrededor de 100%, por lo menos alrededor de 105%, por lo menos alrededor de 110%, por lo menos alrededor de 115%, por lo menos alrededor de 120%, por lo menos alrededor de 125%, por lo menos alrededor de 130%, por lo menos alrededor de 135%, o por lo menos alrededor de 140% de la actividad esterasa del polipéptido CocE tipo silvestre.
14. El polipéptido o ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en donde el polipéptido CocE mutante conserva por lo menos sustancialmente la misma o una mayor eficiencia catalítica del polipéptido CocE tipo silvestre.
15. Una composición farmacéutica que contiene el polipéptido CocE mutante o el polipéptido CocE mutante codificado por el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
16. El polipéptido, polipéptido codificado por el ácido nucleico, o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el polipéptido CocE mutante esta pegilado.
17. El polipéptido, polipéptido codificado por el ácido nucleico, o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el polipéptido CocE mutante se encapsula en un glóbulo rojo.
18. El polipéptido, polipéptido codificado por el ácido nucleico, o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el polipéptido CocE mutante se estabiliza por un sustrato o inhibidor.

18 ~~23~~

19. Un método de detección selectiva de gran productividad para la identificación de polipéptidos CocE mutantes termoestables, que comprende los pasos de:

transformar establemente una célula con un ácido nucleico que codifica un polipéptido CocE mutante;

expresar el polipéptido CocE mutante en la célula;

aislar el polipéptido CocE expresado;

medir la actividad esterasa del polipéptido CocE mutante aislado a una o más temperaturas predeterminadas de por lo menos alrededor de 37°C hasta alrededor de 50°C, para determinar la termoestabilidad de los polipéptidos CocE mutantes aislados;

seleccionar el polipéptido CocE mutante aislado con actividad esterasa a la temperatura(s) predeterminada.

20. El método de detección selectiva de gran productividad de la reivindicación 19 en donde la medición de la actividad esterasa de los polipéptidos mutantes aislados comprende:

contactar el polipéptido CocE mutante aislado con (i) cocaína y un indicador de pH o (ii) un tio-derivado de cocaína y un indicador de tiol;

detectar un cambio en el indicador de pH o el indicador de tiol; en donde un cambio del indicador de pH o el indicador de tiol se correlaciona con la formación de ácido benzoico de la hidrólisis de cocaína o derivado de cocaína por el polipéptido CocE mutante.

21. El método de detección selectiva de gran productividad de una cualquiera de las reivindicaciones 19-20 que comprende además repetir uno o más pasos del método de detección selectiva por lo menos una vez con una temperatura incrementada para medir la actividad esterasa.

17 ~~236~~

22. El método de detección selectiva de gran productividad de la reivindicación 21 en donde un primer ciclo de detección selectiva tiene una primera temperatura para medir la actividad esterasa de alrededor de 37°C, y un ciclo subsiguiente de detección selectiva tiene una temperatura para medir la actividad esterasa de alrededor de 45°C.
23. El método de detección selectiva de gran productividad de una cualquiera de las reivindicaciones 19-22 en donde la expresión del polipéptido CocE mutante ocurre a una temperatura a la cual la CocE tipo silvestre conserva sustancialmente actividad catalítica.
24. El método de detección selectiva de gran productividad de una cualquiera de las reivindicaciones 19-22 en donde la expresión del polipéptido CocE mutante ocurre a una temperatura a la cual el polipéptido CocE tipo silvestre se divide sustancialmente en cuerpos de inclusión.



No. 09-010531- -00009-0000

Fecha: 2012-12-20 15:44:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 203 236

ción

18

AS. 123.204

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK, THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN y UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro

Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
US	412 Low Memorial Library, Mail Code 4308, 535 West 116 th Street, NY 10027	New York
US	1214 S. University Avenue, 2 nd Floor, MI 48104	Ann Arbor
US	144 ASTeCC Building, KY 40506	Lexington
Dirección electrónica		No. Fax
		Número telefónico

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

80.410.337

57492

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio

Calle 70 A #4-41

Ciudad

Bogotá, D.C.

Dirección electrónica

No. Fax

Número telefónico

742-2200

744-2200

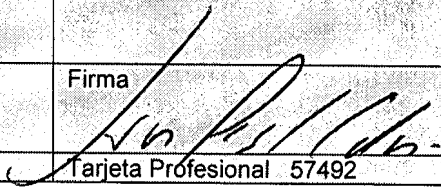
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

2
19

4. Datos del trámite																				
CONVERSIÓN <table><tr><td>Expediente:</td></tr><tr><td> </td></tr><tr><td> </td></tr><tr><td>De:</td></tr><tr><td>A:</td></tr><tr><td> </td></tr></table>	Expediente:			De:	A:		DIVISIÓN <table><tr><td>Expediente: 09 010.531</td></tr><tr><td> </td></tr><tr><td> </td></tr><tr><td>De:</td></tr><tr><td>A:</td></tr><tr><td> </td></tr></table>	Expediente: 09 010.531			De:	A:		FUSIÓN <table><tr><td>Expediente:</td></tr><tr><td> </td></tr><tr><td> </td></tr><tr><td>De:</td></tr><tr><td>A:</td></tr><tr><td> </td></tr></table>	Expediente:			De:	A:	
Expediente:																				
De:																				
A:																				
Expediente: 09 010.531																				
De:																				
A:																				
Expediente:																				
De:																				
A:																				

5. Anexos	
Comprobante de pago No. <u>12-119715; 12-139896</u>	Fecha: <u>17.12.2012</u>

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación. ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación. ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división. ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud. ☒ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

7. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO	
C.C 80.410.337	Tarjeta Profesional 57492

123204

77
20

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 119715

Bogotá D.C., Noviembre 19 de 2012 - 14:04:23

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	446248460	19/11/2012	68.178.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDIARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-010531- -00009-0000

Fecha: 2012-12-20 15:44:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 233 236

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Noviembre 19 de 2012 - 14:05:02

123204
21

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 139896	
				Bogotá D.C., Diciembre 18 de 2012 - 13:58:29	
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.				NI 860.047.372	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513371	18/12/2012	510.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO	
17 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	510.000.00	
				\$510.000.00	
=====					
SON: **QUINIENTOSDIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: 					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
					
No. 09-010531- -00009-0000					
Fecha: 2012-12-20 15:44:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 523 RESPUESTA Folios: 258 236					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.slc.gov.co e-mal: info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Diciembre 18 de 2012 - 13:58:29					

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

TO BE USED IN Colombia

PODER

Yo (nosotros), 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

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, temas comerciales y
enseños, registros de derechos de autor y contratos sobre
los mismos, obtención de certificados de obtención 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.

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.

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 sustituir 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.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre

Cargo

POWER OF ATTORNEY

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

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

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 obtainment 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.

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.

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.

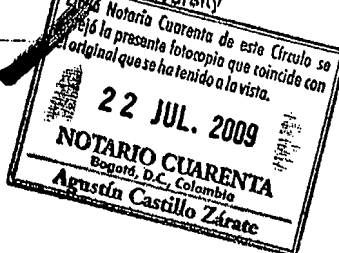
Granted and signed in New York, NY USA
this 16th of April 200_

Signature

Name

Title

Jeffrey M. Sears, Ph.D.
Associate General Counsel
Columbia University

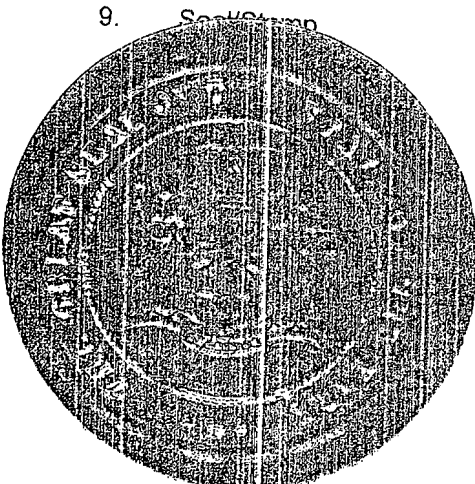


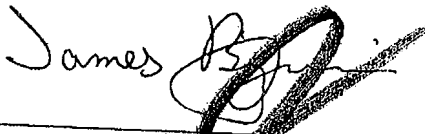
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

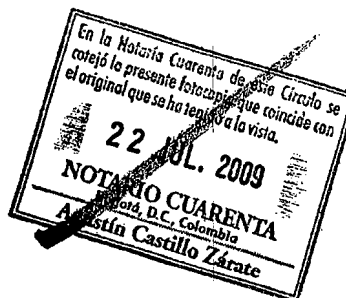
1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

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
10. Signature


James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

04135595.RSL (REV: 2/6/96)



6
23

State of New York
County of New York

NEW YORK
COUNTY

719140 Form 1

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

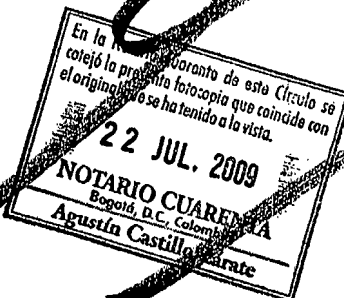
Craig Italy
whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate 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



TO BE USED IN Columbia

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
Sally Rann
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 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)

Public Notary (Seal)

CRAIG ZRALY
Notary Public State of New York
No. 012R6038118
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 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.

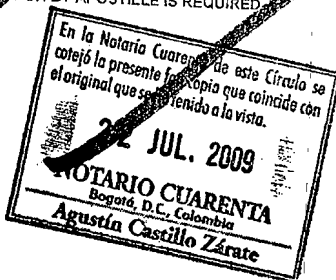
who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Notario Público (sello)

Notary Public (Seal)

LEGALIZACIÓN POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED



247X

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.



Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros), 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.

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 recaudar 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 enseñanzas, 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.

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 desistirse a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando al 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.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistirse, 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.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre

Cargo

LEGALIZACIÓN POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

POWER OF ATTORNEY

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

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

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 obtainment of vegetable 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.

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.

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.

Granted and signed in Ann Arbor, MI

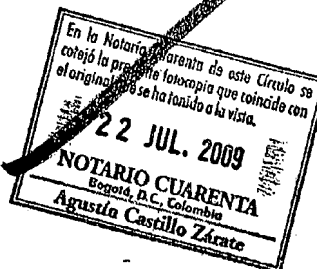
this 2nd day of July 2009

Signature

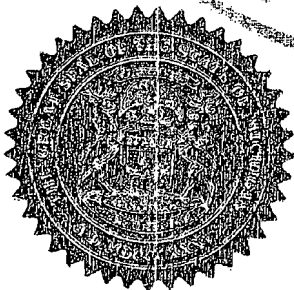
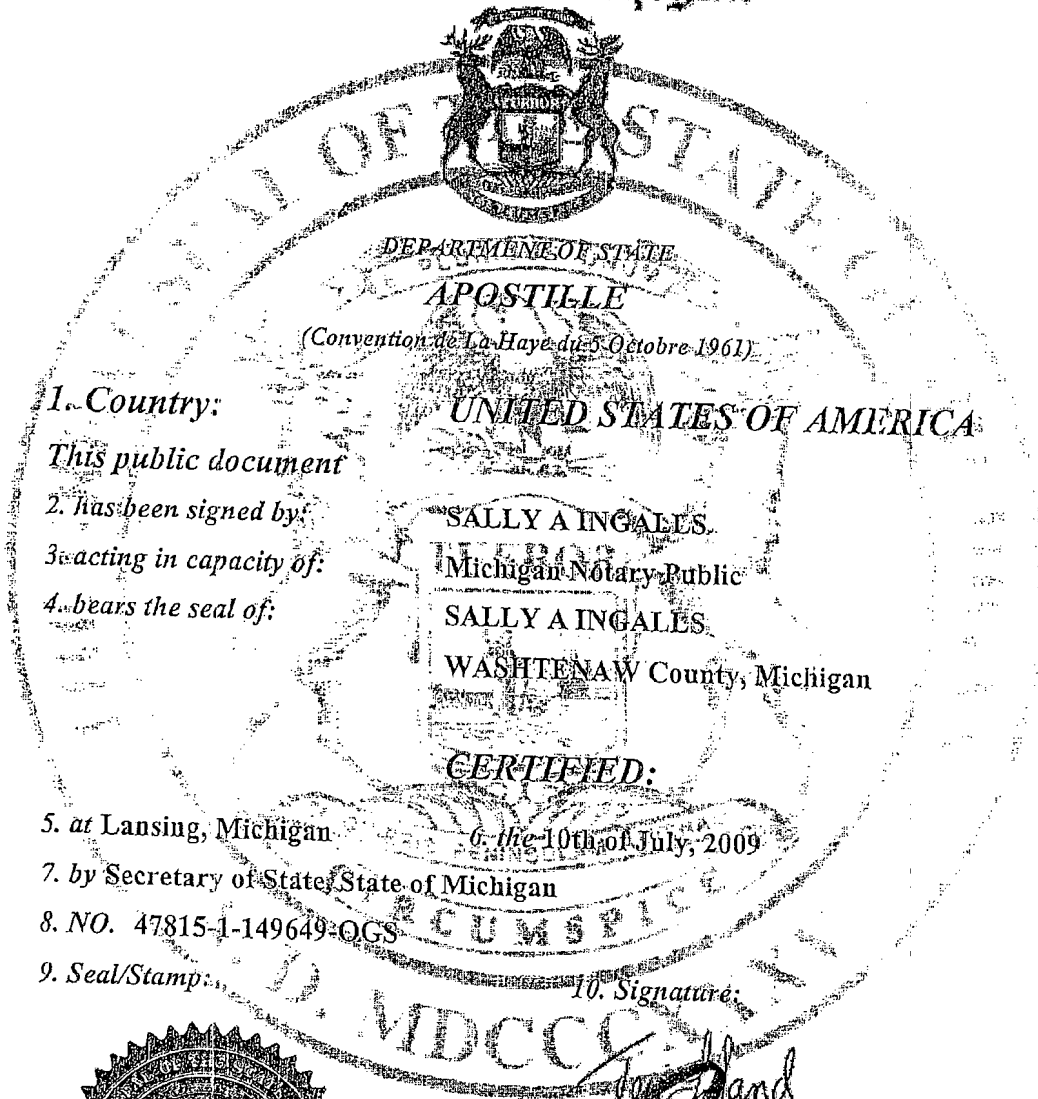
Name

Title

Director of Licensing
UM Technology Transfer

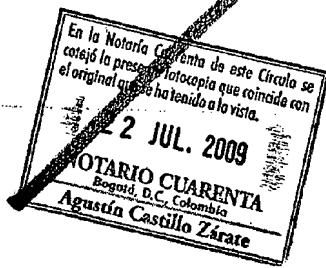


State of Michigan



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 the official acted, and where appropriate, the identity of the seal or stamp with the document bears. This certification is not intended to imply that the contents of this document are correct, nor that they have the approval of the State of Michigan.



26 8

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí

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

Ruth L. Rasor

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

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

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

of 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.

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 la vista 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 Michigan Constitution Art. 8 Sect. 5
under date of

Jan. 1963

y que quien confiere el presente poder es su representante.

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

Notario Público (sello)

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

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
COUNTY OF FARIAS

My Commission expires 2016
Acting in the County of

Hoy de de , compareció(eron) ante mí

On this day of 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)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

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

27/10

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público, Estado de Michigan
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____

Hay dos sellos secos que dicen:

SALLY A. INGALLS
Estado de Michigan



Trey Grayson
SECRETARY OF STATE

For use in the country of: Colombia

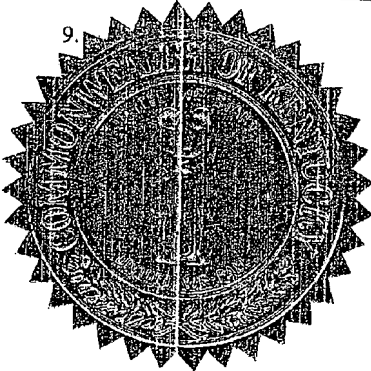
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by Getha Helfenberger
3. acting in the capacity of Deputy County Clerk
Fayette County
Commonwealth of Kentucky
4. bears the seal/stamp of Getha Helfenberger
Deputy County Clerk
Commonwealth of Kentucky

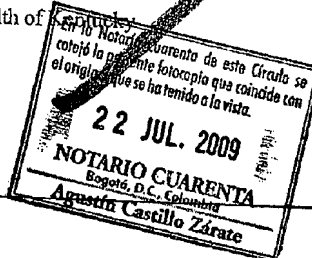
CERTIFIED

5. at Frankfort, Kentucky 6. the 9th day of July, 2009
7. by Secretary of State, Commonwealth of Kentucky
8. No. 46357.82660.24687.67783



10. Signature:

Trey Grayson
Secretary of State
Commonwealth of Kentucky



VBH

Brigard & Castro
BOGOTA - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros), UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION

I (We), UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION

domiciliado(s) en 144 ASTeCC Building
Lexington, KY 40506, Estados Unidos de América.

domiciled 144 ASTeCC Building
Lexington, KY 40506, 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 enseñanzas, 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 desistirse 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 desistirse, 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 power to receive notifications, and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

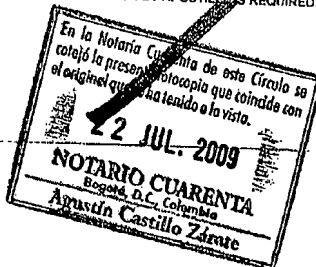
LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

Granted and signed in Lexington, Kentucky USA
this 22 day of June 2009

Signature

Name
Title

LEGALIZATION BY APOSTILLA IS REQUIRED.



STATE OF KENTUCKY

COUNTY OF FAYETTE

Pursuant to KRS 423.020, I DONALD W. BLEVINS JR, Clerk of the County of Fayette for the state of Kentucky, the same being a Court of Record, DO HEREBY CERTIFY THAT:

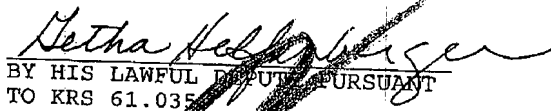
THE NOTARY COMMISSION OF TANYA G FLOYD, RECORDED IN NOTARY BOOK 0114, PAGE 0247 WILL EXPIRE ON 04/27/2013

Whose name is subscribed to the certificate of the proof or acknowledgement of the annexed instrument and thereon written was, at the time of taking such proof or acknowledgement, a Notary Public in and for said County of Fayette, dwelling in the City of Lexington, commissioned, sworn, and duly authorized to take same. And, further, that I am well acquainted with the handwriting of such Notary and verily believe that the signature to said certificate or proof or acknowledgement is genuine.

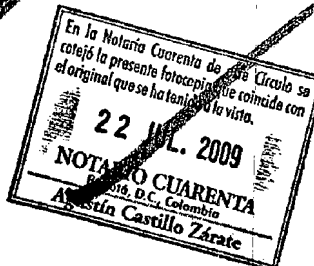
IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the said Court and County, this 08 day of July, 2009.



Clerk, Fayette County Court



BY HIS LAWFUL DEPUTY PURSUANT
TO KRS 61.035



12
29

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí

On this 8th day of June of 2009 personally
appeared before me

Don Keach

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

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 UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION

of UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION

Sociedad legalmente constituida para un período 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 hereto 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 la vista 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 Kentucky
under date of

June 8th, 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)

Public Notary (Seal)
My commission expires
Apr. 27, 2013
NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

Hoy de de , compareció(eron) ante
mí

On this day of 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.

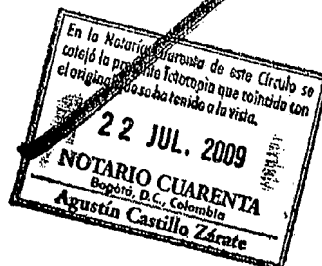
who is(are) known to me and who I attest executed the
foregoing document and he (they) declared he (they)
grant(s) the document for the uses and purposes therein
expressed.

Notario Público (sello)

Notary Public (Seal)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.



TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE PODER OTORGADO
POR UNIVERSITY OF KENTUCKY REASEARCH FOUNDATION, con
domicilio en 144 ASceCC Building Lexington, KY 40506, Estados Unidos de
América.

ESTADO DE KENTUCKY
TREY GRAYSON
SECRETARIO DE ESTADO

Para uso en: Colombia

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 GETHA HELFENBERGER
3. actuando en capacidad de SECRETARIO DELEGADO DEL
CONDADO, CONDADO DE FAYETTE, ESTADO DE KENTUCKY
4. lleva el sello/timbre de GETHA HELFENBERGER, SECRETARIO
DELEGADO DEL CONDADO, ESTADO DE KENTUCKY

CERTIFICADO

5. en Frankfort, Kentucky
6. a los 9 días del mes de julio de 2009
7. por el Secretario de Estado, Estado Kentucky
8. No. 46357.82660.24687.67783
9. Sello/timbre

10. Firma

(firma)

Trey Grayson
Secretario de Estado
Estado de Kentucky

Lleva un sello que dice:
ESTADO DE KENTUCKY

3013

Estado de Kentucky
Condado de Fayette

De conformidad con KRS 423.020, yo DONALD W. BLEVINS JR, Secretario del Condado de Fayette para el Estado de Kentucky, siendo el mismo un Tribunal de Registro,

POR LA PRESENTE CERTIFICO QUE,

La comisión notarial de TANYA G. FLOYD, registrada en el libro notario 0114, página 0247, expira el 27 de abril de 2013,

cuyo nombre se suscribe al certificado de prueba o reconocimiento del instrumento anexo y escrita al respecto, era un Notario Público al momento de tomar dicha prueba o reconocimiento en y para dicho Condado de Fayette, residente en la ciudad de Lexington, comisionado, había tomado juramento y estaba debidamente autorizado para tomar el mismo. Y, además, tengo pleno conocimiento de la letra de dicho Notario y creo verdaderamente que la firma de dicho certificado o prueba o reconocimiento es genuina.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he puesto en el presente mi firma y sello de dicho Tribunal y Condado este 8 de julio de 2009.

(firma)
Secretario, Tribunal del Condado de Fayette

(firma)
Por su Delegado Legal de conformidad con KRS 61.035

Hay un sello seco que dice:

SECRETARIO DEL CONDADO DE FAYETTE
KENTUCKY

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello seco que dice:

TANYA G. FLOYD

NOTARIO PÚBLICO GENERAL DEL ESTADO

Hay un sello seco que dice:

SECRETARIO DEL CONDADO DE FAYETTE
KENTUCKY

14
31

COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y TRATAMIENTO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 60/819,569, presentada el 10 de julio de 2006, la cual se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

DECLARACIÓN CON RESPECTO A INVESTIGACIÓN O DESARROLLO PATROCINADOS CON RECURSOS FEDERALES

[0002] Esta invención se realizó en parte con apoyo del Gobierno de los Estados Unidos bajo la Donación NIDA No. DA021416. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DE MATERIAL PRESENTADO EN UN DISCO COMPACTO

[0003] El Listado de Secuencias, que constituye una parte de la presente divulgación, incluye un formato de lectura por computador y un listado de secuencias escrito, que comprende secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de la presente invención. La información del listado de secuencias registrado en formato de lectura por computador es idéntica al listado de secuencias escrito. El asunto del Listado de Secuencias se incorpora en esta especificación por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[0004] La invención divulgada en esta especificación se refiere generalmente a terapéutica de la cocaína.

ARTE PREVIO

[0005] El abuso de cocaína es un problema médico y social persistente, que se resiste a la curación mediante farmacoterapia. La cocaína actúa bloqueando la reabsorción de monoaminas, dopamina, norepinefrina y

15
32

serotonina, prolongando y magnificando los efectos de estos neurotransmisores en el sistema nervioso central (Benowitz NL (1993) *Pharmacol Toxicol* 72, 3-12). La toxicidad de la cocaína se caracteriza tanto por convulsiones como por disfunción cardíaca (por ejemplo, infarto del miocardio, arritmias cardíacas, aumento de la presión sanguínea, derrame cerebral, 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 RJ (2002) *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 7, 195-202; Wilson LD and Shelat C (2003) *J Toxicol Clin Toxicol* 41, 777-788; Knuepfer MM (2003) *Pharmacol Ther* 97, 181-222). Debido a la capacidad de la cocaína de cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica y sus efectos generalizados sobre los sistemas nerviosos central y periférico, la sobredosis puede resultar en muerte súbita (véase Bauman JL and DiDomenico RJ (2002) *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 7, 195-202, para una revisión).

[0006] 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 FI, Howell LL and Kuhar M.J (1999) *J Med Chem* 42, 2721-2736). Los dos tipos de terapias disponibles para el tratamiento del abuso de opioideos, antagonismo (por ejemplo, naltrexona) y reemplazo (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) *Addictive Behaviors* 29, 1439-1464). 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.

[0007] La cocaína de origen natural se hidroliza con el éster de benzoilo 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 semi-vida de eliminación de la cocaína en la sangre varía de 0.5 1.5 horas (T. Inaba (1989) *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 67, 1154-1157). Ha habido unos cuantos intentos de emplear BChE de origen natural o BChE

genéticamente modificada para aumentar la degradación de la cocaína (véase a este respecto, Carmona et al. (2000) *Drug Metabolism & Disposition* 28, 367-371; Xie et al. (1999) *Molecular Pharmacology* 55, 83-91; Sun et al. (2002a) *Molecular Pharmacology*; Sun et al. (2002b) *Pharmacology & Experimental Therapeutics* 302, 710-716; Duysen et al. (2002) *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 302, 751-758; Gao Y and Brimijoin S (2004) *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 310, 1046-1052; Gao et al. (2005) *Molecular Pharmacology* 67, 204-211). 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; Baird et al., 2000; Larsen et al., 2004), mientras que otros están explorando la posibilidad del uso de vacunas (véase por ejemplo, Kosten et al. (2002) *Vaccine* 20, 1196-1204).

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

Enzima	Kcat(min-1)	Km (µM)	Eficiencia (kcat/Km)	Referencia
BChE	4.1	4.5	9.1×10^6	Sun et al., 2002a
Ala328W/Y332A	154	18	8.5×10^6	Sun et al., 2002a
Mab15A10	2.2	220	1×10^4	Larsen et al., 2004
AME 359	620	20	3.1×10^7	Gao et al., 2005
CocE	468	0.64	7.2×10^8	Turner et al., 2002

[0008] Una bacteria, *Rhodococcus* sp. MB 1, nativa del suelo que rodea la planta de coca, ha desarrollado la capacidad de utilizar cocaína como su sola fuente de carbono y nitrógeno. La bacteria expresa una cocaína esterasa (CocE) que actúa en la misma forma que la BChE para hidrolizar el éster de benzoilo de la cocaína, produciendo ecgonina metil éster y ácido benzoico (véase a este respecto, Figura 1) (Bresler et al. (2000) *Appl Environ Microbiol* 66, 904-908; Turner et al. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307; Larsen et al. (2002) *Nature Struct Biol* 9, 17-21). El gen para CocE se ha aislado y clonado (Bresler et al. (2000) *Appl Environ Microbiol* 66, 904-908), y la estructura cristalina de CocE se ha determinado (Turner et al. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307; Larsen et

al. (2002) Nature Struct Biol 9, 17-21). La estructura de CocE (véase a este respecto, Figura 2) revela una serina esterasa clásica plegada además de los otros dos dominios que se combinan para formar un receptáculo de unión de cocaína ("**a cocaine binding pocket**"). La alteración de cualquiera de los tres aminoácidos (Asp, His, o Ser) en la tríada catalítica en el sitio activo (para una revisión, véase por ejemplo Dodson G and Wlodawer A (1998) Trends Biochem Sci 23, 347-352) inactiva la actividad esterasa contra la cocaína. Más aún, la mutación de residuos que hacen contacto con la fracción benzoato de la cocaína (por ejemplo, Tyr44) desestabiliza igualmente la hidrólisis de la cocaína, presumiblemente deteriorando la estabilización del oxianión en el sitio de transición (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307; Larsen et al. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21). La enzima purificada (MW ~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) Biochemistry 41, 12297-12307; Larsen et al. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21), casi tres órdenes de magnitud mayor que las esterases endógenas y, muy probablemente, actuaría suficientemente rápido para desintoxicar humanos que se hayan tomado una dosis excesiva de cocaína (Landry et al. (1993) Science 259, 1899-1901; Mets et al. (1998) National Academy of Sciences of the United States of America 95, 10176-10181). 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) Biochemistry 41, 12297-12307; Larsen et al. (2002) Nature Structural Biology 9, 17-21).

[0009] En consecuencia, sería deseable proveer una CocE estable para terapéutica anti-cocaína.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0010] Por consiguiente, los presentes inventores han tenido éxito en descubrir mutantes de cocaína esterasa altamente eficientes, termoestables y de larga duración, que pueden proteger contra los efectos tóxicos y reforzantes de la cocaína en sujetos.

[0011] Un aspecto de la invención provee polipéptidos de cocaína esterasa (CocE) mutantes aislados de la secuencia de aminoácidos de CocE tipo

35

silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), pero con por lo menos un residuo de aminoácido sustituido. Los polipéptidos CocE mutantes tienen actividad esterasa con termoestabilidad creciente a 37°C, comparados con la CocE tipo silvestre.

[0012] Varias incorporaciones incluyen polipéptidos CocE mutantes con por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, o más sustituciones de la secuencia de aminoácidos de la CocE tipo silvestre. Ejemplos de polipéptidos CocE mutantes en el ámbito de la invención incluyen aquellos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (L163V); SEQ ID NO: 7 (V225I); SEQ ID NO: 8 (I218L); SEQ ID NO: 9 (A310D); SEQ ID NO: 10 (A149S); SEQ ID NO: 11 (S159A); SEQ ID NO: 12 (S265A); SEQ ID NO: 13 (S56G); SEQ ID NO: 14 (W220A); SEQ ID NO: 16 (S140A); SEQ ID NO: 17 (F189L); SEQ ID NO: 18 (A193D); SEQ ID NO: 19 (T254R); SEQ ID NO: 20 (N42V); SEQ ID NO: 21 (V262L); SEQ ID NO: 22 (L508G); SEQ ID NO: 23 (Y152H); SEQ ID NO: 24 (V160A); SEQ ID NO: 25 (T172R); SEQ ID NO: 26 (Y532F); SEQ ID NO: 27 (T74S); SEQ ID NO: 28 (W285T); SEQ ID NO: 29 (L146P); SEQ ID NO: 30 (D533S); SEQ ID NO: 31 (A194R); SEQ ID NO: 32 (G173Q); SEQ ID NO: 33 (C477T); SEQ ID NO: 34 (K531A); SEQ ID NO: 35 (R41I); SEQ ID NO: 36 (L119A); SEQ ID NO: 37 (K46A); SEQ ID NO: 38 (F84Y), T172R-G173Q (SEQ ID NO: 39); L169K (SEQ ID NO: 40); F189A (SEQ ID NO: 41), N197K (SEQ ID NO: 42), R182K (SEQ ID NO: 43), F189K (SEQ ID NO: 44), V190K (SEQ ID NO: 45), Q191K (SEQ ID NO: 46), y A194K (SEQ ID NO: 47), o un fragmento funcional) de las mismas. Polipéptidos ejemplares adicionales de CocE mutante incluyen F189A/T172R, T172R/A193D, T172R/G173Q-I175-G-G-A186, T172R/G173Q-T176-G-G-D185, y similares. Dadas las convenciones de denominación y las secuencias polipeptídicas divulgadas en esta especificación, una persona experta en el arte podría determinar las secuencias polipeptídicas para los polipéptidos CocE mutantes ya mencionados.

[0013] Otro aspecto de la invención provee composiciones farmacéuticas que incluyen, entre sus componentes un polipéptido CocE mutante en el ámbito de la invención y una sustancia portadora o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0014] Otro aspecto de la invención provee ácidos nucleicos aislados que codifican el polipéptido CocE mutante descrito en esta especificación. En varias incorporaciones, los ácidos nucleicos incluyen aquellos con secuencias que se

hibridan al ácido nucleico que codifica CocE tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 2), o al complemento del mismo, bajo condiciones de alta restricción. Tal ácido nucleico aislado codifica un polipéptido CocE mutante que tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C, comparada con la CocE tipo silvestre. Varias incorporaciones de la secuencia de ácido nucleico aislado tiene por lo menos alrededor del 85% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la CocE tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 2). Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislado tiene por lo menos alrededor de 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad de secuencia de la CocE tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 2).

[0015]En varias incorporaciones, polipéptidos CocE mutantes (o polipéptidos codificados por ácidos nucleicos en el ámbito de la invención) tienen temperaturas de fusión mayores, comparados con la CocE tipo silvestre. En varias incorporaciones, polipéptidos CocE mutantes (o polipéptidos codificados por ácidos nucleicos en el ámbito de la invención) aumentan la termoestabilidad de los polipéptidos CocE mutantes sobre la CocE tipo silvestre en por lo menos alrededor de 2.0 kcal/mol. Por ejemplo, la termoestabilidad incrementada puede ser por lo menos alrededor de 2.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.3 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.4 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.5 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.6 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.7 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.8 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.9 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.0 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.3 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.4 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.5 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.6 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.7 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.8 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.9 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.0 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.3 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.4 kcal/mol, o por lo menos alrededor de 4.5 kcal/mol.

[0016]En varias incorporaciones, polipéptidos CocE mutantes (o polipéptidos codificados por ácidos nucleicos en el ámbito de la invención) tienen una inmunogenicidad reducida, comparados con la CocE tipo silvestre.

20
37

[0017] En algunas incorporaciones, los polipéptidos CocE mutantes termoestables tienen menos actividad esterasa que la CocE tipo silvestre. Por ejemplo, mutantes de CocE termoestable pueden tener alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, o alrededor de 99% de la actividad esterasa de la CocE tipo silvestre. En otras incorporaciones, los polipéptidos CocE mutantes tienen la misma eficiencia catalítica, o mayor, de los polipéptidos CocE tipo silvestre. Por ejemplo, mutantes de CocE termoestables pueden tener alrededor de 100%, alrededor de 110%, alrededor de 120%, alrededor de 130%, alrededor de 140%, alrededor de 150%, o más, de la actividad esterasa de CocE tipo silvestre.

[0018] En varias incorporaciones, los polipéptidos CocE mutantes se pegilan. En varias incorporaciones, el polipéptido CocE mutante se encapsula en un glóbulo rojo. Por ejemplo, un polipéptido(s) CocE mutante pegilado (o una composición farmacéutica que contenga un polipéptido(s) CocE mutante pegilado) puede encapsularse en un glóbulo rojo (RBC - *red blood cell*).

[0019] En algunas incorporaciones, los polipéptidos CocE mutantes se estabilizan por un sustrato, producto, y/o inhibidor.

[0020] Otro aspecto de la invención provee los métodos de tratar una afección inducida por la cocaína. En tales métodos, una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido(s) CocE mutante (o una composición farmacéutica que contenga un polipéptido(s) CocE mutante) en el ámbito de la invención se administra a un sujeto necesitado de ello. En varias incorporaciones, la afección inducida por la cocaína incluye sobredosis de cocaína, toxicidad de la cocaína, adicción a la cocaína, dependencia de la cocaína, y/o alguna combinación de las mismas.

[0021] Aún otro aspecto de la invención posibilita un método de detección selectiva de gran productividad ("***a high throughput screening***") para la identificación de polipéptidos CocE mutantes termoestables. En tal método de detección selectiva, una célula se transforma en forma estable con un ácido nucleico que codifica un polipéptido CocE mutante candidato. El polipéptido CocE

9A
JB

mutante se expresa en la célula. El polipéptido CocE mutante expresado se aísla o despliega. La actividad esterasa del polipéptido CocE mutante aislado se mide a una o más temperaturas para determinar la termoestabilidad de los polipéptidos CocE mutantes aislados. Tal temperatura(s) puede ser desde alrededor de 30°C a alrededor de 50°C. Se selecciona(n) el polipéptido(s) CocE mutantes con actividad esterasa a la temperatura(s) predeterminada.

[0022] En algunas incorporaciones del método de detección selectiva, la medición de la actividad esterasa de los polipéptidos mutantes aislados puede llevarse a cabo contactando el polipéptido CocE mutante aislado con (i) cocaína y un indicador de pH o (ii) un tio-derivado de cocaína y un indicador de tiol. A continuación se detecta cualquier cambio en el indicador de pH o el indicador de tiol. Tal cambio se correlaciona con la formación de ácido benzoico de la hidrólisis de cocaína o un derivado de cocaína por el polipéptido CocE mutante.

[0023] Tales incorporaciones del método de detección selectiva incluyen además conducir varios ciclos del procedimiento de detección selectiva a temperaturas incrementadas para medir la actividad esterasa. Por ejemplo, el primer ciclo puede emplear una temperatura para medir la actividad esterasa de alrededor de 30°C, mientras que un ciclo subsiguiente puede emplear una temperatura para medir la actividad esterasa de alrededor de 45°C.

[0024] En algunas incorporaciones del método de detección selectiva, la expresión de un polipéptido CocE mutante ocurre a una temperatura a la cual la CocE tipo silvestre conserva sustancialmente la actividad catalítica. En otras incorporaciones del método de detección selectiva, la expresión del polipéptido CocE mutante ocurre a una temperatura a la cual el polipéptido CocE tipo silvestre se divide sustancialmente en cuerpos de inclusión. Por ejemplo, la temperatura de expresión puede ser por lo menos alrededor de 35°C, por lo menos alrededor de 36°C, por lo menos alrededor de 37°C, por lo menos alrededor de 38°C, por lo menos alrededor de 39°C, o por lo menos alrededor de 40°C.

[0025] Otros objetos y características serán en parte evidente y en parte se destacarán en más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0026] Los expertos en el arte entenderán que los dibujos, descritos a continuación, son para fines ilustrativos únicamente. Los dibujos no tienen como finalidad limitar el ámbito de las presentes enseñanzas en modo alguno.

[0027] Figura 1 es un diagrama que ilustra el metabolismo de la cocaína por varias reacciones enzimáticas.

[0028] Figura 2 es un diagrama de cintas que ilustra la estructura de CocE. Se indican el dominio 1 (DOM1), el dominio 2 (DOM2) y el dominio 3 (DOM3), junto con el sitio activo localizado en la intersección de los tres dominios. En el sitio activo se muestra una molécula de ácido benzoico.

[0029] Figura 3 es un gráfico de curvas que describe el perfil de elución para CocE por FPLC (Q-Sepharose), en el que se muestra la absorbencia de UV y la concentración de cloruro de sodio con el transcurso del tiempo. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 1.

[0030] Figura 4 es un gráfico de curvas y diagrama de dispersión que muestra la degradación *in vitro* de cocaína en la presencia de CocE en plasma humano. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 2.

[0031] Figura 5 es una gráfico de la cinética enzimática Michaelis-Menten para la CocE tipo silvestre, la CocE mutante T172R (SEQ ID NO: 26), y la CocE mutante S159A (SEQ ID NO: 11) para reacciones llevadas a cabo a 30°C y 37°C. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 4.

[0032] Figura 6 es un conjunto de fotografías de la coloración total de proteína luego de la separación por PAGE (*polyacrylamide-gel electrophoresis*) de la CocE tipo silvestre y mutante T172R empleando condiciones desnaturalizantes (SDS+βMe) o no desnaturalizantes (Native) luego de la incubación a 37°C durante varios puntos de tiempo. Para mayor información, véase Ejemplo 4.

[0033] Figura 7 es un gráfico de curvas que describe el dicroísmo

27
40

circular determinado con temperaturas de fusión de CocE tipo silvestre y T172R. El espectro total se muestra en A, el espectro cercano a UV se muestra en B, y la temperatura de fusión estimada para cada mutante se muestra en C. Para mayor información, véase Ejemplo 4.

[0034] Figura 8 contiene (A) un dibujo de la hidrólisis del derivado benzoiltioéster de cocaína (tio-1) y la des-carbometoxi cocaína (tio-2) seguida por reacción de los tiols liberados (R-SH) con reactivo de Ellman; y (B) un gráfico de curvas que muestra la reacción colorimétrica de células BL21 de control y células BL21 que contienen CocE incubada con el derivado benzoiltioéster (tio-1) y reactivo de Ellman. Para mayor información, véase Ejemplo 15.

[0035] Figura 9 es un gráfico de curvas y diagrama de dispersión que muestra el efecto de 1.0 mg CocE (círculos cerrados) o PBS (vehículo, círculos abiertos) sobre la mortalidad inducida por cocaína cuando se administra un minuto después de dosis crecientes de cocaína (n = 6-7). Los datos presentados se expresan como porcentaje y su error estándar. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 5.

[0036] Figura 10 es un gráfico de barras que muestra el efecto de dosis crecientes de CocE (CE) o BChE humana (BChE), o PBS, sobre la mortalidad inducida por la cocaína cuando se administran un minuto antes 180 mg/kg cocaína (n = 6-7). Los datos presentados se expresan como porcentaje y su error estándar. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 5.

[0037] Figura 11 es un gráfico de barras que muestra el efecto de los mutantes de CocE S117A y Y44F, o CocE tratada con PMSF sobre las convulsiones inducidas por cocaína y la mortalidad cuando se administran 1 minuto antes 180 mg/kg de cocaína (n = 5-6). Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 5.

[0038] Figura 12 es un gráfico de barras que muestra el efecto de 1.0 mg CocE o PBS administrado un minuto después de los 560 mg/kg WIN-35065-2, la LD100 determinada del compuesto (n = 6-8). Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 5.

[0039] Figura 13 es un gráfico de curvas y un diagrama de dispersión que muestran la inactivación en función del tiempo de CocE (125 ng/ml) *in vitro*. El decrecimiento exponencial $t_{1/2}$ se calculó como 13.2. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 6.

[0040] Figura 14 es un gráfico de barras que muestra los efectos protectores en función del tiempo de 1 mg CocE cuando se administra varias veces antes y después de 100 mg/kg de cocaína (n = 6-8). Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 6.

[0041] Figura 15 es un gráfico de barras que muestra las concentraciones de cocaína en plasma humano tratado con 0.8 μ M de cocaína esteras o vehículo de esterasa en el minuto 0 y en el minuto 1 luego de la administración de esterasa. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 6.

[0042] Figura 16 es una serie de gráficos de curvas y diagramas de dispersión que muestran el efecto de 0.32 mg CocE (círculos cerrados), 0.32 mg de CocE mutante T172R (triángulos cerrados), o PBS (vehículo, círculos abiertos) sobre la mortalidad inducida por cocaína cuando se administra en el minuto 1 luego de dosis crecientes de cocaína (panel izquierdo) y minutos antes de la muerte luego de la administración de cocaína (panel derecho). Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 7.

[0043] Figura 17 es un gráfico de curvas y un diagrama de dispersión que muestran el efecto de 0.32 mg/kg de CocE (círculos cerrados) o CocE mutante T172R (triángulos cerrados) sobre la mortalidad inducida por cocaína cuando se administra en los minutos 1, 10, 30 y 60 antes de la administración de 320 mg/kg de cocaína (n=6). Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 7.

[0044] Figura 18 es una serie de gráficos de curvas y diagramas de dispersión que muestran el efecto de 1 mg de hBChE (triángulo cerrado), 0.32 mg de CocE (círculo cerrado), o 1 mg de CocE (rectángulo/cuadrado cerrado) sobre la mortalidad inducida por cocaína. Figura 18A muestra la mortalidad como una

función de la concentración de la cocaína. Figura 18B muestra los minutos hasta la muerte luego de la administración de cocaína como una función de la concentración de la cocaína. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 8.

[0045] Figura 19 es una trazado del espectro de masas MALDI-TOF de CocE pegilada. La diferencia de masa entre picos corresponde a -5500 Da; equivalentes al peso molecular de una sola cadena PEG. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 11.

[0046] Figura 20 es una imagen SEM de glóbulos rojos fijados con gluteraldehído. Figura 20A es RBC normales sin tratamiento. Figura 20B es un RBC de ruptura osmótica-resellado cargado con L-ASNasa. Figura 20C es RBC cargado con LMWP-ASNasa. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 12.

[0047] Figura 21 es un diagrama de dispersión que muestra la actividad porcentual de la asperaginasa en la sangre como una función del tiempo (días) para RBC/LMP-ASNasa o RBC Ghost/ASNasa. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 12.

[0048] Figura 22 es un gráfico de curvas que muestra la supervivencia de ratones DBA/2 que portan células de linfoma L5178Y. El día 5 se administró enzima o solución salina, momento en el cual los síntomas estaban presentes. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 12.

[0049] Figura 23 es un gráfico de curvas y diagramas de dispersión que demuestran los efectos protectores de CocE y sus mutantes contra la toxicidad inducida por la cocaína. La figura presenta el porcentaje de ratones que exhiben mortalidad inducida por la cocaína como una función de la concentración de cocaína inyectada en ratones a los que se administró CocE tipo silvestre (0.3 mg), T172R (0.3 mg), T172R-G173Q (0.3 mg), o L169K (1 mg). CocE o mutantes (mg) se administraron intravenosamente 1 minuto antes de la administración de cocaína (mg/kg, i.p.). Diferentes símbolos representan curvas de respuesta la dosis de mortalidad inducida por la cocaína en la ausencia o presencia de CocE o mutantes. Cada punto de datos representa el porcentaje de ratones (n=8 para

cada estado de dosificación) que exhiben mortalidad inducida por la cocaína.

[0050] Figura 24 es una serie de gráficos de líneas y diagramas de dispersión que presentan el transcurso del tiempo de los efectos protectores de CocE contra la toxicidad de la cocaína. CocE o mutantes (0.1, 0.3, y 1 mg, i.v.) se aplicaron en diferentes puntos de tiempo antes de la administración de 180 mg/kg de cocaína i.p. Figura 24A indica el porcentaje de ratones que presentaron mortalidad inducida por la cocaína como una función del tiempo de administración de CocE tipo silvestre (0.1 mg), T172R (0.1 mg), L169K (0.1 mg), o T172R-G173Q (0.1 mg) antes de la aplicación de 180 mg/kg de cocaína i.p. Figura 24B presenta el porcentaje de ratones que exhibieron mortalidad inducida por la cocaína como una función del tiempo de aplicación de CocE tipo silvestre (0.3 mg), T172R (0.3 mg), L169K (0.3 mg), o T172R-G173Q (0.1 mg) antes de la aplicación de 180 mg/kg de cocaína i.p.. Figura 24C indica el porcentaje de ratones que presentaron mortalidad inducida por la cocaína como una función del tiempo de aplicación de CocE tipo silvestre (1 mg), T172R (1 mg), L169K (1 mg), o T172R-G173Q (1 mg) antes de la administración de 180 mg/kg de cocaína i.p. Cada punto de datos representa el porcentaje de ratones (n=8 para cada condición de dosificación) que presentaron mortalidad inducida por la cocaína.

[0051] Figura 25 es un gráfico de curvas y diagrama de dispersión que demuestran la duración estimada de protección para el 50% de mortalidad. La figura presenta la duración estimada (horas) de protección (50% de mortalidad) de mutantes de CocE en ratones como una función de la dosificación (mg, i.v.) de T172R-G173Q, L169K, T172R y CocE tipo silvestre. El tiempo requerido en alcanzar el 50% de mortalidad se determinó a partir de la Figura 24.

[0052] Figura 26 es una serie de gráficos de curvas y diagramas de dispersión que demuestran los efectos protectores de CocE, T172R-G173Q y sus formas pegiladas contra la toxicidad inducida por la cocaína. Cada enzima (0.3 mg) se aplicó por vía intravenosa 1 minuto antes de la administración de cocaína (mg/kg, i.p.). Diferentes símbolos representan curvas de respuesta a la dosis de la mortalidad inducida por la cocaína en la ausencia o presencia de la enzima. Cada punto de datos representa el porcentaje de ratones (n=8 para cada condición de dosificación) que exhibieron mortalidad inducida por la cocaína. Figura 26A presenta la ocurrencia porcentual de mortalidad como una función de la

27A
44

dosificación de cocaína (mg/kg, i.p.) para vehículo/PBS, CocE tipo silvestre (0.3. mg), y PEG-CocE tipo silvestre (0.3 mg). Figura 26B presenta la ocurrencia porcentual de la mortalidad como una función de la dosificación de cocaína (mg/kg, i.p.) para vehículo/PBS, T172R-G173Q (0.3. mg) y PEG-T172R-G173Q (0.3. mg).

[0053] Figura 27 es una serie de gráficos de curvas y diagramas de dispersión que muestran la termoestabilidad de la cocaína esterasa y sus mutantes: (A) una CocE tipo silvestre, (B) T172R, (C) T272R/G173Q y L169K. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 17.

[0054] Figura 28 es una serie de cromatogramas que muestran enzimas preincubadas a 37°C durante 0 minutos o 60 minutos y resueltas por cromatografía de exclusión molecular ("**size exclusion chromatography**") (A) CocE tipo silvestre, (B) T172R, (C) T172R/G173Q. Estándares de peso molecular, BSA (66Kda) y AD (150Kda) se incluyen en A. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 18.

[0055]Figura 29 es una serie de espectros CD emparejados (alisados estadísticamente) de CocE tipo silvestre y cuatro mutantes, que muestran la fusión dependiente de la temperatura observada entre 200 y 250nm. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 19.

[0056]Figura 30 es una serie de espectros para CocE tipo silvestre y cuatro mutantes restaurados a 3 curvas ("**deconvoluted to 3 curves**") mediante el algoritmo CCA, que sugieren que la fusión de CocE es por lo menos un proceso de dos pasos que transcurre desde la curva original (curva 1) a un paso de desdoblamiento intermedio (curva 2) a una proteína completamente desnaturalizada (curva 3). Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 19.

[0057]Figura 31 es una serie de gráficos de curvas y diagramas de dispersión que muestran la contribución porcentual de cada temperatura en describir las 3 curvas CCA restauradas, mostradas en Figura 30. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 19.

28
45

[0058]Figura 32 es un gráficos de curvas y un diagrama de dispersión que muestra las temperaturas de fusión y formación para (1) las fusiones de espectros iniciales, (2) la formación y fusión del estado intermedio, y (3) la acumulación de la proteína completamente fundida. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 19.

[0059]Figura 33 es un es una fotografía de un gel que muestra que la cocaína (rango mM impidió la formación inducida por 37°C de agregados de CocE de alto peso molecular (concentraciones de enzima de 0.1mg/ml. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 20.

[0060]Figura 34 es un gráfico de curvas y un diagrama de dispersión que muestran que la cocaína (cantidades uM) estabilizó la pérdida de actividad inducida por 37°C. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 20.

[0061]Figura 35 es una fotografía de un gel que muestra que el ácido benzoico (rango mM impidió la formación inducida por 37°C de agregados de CocE de alto peso molecular (concentraciones de enzima 0.1mg/ml. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 20.

[0062]Figura 36 es un gráfico de curvas y un diagrama de dispersión que muestra que la cocaína (cantidades uM) estabilizó la pérdida de actividad inducida por 37°C. Para una mayor información sobre la metodología, véase Ejemplo 20.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0063]Las incorporaciones de la invención divulgadas en esta especificación proveen composiciones y métodos para una metodología de degradación catalítica a la terapéutica anti-cocaína. La tecnología descrita en esta especificación se basa en parte en el descubrimiento de mutantes de cocaína esterasa altamente eficientes, termoestables y de larga duración, que pueden proteger contra los efectos tóxicos y reforzantes de la cocaína en sujetos. Tales mutantes ofrecen opciones de tratamiento para afecciones inducidas por cocaína tales como sobredosis de cocaína y adicción a la cocaína.

46

POLIPÉPTIDOS COCE MUTANTES

[0064] A pesar de la potencia de la CocE tipo silvestre (véase a este respecto, SEQ ID NO: 1, No. de Acceso AF173165) en metabolizar cocaína (véase a este respecto, Ejemplo 2; Ejemplo 4; Ejemplo 5), la aplicación de CocE tipo silvestre como agente terapéutico en el tratamiento de sobredosis de cocaína puede limitarse debido a su baja estabilidad térmica a la temperatura fisiológica (véase a este respecto, Ejemplo 4; Ejemplo 6). La inestabilidad térmica contribuye a la corta vida media plasmática de la CocE tipo silvestre. La caída significativa (>50%) de la actividad de la CocE se observó luego de la incubación de la enzima en plasma a 37°C, o luego de su administración intravenosa a un ratón. El $t_{1/2}$ de la CocE a 37°C es de aproximadamente 15 minutos mientras que a 4°C el $t_{1/2}$ es superior a 6 meses. Estudios preliminares en ratas demostraron una duración relativamente corta del efecto anti-cocaína de poco más de 30 minutos para CocE.

[0065] En consecuencia, un aspecto de la invención provee polipéptidos CocE mutantes purificados, que exhiben estabilidad térmica y vida media plasmática incrementadas, comparados con la CocE tipo silvestre. Los polipéptidos CocE mutantes de la invención poseen un valor clínico significativo, debido a su capacidad de hidrolizar eficientemente la cocaína, exhibiendo al mismo tiempo una termoestabilidad y/o vida media plasmática incrementadas.

[0066] La invención provee polipéptidos CocE mutantes en los cuales se sustituye por lo menos un residuo de aminoácido de la CocE tipo silvestre, donde la CocE mutante tiene una termoestabilidad incrementada conservando al mismo tiempo una eficiencia catalítica relativamente alta. En algunas incorporaciones, los polipéptidos CocE mutantes mantienen sustancialmente la actividad esterasa funcional del polipéptido CocE tipo silvestre (es decir, hidrólisis de la cocaína). Los polipéptidos CocE mutantes tienen una secuencia peptídica que difiere de un polipéptido CocE nativo en uno o más aminoácidos. La secuencia peptídica de tales mutantes puede exhibir una sustitución, eliminación, o adición de uno o más aminoácidos de un polipéptido CocE nativo. Las inserciones de aminoácidos son preferiblemente de alrededor de 1, 2, 3, y 4 a 5 aminoácidos contiguos, y las eliminaciones son preferiblemente de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 a 10 aminoácidos contiguos. En varias incorporaciones, el polipéptido CocE mutante puede contener por lo menos una, dos, tres, cuatro, o

47

más sustituciones, eliminaciones, o adiciones de aminoácidos, donde el polipéptido CocE mutante resultante posee una termoestabilidad incrementada.

[0067] El término aminoácido, tal como se emplea en esta especificación, tiene como finalidad incluir aminoácidos de origen natural así como aminoácidos de origen no natural, incluidos análogos y derivados de aminoácidos. Los últimos incluyen moléculas que contienen una fracción de aminoácido. Una persona experta en el arte reconocerá que la referencia en esta especificación a un aminoácido incluye, por ejemplo, L-aminoácido proteógenos de origen natural; D-aminoácidos; aminoácidos químicamente modificados tales como análogos y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteógenos de origen natural, y compuestos químicamente sintetizados que tienen propiedades conocidas en el arte por ser características de los aminoácidos. Para todas las secuencias de aminoácidos divulgadas en esta especificación, se entiende que nucleótidos y aminoácidos equivalentes pueden sustituirse en las secuencias sin afectar la función de las secuencias. Tal sustitución está dentro de la capacidad de una persona de habilidad ordinaria en el arte.

[0068] La invención provee asimismo polipéptidos CocE mutantes purificados con las siguientes sustituciones: L163V (SEQ ID NO: 3); V121D (SEQ ID NO: 4); S167A (SEQ ID NO: 5); Q123E (SEQ ID NO: 6); V225I (SEQ ID NO: 7); I218L (SEQ ID NO: 8); A310D (SEQ ID NO: 9); A149S (SEQ ID NO: 10); S159A (SEQ ID NO: 11); S265A (SEQ ID NO: 12); S56G (SEQ ID NO: 13); W220A (SEQ ID NO: 14); T122A (SEQ ID NO: 15); S140A (SEQ ID NO: 16); F189L (SEQ ID NO: 17); A193D (SEQ ID NO: 18); T254R (SEQ ID NO: 19); N42V (SEQ ID NO: 20); V262L (SEQ ID NO: 21); L508G (SEQ ID NO: 22); Y152H (SEQ ID NO: 23); V160A (SEQ ID NO: 24); T172R (SEQ ID NO: 25); Y532F (SEQ ID NO: 26); T74S (SEQ ID NO: 27); W285T (SEQ ID NO: 28); L146P (SEQ ID NO: 29); D533S (SEQ ID NO: 30); A194R (SEQ ID NO: 31); G173Q (SEQ ID NO: 32); C477T (SEQ ID NO: 33); K531A (SEQ ID NO: 34); R41I (SEQ ID NO: 35); L119A (SEQ ID NO: 36); K46A (SEQ ID NO: 37); F84Y (SEQ ID NO: 38); T172R-G173Q (SEQ ID NO: 39); L169K (SEQ ID NO: 40); F189A (SEQ ID NO: 41); N197K (SEQ ID NO: 42); R182K (SEQ ID NO: 43); F189K (SEQ ID NO: 44); V190K (SEQ ID NO: 45); Q191K (SEQ ID NO: 46); y A194K (SEQ ID NO: 47). Por ejemplo, el polipéptido CocE mutante T172R (SEQ ID NO: 25) tiene una termoestabilidad incrementada, Vmax y Km incrementados a 37°C, temperatura de fusión incrementada (Tm), vida

media incrementada en el plasma, mayores reducciones en la mortalidad debida a la toxicidad de la cocaína, y efectos anti-cocaína más prolongados, comparados con la CocE tipo silvestre (véase a este respecto, Ejemplo 4, Ejemplo 7).

[0069] El incremento resultante en la termoestabilidad del polipéptido CocE mutante es por lo menos alrededor de 2 kcal/mol. La termoestabilidad de un polipéptido dado puede evaluarse por una variedad de métodos conocidos en el arte, incluidos por ejemplo espectroscopía de dicroísmo circular (CD) o calorimetría de barrido diferencial. Por ejemplo, el aumento resultante en la termoestabilidad puede ser por lo menos alrededor de 2.1, por lo menos alrededor de 2.2, por lo menos alrededor de 2.3, por lo menos alrededor de 2.4, por lo menos alrededor de 2.5, por lo menos alrededor de 2.6, por lo menos alrededor de 2.7, por lo menos alrededor de 2.8, por lo menos alrededor de 2.9, por lo menos alrededor de 3.0, por lo menos alrededor de 3.1, por lo menos alrededor de 3.2, por lo menos alrededor de 3.3, por lo menos alrededor de 3.4, por lo menos alrededor de 3.5, por lo menos alrededor de 3.6, por lo menos alrededor de 3.7, por lo menos alrededor de 3.8, por lo menos alrededor de 3.9, por lo menos alrededor de 4.0, por lo menos alrededor de 4.1, por lo menos alrededor de 4.2, por lo menos alrededor de 4.3, por lo menos alrededor de 4.4, o por lo menos alrededor de 4.5 kcal/mol. Se contemplan aumentos de la termoestabilidad aún mayores. Se cree que reducir la energía en alrededor de 2.1 a alrededor de 4.5 kcal/mol puede ampliar el tiempo de vida media de la proteína alrededor de 30 a alrededor de 1000 veces más a temperatura de la sala.

[0070] Generalmente, los polipéptidos CocE mutantes tienen una actividad esterasa con termoestabilidad incrementada, comparada con la CocE tipo silvestre. En algunas incorporaciones, los polipéptidos CocE mutantes termoestables pueden tener menos actividad esterasa que la CocE tipo silvestre. Por ejemplo, mutantes CocE termoestables pueden tener alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 65%, alrededor de 70%, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, o alrededor de 99% de la actividad esterasa de la CocE tipo silvestre. En otras incorporaciones, los polipéptidos CocE mutantes tienen aproximadamente la misma eficiencia catalítica, o mayor, de los polipéptidos CocE tipo silvestre. Por ejemplo, los mutantes de CocE termoestables pueden tener alrededor de 100%,

49

alrededor de 110%, alrededor de 120%, alrededor de 130%, alrededor de 140%, alrededor de 150%, o más de la actividad esterasa de la CocE tipo silvestre.

[0071] Variantes de los polipéptidos CocE mutantes tales como fragmentos, análogos y derivados se encuentran igualmente dentro de esta invención. Fragmentos del polipéptido CocE correspondientes a uno o más motivos y/o dominios particulares o a tamaños arbitrarios, por ejemplo, por lo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1150 y 1200 aminoácidos de longitud pretenden quedar dentro del ámbito de la invención divulgada en esta especificación. Porciones peptídico aisladas de polipéptidos CocE pueden obtenerse detectando selectivamente péptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica tales péptidos. Adicionalmente, fragmentos pueden sintetizarse químicamente empleando técnicas conocidas en el arte, tales como química f-Moc o t-Boc de fase sólida Merrifield convencional. Por ejemplo, un polipéptido CocE, como se describe en esta especificación, puede dividirse arbitrariamente en fragmentos de longitud deseada sin traslapamiento de los fragmentos, o dividirse preferiblemente en fragmentos traslapantes de una longitud deseada.

[0072] Otro aspecto de la invención divulgada en esta especificación concierne a formas recombinantes del polipéptido CocE. En algunas incorporaciones, moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención incluyen aquellos polinucleótidos que codifican los polipéptidos CocE descritos anteriormente. En otras incorporaciones, los polipéptidos recombinantes de la invención divulgados en esta especificación se codifican por un ácido nucleico que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99%) con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2, donde el polipéptido CocE recombinante expresado conserva sustancialmente la misma eficiencia catalítica, o mayor, del polipéptido CocE tipo silvestre y tiene una termoestabilidad incrementada, comparada con la CocE tipo silvestre.

[0073] Pueden utilizarse asimismo en la invención ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de alta restricción a los ácidos nucleicos de SEQ

2/11
70

ID NO: 2 o los complementos de SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, aquellos ácidos nucleicos que se hibridan a SEQ ID NO: 2 o al complemento de SEQ ID NO: 2 bajo condiciones de baja restricción, condiciones de restricción moderada, o condiciones de alta restricción y codifican además un polipéptido CocE mutante, que tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada, comparada con CocE tipo silvestre, se encuentran dentro de la invención. Ácidos nucleicos preferidos son aquellos que tienen una secuencia de nucleótidos que es el complemento de la totalidad o una porción de SEQ ID NO: 2. Otras variantes del gen CocE nativo dentro de la invención son polinucleótidos que comparten por lo menos 65% (por ejemplo, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99%) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 o el complemento de SEQ ID NO: 2. Ácidos nucleicos que se hibridizan bajo condiciones de restricción a, o comparten por lo menos 65% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 o el complemento de SEQ ID NO: 2, pueden obtenerse por técnicas conocidas en el arte tales como introduciendo mutaciones en el gen CocE nativo, o mediante aislamiento de un organismo que expresa tal ácido nucleico (por ejemplo, una variante alélica).

[0074] Moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión CocE mutantes se encuentran igualmente dentro de la invención. Tales ácidos nucleicos pueden elaborarse preparando un constructo (por ejemplo, un vector de expresión) que exprese la proteína de fusión CocE mutante cuando se introduzca en un hospedero apropiado. Por ejemplo, tal a constructo puede hacerse ligando un primer polinucleótido que codifica la proteína CocE mutante fusionada sin alteración en el marco de lectura ("*in frame*") con un segundo polinucleótido que codifica otra proteína de tal modo que la expresión del constructo en un sistema de expresión adecuado produzca una proteína de fusión.

[0075] Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden modificarse en una fracción base, fracción azúcar, o el esqueleto fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación, y similares. Las moléculas de ácido nucleico utilizadas en incorporaciones de la invención divulgada en esta especificación pueden estar en la forma de ARN o en la forma de ADN (por ejemplo, ADNc, ADN genómico y ADN sintético). El ADN puede ser bicatenario o monocatenario y, si monocatenario, puede ser la hebra codificante

Handwritten signature and the number 57.

(transcrita) o la hebra no codificante (complementaria). La secuencia codificante que codifica un polipéptido CocE mutante puede ser idéntica a la secuencia nucleotídica reivindicada, o puede ser también una secuencia codificante diferente que, como resultado de la redundancia o información repetida del código genético, codifica el mismo polipéptido que los polinucleótidos de SEQ ID NOS: 3-37.

DISEÑO DE COCE MUTANTE

[0076] Mutaciones termoestabilizadoras de CocE pueden diseñarse o bien para aumentar la estabilidad termodinámica de un polipéptido disminuyendo ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado) o disminuir la tasa de desdoblamiento incrementando la energía libre de activación del proceso de desdoblamiento. La ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado) es la diferencia de energía libre entre el estado desdoblado y el estado plegado. Para un polipéptido termodinámicamente estable, ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado) debe ser un valor negativo. Generalmente, entre menor sea el valor ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado), más estable es el estado plegado. Tal energía libre de activación del proceso de desdoblamiento es la diferencia de energía libre entre el estado plegado y el estado de transición del desdoblamiento (Steipe, 1999).

[0077] Polipéptidos CocE mutantes con termoestabilidad incrementada pueden diseñarse y generarse por una variedad de métodos conocidos en el arte incluidos, por ejemplo, diseño racional, evolución dirigida (por ejemplo, mutagénesis aleatoria, mutagénesis del organismo hospedero de CocE), o una combinación de las mismas. La evolución dirigida puede lograrse mediante mutación y recombinación, seguidas por detección sistemática del rasgo deseado o aplicando una presión selectiva para obtener el rasgo de interés (véase a este respecto, Lehmann and Wyss, 2001). La mutagénesis puede llevarse a cabo en el gen específico de interés o mediante mutagénesis y selección de un organismo hospedero, de modo que la propiedad obtenida por técnicas de ingeniería se confiere a la proteína de interés. Preferiblemente, la termoestabilidad de los mutantes CocE se manipula por técnicas de ingeniería mediante una estrategia enfoque triple ("***through a three-prong approach***") de (i) diseño racional mediante mutagénesis dirigida al sitio, asistida por computador (véase a este respecto, Ejemplo 3; Ejemplo 4), (ii) mutagénesis aleatorio del gen CocE y detección selectiva de gran productividad (véase a este respecto, Ejemplo 4;

Ejemplo 15); y (iii) mutagénesis del organismo hospedero de CocE, seguida por selección genética (véase a este respecto, Ejemplo 14).

[0078] Varios conceptos de diseño racional son conocidos por las personas de habilidad en el arte para reducir ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado) y/o aumentar la energía libre de activación del proceso de desdoblamiento (véase a este respecto, Lehmann, 2001). Por ejemplo, se puede: disminuir la entropía del estado desdoblado introduciendo puentes adicionales disulfuro o mediante mutaciones X $\rightarrow$ Pro; aumentar una propensión α -hélice mediante sustituciones Gly $\rightarrow$ Ala o mediante estabilización de macrodipolos α -hélice; mejorar las interacciones electrostáticas entre residuos de superficie cargada introduciendo puentes sal adicionales o incluso redes de sal-puente, o mediante mutaciones termoestabilizadoras basadas en cálculos de potenciales electrostáticos.

[0079] Modelamiento molecular, basado en simulaciones de dinámica molecular apropiada (MD - *molecular dynamics*), puede guiar racionalmente la mutagénesis dirigida al sitio con el fin de diseñar polipéptidos CocE mutantes dotados de termoestabilidad creciente. La simulación MD clásica permite el estudio de la evolución en el tiempo de un sistema grande tomando muchos pequeños pasos de tiempo sucesivos pequeños bajo fuerzas atómicas determinadas por un conjunto de funciones de interacción parametrizadas (campo de fuerza), incluidas interacciones enlazadas (enlaces, ángulos, y ángulos diédricos), interacciones no enlazadas de van der Waals, e interacciones electrostáticas basadas o cargas atómicas netas. Debido a la forma simple de campo de fuerza, la simulación MD puede llevarse a cabo durante un tiempo de simulación suficientemente prolongado para producir propiedades significativas promediadas por el ensamble, incluso para un sistema muy grande que incluya más de cien mil átomos. En consecuencia, para CocE y cada mutante propuesto, la simulación MD puede llevar a una estructura 3D promediada dinámicamente, razonable, del polipéptido simulado en agua.

[0080] Una estrategia usada exitosamente en esta especificación se centra en el diseño racional de mutaciones termoestabilizadoras que disminuyen el valor ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado) del polipéptido (véase a este respecto, Ejemplo 3). Tal estrategia requiere únicamente el cálculo de ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado), sin realizar un cómputo más dispendioso en la estructura y la energética

270
B

del estado de transición del desdoblamiento. Por lo tanto, para aumentar la termoestabilidad de un polipéptido antes de la pegilación, se puede emplear un método implementado en un programa de diseño racional (por ejemplo, RosettaDesign) que utiliza una función de energía para evaluar adaptabilidad de una secuencia particular para un pliegue dado y un algoritmo de búsqueda Monte Carlo para muestrear el espacio de la secuencia. Tal estrategia es conocida por producir una termoestabilidad incrementada de otras enzimas sin reducción en la eficiencia catalítica (véase a este respecto, Korkegian, 2005). Por ejemplo, el pliegue usado en el cómputo puede corresponder al de la estructura cristalina de rayos X de la CocE disponible.

[0081] El programa de diseño racional permite la predicción de un conjunto de secuencias de aminoácidos modificadas, que potencialmente poseen energías más bajas (por ejemplo, valores ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado)) y, por lo tanto, una mayor termoestabilidad. En consecuencia, se puede usar el diseño computacional descrito en esta especificación para predecir mutaciones en el núcleo del polipéptido CocE, que puedan llevar a la termoestabilización del polipéptido sin pérdida de la eficiencia catalítica. Esta estrategia minimiza el tiempo de prueba experimental y aumenta en gran medida el éxito de los resultados experimentales. Las mutaciones termoestabilizadoras predichas pueden examinarse individualmente por mutagénesis dirigida al sitio y luego en combinación, en un proceso iterativo (véase, por ejemplo, Ejemplo 15).

[0082] Puede usarse asimismo evolución dirigida para generar mutantes CocE termoestables. La evolución dirigida abarca una serie de técnicas experimentales que producen una diversidad y adaptación aceleradas mediante mutación y recombinación, seguidas o bien por detección selectiva del rasgo deseado o bien aplicando una presión selectiva para obtener el rasgo de interés (Lehmann & Wyss (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12, 371-375). Por consiguiente, la evolución dirigida involucra tanto un proceso para generar diversidad y una detección selectiva eficiente o método de selección para la detección o enriquecimiento del rasgo deseado. La evolución dirigida se ha aplicado previamente en forma exitosa a la producción de proteínas termoestables, y la generación de diversidad se ha alcanzado, por ejemplo mediante PCR propensa a error, mutagénesis de saturación, barajado de ADN, mutagénesis química, y combinaciones de las mismas. La PCR propensa a error

54

amplifica el gen de interés con polimerasas no a prueba de lectura y condiciones estresantes, diseñadas para generar aleatoriamente mutaciones de par de bases únicas. Luego de cada ronda se seleccionan los mejores mutantes y se usan como secuencias progenitoras en la siguiente ronda de mutagénesis. Esta técnica se ha utilizado para generar un número de variantes de proteínas termoestables, incluida propil endopeptidasa (Uchiyama ma., et al. 2000), betaglucuronidasa (Flores, H. and A. D. Ellington (2002) Journal of Molecular Biology 315, 325-337) y la familia de 10 xilanasas (Andrews et al. (2004) J Biol Chem 279, 54369-79). La mutagénesis de saturación amplifica también el gen de interés, pero incorpora bases universales durante la amplificación para generar un número mucho más alto de mutaciones. Esta técnica se ha utilizado para generar termoestabilidad en una enzima psicrófila (Miyazaki et al. (2000) Journal of Molecular Biology 297, 1015-1026). El barajado de ADN implica uno o más ciclos de recombinación entre un conjunto de secuencias homólogas para obtener variantes mejoradas de una enzima dada. Esta técnica puede usarse igualmente en tándem con PCR propensa a error, donde los mejores mutantes obtenidos por PCR propensa a error se combinan mediante barajado de ADN para generar un nuevo subconjunto de mutantes. El barajado de ADN se ha implementado para generar variantes termoestables de beta-glucuronidasa (Flores, H. and A.D. Ellington (2002) Journal of Molecular Biology 315, 325-337). La mutagénesis química implica tratar el ADN de un plásmido con químicos que introducen mutaciones puntuales en la secuencia tales como hidroxilamina, nitrosaminas o sulfato de dimetilo. El tratamiento del plásmido con hidroxilamina se ha usado para generar mutantes termoestables de la beta-glucosidasa A del *Bacillus polymyxa* (Lopez-Camacho et al. (1996) Biochemistry Journal 314, 833-838) y luciferasa de luciérnaga (White et al. (1996) Biochemistry Journal 319 (Pt 2), 343-350).

[0083] La mutagénesis del organismo hospedero de CocE puede emplearse igualmente para generar mutantes CocE termoestables. Un método sencillo y rápido para la producción de mutantes CocE termoestables puede conseguirse utilizando la capacidad de la enzima para conferir metabolismo de cocaína como una fuente exclusiva de carbono a su organismo hospedero. El gen CocE se secuenció originalmente de *Rhodococcus* MB1 subclonando fragmentos del gen en *Rhodococcus erythropolis* CW25, una bacteria incapaz de metabolizar cocaína, pero capaz de crecer en los subproductos de cocaína esterasa ecgonina metil éster y benzoato (Bresler et al. (2000) Applied & Environmental Microbiology

66, 904-908). Otro organismo que demostró previamente metabolizar subproductos de cocaína es *Pseudomonas fluorescens* (MBER), que fue capaz de crecer en una relación simbiótica con otra bacteria capaz de metabolizar cocaína mediante la esterasa *Comamonas acidovorans* (MBLF).

[0084] Aunque difíciles de transformar con plásmidos con eficiencias incrementadas, estas cepas bacterianas pueden transformarse en forma relativamente fácil con el gen CocE tipo silvestre clonado en vectores lanzadera apropiados y, luego, puede realizarse mutagénesis bacteriana tradicional (véase a este respecto, Ejemplo 14). Debido a que estas bacterias, normalmente, sólo crecen a 25-30°C en productos de hidrólisis de la cocaína, la selección de mutantes capaces de metabolizar cocaína eficientemente a 37°C se esperaría seleccionar mutantes CocE altamente activos que son estables a 37°C.

[0085] La exposición de bacterias a radiación o agentes químicos para la producción de mutantes que portan nuevos fenotipos es bien conocida en el arte (véase a este respecto, Maron, D.M. and Ames, BN (1983) *Mutation Research* 113, 173-215). La mutagénesis por irradiación puede implicar tanto radiación ionizante como no ionizante; no obstante, la radiación no ionizante se usa ampliamente, y la radiación con UV a 260nm es la más efectiva como agente letal. La mutagénesis se causa por la inducción de dímeros de pirimidina, aumentando la probabilidad de incorporar errores de coincidencia ("**mismatches**") durante la replicación. Las células se exponen a radiación con UV en una dosis predeterminada para eliminar 90-95% de la población celular, y luego se buscan mutantes entre los sobrevivientes. La mutagénesis química incluye el uso de análogos de base tales como 5-bromouracilo y 2-aminopurina que aumentan el error de copia durante la replicación, o el uso de agentes que reaccionan directamente con ADN tales como hidroxilamina o nitrosoguanidina, las cuales inducen mutaciones con una frecuencia mayor que los análogos de base.

GENERACIÓN DE POLIPÉPTIDOS COCE MUTANTES

[0086] Incorporaciones de la invención atañen además a métodos de producir los polipéptidos CocE mutantes. Por ejemplo, una célula hospedera, transfectada con un vector de ácido nucleico que dirige la expresión de una

56

secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos CocE mutantes, puede cultivarse bajo condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del péptido. Las células pueden recolectarse, lisarse y aislarse la proteína. Un polipéptido CocE mutante puede aislarse de células hospederas empleando técnicas conocidas en el arte para purificar proteínas, incluidas cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, y purificación por inmunoadfinidad con anticuerpos específicos de tal proteína (véase a este respecto, Ejemplo 1).

[0087] Por ejemplo, luego que un polipéptido CocE mutante se ha expresado en una célula, puede aislarse usando cualquier cromatografía de inmunoadfinidad. Más específicamente, un anticuerpo anti-CocE puede inmovilizarse en una matriz de cromatografía de columna, y la matriz puede usarse para cromatografía de inmunoadfinidad para purificar el polipéptido CocE mutante de lisados de células por métodos estándar (véase, por ejemplo, Sambrook and Russel (2006) *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0879697717). Luego de la cromatografía de inmunoadfinidad, el polipéptido CocE mutante puede purificarse posteriormente por otras técnicas estándar, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento. En otra incorporación, un polipéptido CocE mutante se expresa en una proteína de fusión que contiene una marca de afinidad (por ejemplo, Hisx6) que facilita su purificación (véase a este respecto, Ejemplo 1).

PEGILACIÓN DE POLIPÉPTIDOS COCE MUTANTES

[0088] La CocE mutante puede pegilarse con el fin de aumentar la duración de la acción y la estabilidad al calor, y disminuir la inmunogenicidad. La pegilación puede aumentar aún más la termoestabilidad de la CocE mutante de la invención e incrementar la vida media sérica disminuyendo la depuración real, la proteólisis, la captura de macrófagos y la respuesta inmunológica.

[0089] La pegilación es el proceso de unir unidades repetitivas de etilen glicol (es decir, polietilen glicol, o PEG) a un polipéptido para reducir la inmunogenicidad del polipéptido y su tasa de depuración renal (véase generalmente (Veronese, FM and Harris, JM (2002b) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 457-606, Veronese, FM and Harris, JM (2002c) *Advanced Drug*

50
5X

Delivery Reviews 55, 1259-1345, reviewing PEGylation technology). Cada unidad de etilen glicol puede unirse a dos o más moléculas de agua, lo cual aumenta efectivamente el tamaño del péptido, y puede proteger el péptido contra respuestas inmunitarias, degradación enzimática, y/o depuración renal rápida. El polietilen glicol puede estabilizar también contra variaciones en temperatura y pH. El resultado neto es que el polipéptido terapéutico puede mantenerse durante más tiempo en la sangre, e induce una respuesta inmunitaria menor (Harris, JM and Chess, RB (2003) Nature Reviews. Drug Discovery 2, 214-221). El PEG posee un conjunto único de propiedades, incluidas ausencia de toxicidad, antigenicidad e inmunogenicidad, una disminución, dependiente de la masa, de la depuración renal, y una alta flexibilidad y solubilidad en agua. El PEG imparte estas características a las proteínas a las cuales se enlaza (Veronese, FM and Harris, JM (2002b) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 457-606).

[0090] Un polímero PEG puede activarse primeramente con un grupo funcional que estimula la unión covalente a un aminoácido de la proteína. El grupo hidroxilo terminal del PEG puede modificarse por un carbonato activo, un éster activo, aldehído o derivado de tresilato. El PEG puede unirse a lisinas o a residuos introducidos de cisteína del a CocE mutante. Unidades repetitivas de óxido de etileno pueden construirse en muchas configuraciones con longitudes diferentes, con o sin ramificación, y con varios pesos moleculares. Medios de incorporación pueden incluir mutagénesis dirigida al sitio o el uso de derivados maleimida de transglutaminasa.

[0091] El PEG cuenta con la aprobación de la FDA para uso como vehículo o base en Productos Farmacéuticos, incluidas formulaciones inyectables, tópicas, rectales y nasales (Harris and Chess, 2003). Además, se han aprobado medicamentos PEGilados para uso clínico (véase a este respecto, PEG-interferón alpha-2a (Hamidi, M and Tajerzadeh, H (2003) Drug Delivery 10, 9-20; PEG-interferón alpha-2b (Reddy et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 571-586).

[0092] Debido a la movilidad dinámica espacial sin paralelo del PEG, la modificación de la superficie de una CocE mutante por el polímero PEG puede blindar la enzima recubierta de acciones efectuadas por las enzimas proteolíticas y el reconocimiento por el sistema inmunitario; reduciendo en esa forma la

41
58

inmunogenicidad y prolongando la vida media en circulación de la CocE mutante pegilada. El éxito de las estrategias de pegilación incluyen liposomas modificados con PEG (es decir, liposomas furtivos, así llamados debido a su capacidad de eludir la detección inmunitaria y la depuración renal para proporcionar un tiempo de circulación significativamente ampliado (Lasic, DD (1997) *Journal of Controlled Release* 48, 203-222), así como asparaginasa pegilada, cuya vida media *in vivo* se ha mejorado drásticamente desde las 26 horas observadas para la asparaginasa libre hasta 15 días (Avramis et al. (2002) *Blood* 99, 1986-1994). Además, se reconoce en el arte que la pegilación puede mejorar significativamente la estabilidad térmica de una enzima (Kazan, D. and Erarslan, A. (1997) *Applied Biochemistry & Biotechnology* 62, 1-13; Efremova et al. (1998) *Biochemistry (Moscow)* 63, 441-447) y reducir la activación del sistema de complemento (Chang et al. (2005) *Bioconjugate Chemistry* 16, 147-155). En consecuencia, la tecnología de la PEGilación es bien adecuada para mejorar los efectos farmacológicos y farmacéuticos de la CocE mutante de la invención (véase a este respecto, Ejemplo 11). La pegilación de CocE mutante puede usarse igualmente en conjunción con encapsulación en RBC.

ENCAPSULACIÓN DE COCE MUTANTE EN RBC

[0093] La CocE mutante puede encapsularse en glóbulos rojos (RBC) con el fin de aumentar la duración de la acción y la estabilidad al calor, y disminuir la inmunogenicidad. La cocaína, justamente a medida que atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica, transita también rápidamente la membrana plasmática del RCB, y esta captura se ha demostrado en un estudio de administración de cocaína intravenosa en el hombre (Javaid et al. (1978) *Journal of Chromatography* 15, 105-113). Además, las concentraciones de cocaína en RBC excedieron las concentraciones en el plasma (Javaid et al. (1978) *Journal of Chromatography* 15, 105-113). Como tal, la encapsulación en RBC puede utilizarse para blindar formas termoestables de CocE contra la depuración.

[0094] Los eritrocitos se han aprovechado extensivamente por sus potenciales aplicaciones como sustancias portadoras de medicamentos (Wang et al. (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 547-570). Siendo las células más abundantes del cuerpo humano, el RBC ofrece ventajas sin precedentes para funcionar como sustancia portadora de medicamentos. En primer lugar, los

28
59

eritrocitos son completamente biocompatibles y biodegradables, particularmente cuando se utilizan células autólogas para carga de medicamentos. Además, la forma de disco bicóncavo de los eritrocitos los dota con la máxima relación de superficie a volumen (1.9×10^4 cm/g) (Guyton, AG & Hall, JE (1996) Textbook of Medical Physiology, 425-433) utilizable para encapsulación de medicamentos. De igual forma la encapsulación en RBC evita que el medicamento cargado se inactive por factores endógenos, así como protege los organismos de los efectos tóxicos del medicamento encapsulado (Wang et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). Más aún, la encapsulación en RBC permite evitar respuestas inmunitarias indeseables (es decir, antigenicidad e inmunogenicidad) que pueden desencadenarse por cuerpos extraños (Wang et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 547-570). Adicionalmente, los eritrocitos poseen una vida media en circulación más prolongada en comparación con otras sustancias portadoras sintéticas. Por ejemplo, se informa que la expectativa de vida normal de un eritrocito en la circulación sistémica es de alrededor de 120 días (Guyton, AG & Hall, JE (1996) Textbook of Medical Physiology, 425-433).

[0095] La encapsulación de CocE mutante en eritrocitos puede realizarse de acuerdo con varias técnicas conocidas en el arte, incluidas electroporación, endocitosis inducida (por ejemplo, por primaquina) del medicamento, y ósmosis (véase a este respecto, Green, R. and Widder, KJ (1987) Methods In Enzymology, Vol. 149). Estos métodos pueden incluir dilatar y romper la membrana celular, liberar el contenido interior incluyendo principalmente hemoglobina y el citoesqueleto, atrapar el medicamento y luego volver a sellar la membrana para producir el RBC en forma de copa, esférico, de color rosado o blanco (denominado generalmente "RBC-Ghost").

[0096] Alternativamente, pueden empelarse péptidos que penetran la membrana para encapsular CocE mutante en eritrocitos (véase a este respecto, Ejemplo 12). Péptidos que penetran la membrana, o péptidos de dominio de transducción de la proteína (PTD - *protein transduction domain*) son una familia de péptidos pequeños (que consisten normalmente de residuos de 10-15 aminoácidos) incluidos TAT, LMWP, y otros péptidos catiónicos ricos en arginina (véase generalmente, Dietz, GPH and Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131). Se sabe en el arte que, enlazando covalentemente PTD a casi cualquier tipo de especie molecular, incluidas proteínas (MW>150 kDa;

47
60

ya se han probado más de 60 diferentes proteínas (Dietz, GPH and Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131) y nano-portadores (por ejemplo, liposomas), PTD puede transbordar la especie enlazada a través de la membrana celular de todos los tipos de órganos, incluido el cerebro (Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572). PTD no es tóxico ni inmunógeno (Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572), y la internalización de células mediada por PTD no induce perturbación o alteración de la membrana celular de los eritrocitos (Suzuki et al. (2002) Journal of Biological Chemistry 25, 2437-2443). El PTD se ha utilizado con éxito en cargar RBC con proteínas, y resulta en eritrocitos con atributos físicos y químicos inalterados (véase a este respecto, Li et al. (2003) American Pharmaceutical Review 6, 22-26). En consecuencia, la conjugación del péptido PTD a CocE mutante puede facilitar la encapsulación de RBC. La encapsulación de RBC puede llevarse igualmente a cabo usando CocE mutante pegilada.

ESTABILIZACIÓN DE COCE MUTANTE

[0097] Otro aspecto de la invención se dirige a la estabilización de polipéptidos CocE mutantes usando sustratos, productos, y/o inhibidores de cocaína. Sustratos y productos útiles en incorporaciones divulgadas en esta especificación incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, cocaína; derivados de cocaína, tales como, por ejemplo, (-)-cocaína, (+)-cocaína, tropo cocaína, y similares; derivados de tio- cocaína, tales como, por ejemplo, Tiol-1, Tiol-2, y similares; derivados de amida-cocaína; derivados de provitamina-cocaína, tales como cocaína PABA, cocaína de niacina, y similares; ácido benzoico; 4-nitrofenil acetato (4NPA); 4-nitrofenol (4NP); y similares. Inhibidores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, análogos de sustrato, tales como, fosfo-fluorococaína, O-fosfo-cocaína, O-metilfosfococaína, S-metilfosfococaína, y similares; análogos de producto, tales como, ecgonina y derivados de ecgonina, tales como, análogo de ecgonina metil éster de ácido bórico; ácido fenilbórico; derivados de ácido benzoico, tales como, ácido 4-terc-butil benzoico, ácido 1-naftoico, metil éster de ácido 2,3,4-trimetil-benzoico, y similares. Químicos adicionales incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, SDS, glicerol, PEG, y similares.

[0098] Preferiblemente, los sustratos, productos, y/o inhibidores estabilizan la desnaturalización térmica de los polipéptidos divulgados en esta especificación. En algunas incorporaciones, los sustratos, productos y/o

inhibidores impiden también la agregación inducida térmicamente en electroforesis en gel. Generalmente, el uso de un sustrato, producto, y/o inhibidor resulta en por lo menos alrededor de un incremento del 10% en la estabilidad y/o inhibición, respectivamente. Por ejemplo el aumento puede ser de alrededor de 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 120%, 150%, 200%, 300%, o incluso 500% o mayor. Por consiguiente, sustratos, productos, y/o inhibidores son bien apropiados para estabilizar los polipéptidos CocE mutantes divulgados en esta especificación (véase a este respecto, Ejemplo 20).

[0099] En una incorporación, se utilizan moléculas pequeñas para termoestabilizar los polipéptidos CocE mutantes divulgados en esta especificación. En una incorporación preferida, tales moléculas no ocupan el sitio activo del polipéptido.

[0100] En algunas incorporaciones, los polipéptidos divulgados en esta especificación pueden co-infusionarse con una molécula estabilizadora. En otras incorporaciones, las moléculas estabilizadoras pueden usarse para estabilizar el polipéptido durante la elaboración. En todavía otras incorporaciones, las moléculas estabilizadoras pueden emplearse para estabilizar los polipéptidos CocE mutantes hasta que estén listos para uso.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

[0101] Otro aspecto de la invención se dirige a un enfoque, de degradación catalítica, a terapéuticos anti-cocaína. Se proveen tratamientos, tanto profilácticos como terapéuticos, de afecciones inducidas por la cocaína mediante la administración de polipéptidos CocE mutantes, termoestables, esterasa activos, a un sujeto necesitado de ello. Las variantes de cocaína esterasa de la invención poseen un valor clínico significativo debido a su termoestabilidad incrementada y vida media plasmática más prolongada, que la CocE de origen natural conocida. Es este aumento en la termoestabilidad y la vida media plasmática lo que permite una respuesta mucho más rápido a los síntomas mortales de la toxicidad de la cocaína que distinguen las variantes CocE de la invención de otras opciones de tratamiento.

Handwritten signature and the number 62.

[0102]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. Las afecciones inducidas por la cocaína incluyen, pero no se limitan a, sobredosis de cocaína, toxicidad de la cocaína y dependencia de la cocaína y/o adicción. Por ejemplo, el diagnóstico de la toxicidad de la cocaína puede incluir convulsiones, convulsiones tonicoclónicas 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, 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, inducido por la cocaína, un indicio de afección inducida por la cocaína, y sujetos que han sido tratados, están siendo tratados, o serán tratados por una afección inducida por la cocaína. Preferiblemente, el sujeto es un animal, incluidos, pero no limitados a, mamíferos, reptiles, y aves, más preferiblemente caballos, vacas, perros, gatos, ovejas, cerdos, y gallinas y, muy preferiblemente, un humano.

[0103]Una cantidad efectiva de los polipéptidos CocE mutantes descritos 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 biológicos, o indicadores metabólicos. Cuando se usa en los métodos de la invención, una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido CocE mutante descrito 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, los polipéptidos CocE mutantes de la invención 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.

[0104]La toxicidad y eficacia terapéutica de los polipéptidos CocE mutantes 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 ED_{50} , (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico que puede expresarse como la relación LD_{50}/ED_{50} , prefiriéndose índices terapéuticos elevados.

[0105]La cantidad de polipéptido CocE mutante que puede combinarse con una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable para producir una presentación farmacéutica única variará dependiendo del hospedero tratado y del modo 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 del agente puede ocurrir como un episodio único o durante el tiempo de ciclo de tratamiento. Por ejemplo, un agente 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.

[0106]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 vida media 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 a este respecto, 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 del polipéptido CocE mutante para uso en incorporaciones de la invención, divulgada en esta especificación, se decidirá por el médico especialista dentro del ámbito de un juicio

médico acertado.

[0107] Los polipéptidos CocE mutantes descritos 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 en afecciones particulares inducidas por la cocaína.

[0108] Los polipéptidos CocE mutantes descritos en esta especificación pueden formularse en cualquier manera convencional usando una o más sustancias portadoras farmacéuticamente aceptables y/o excipientes (véase a este respecto, Gennaro (2005) Remington the Science and Practice of Pharmacy 21st ed. Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781746736). Tales formulaciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido CocE mutante, 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. Los polipéptidos CocE mutantes de uso con la actual invención 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. El polipéptido CocE mutante puede administrarse además en combinación con uno o más agentes adicionales divulgados en esta especificación y/o junto con otros agentes inertes, 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.

[0109] Los polipéptidos CocE mutantes descritos en esta especificación pueden administrarse parenteralmente, incluidas las inyecciones intravenosas, intramusculares, subcutáneas e intraperitoneales. Excipientes usados comúnmente en la aplicación parenteral de moléculas pequeñas de medicamentos, incluidos potenciadores de solubilidad, agentes osmóticos, soluciones amortiguadoras y preservantes, pueden incluirse igualmente en formulaciones de biomoléculas. La inclusión de agentes de anti-agregación y anti-

65

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. El polipéptido CocE mutante puede liofilizarse para impartirle estabilidad adicional durante el almacenamiento, y re-procesarse antes de la administración parenteral.

[0110] Preferiblemente, el polipéptido CocE mutante se pegila, proporcionando en esta forma una estabilidad incrementada y una inmunogenicidad disminuía (véase más arriba).

[0111] La aplicación pulmonar de macromoléculas, tales como polipéptidos CocE mutantes, permite una administración no invasiva, relativamente fácil, al sistema circulatorio para distribución sistémica (véase a este respecto, Cryan (2004) AAPS J. 7(1) article 4, E20-41, que ofrece una revisión de la tecnología de aplicación pulmonar). Las ventajas de la aplicación pulmonar incluyen no-invasividad, un área superficial grande para absorción ($\sim 75 \text{ m}^2$), epitelio alveolar delgado (~ 0.1 a $0.5 \text{ }\mu\text{m}$) que permite una rápida absorción, ausencia de metabolismo de primer paso, actividad proteolítica disminuía, iniciación rápida de la acción y alta biodisponibilidad. Varios dispositivos de aplicación por inhalación, tales como inhaladores de dosis medida, nebulizadores e inhaladores de polvo seco, que pueden usarse para aplicar las biomoléculas descritas en esta especificación son conocidos en el arte (por ejemplo, AERx (Aradigm, CA); Respimat (Boehringer, Alemania); AeroDose (Aerogen Inc., CA)). Los dispositivos de inhalación de polvo seco son particularmente preferidos para aplicación pulmonar de agentes a base de proteínas (por ejemplo, Spinhaler (Fisons Pharmaceuticals, NY); Rotohaler (GSK, NC); Diskhaler (GSK, NC); Spiros (Dura Pharmaceuticals, CA); Nektar (Nektar Pharmaceuticals, CA)).

[0112] Preparaciones de liberación controlada (o liberación sostenida) pueden formularse para extender la actividad del polipéptido CocE mutante y reducir la frecuencia de dosificación. Las preparaciones de liberación controlada pueden usarse igualmente para concretar el tiempo de iniciación de la acción u otras características, tales como niveles en la sangre del agente y, en consecuencia, afectar la ocurrencia de efectos secundarios. Las preparaciones de liberación controlada puede diseñarse para liberar inicialmente una cantidad del

49
66

polipéptido CocE mutante, que produce el efecto terapéutico deseado, y liberar en forma gradual y continua otras cantidades para mantener el nivel de efecto terapéutico durante un período extendido de tiempo. Con el fin de mantener un nivel casi constante del polipéptido CocE mutante en el cuerpo, el agente puede liberarse de la forma farmacéutica a una velocidad que reemplace la cantidad de agente que se está metabolizando y/o excretando del cuerpo. La liberación controlada de un agente puede estimularse por varios inductores, por ejemplo, cambio en el pH, cambio en la temperatura, enzimas, agua, u otras condiciones fisiológicas o moléculas.

[0113] Los sistemas de liberación controlada pueden incluir, por ejemplo, una bomba de infusión, que puede usarse para administrar el agente en una manera similar a la empleada para aplicar insulina o quimioterapia a órganos o tumores específicos. Los agentes de la invención pueden administrarse por otros medios de liberación controlada o aplicación, que son bien conocidos por las personas de habilidad ordinaria en el arte, incluidos, por ejemplo, hidropropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, medicamentos de absorción ("**depots**"), cubiertas multi-capa, micropartículas, liposomas, microesferas, o similares, o una combinación de cualesquiera de los anteriores, para ofrecer el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Otros métodos de aplicación con liberación controlada de agentes serán bien conocidos por el profesional experto y se encuentran dentro del ámbito de la invención.

[0114] Los polipéptidos CocE mutantes pueden encapsularse y administrarse en una variedad de sistemas de aplicación de sustancias portadoras. Sistemas a base de sustancias portadoras para aplicación de agentes biomoleculares pueden: posibilitar la aplicación intracelular; adaptar las velocidades de liberación de biomoléculas/agentes; aumentar la proporción de biomolécula que alcanza su sitio de acción; mejorar el transporte del medicamento a su sitio de acción; permitir la deposición co-localizada con otros agentes o excipientes; mejorar la estabilidad del agente *in vivo*; prolongar el tiempo de permanencia del agente en su sitio de acción reduciendo la depuración; disminuir la aplicación no específica del agente a tejidos distintos al tejido diana; disminuir la irritación causada por el agente; disminuir la toxicidad debida a dosis iniciales elevadas del agente; alterar la inmunogenicidad del agente; disminuir la

50
6X

frecuencia de la dosificación, mejorar el sabor del producto; y/o mejorar la vida útil del producto.

[0115] Ejemplos de sistemas de aplicación con sustancias portadoras para polipéptidos CocE mutantes descritos en esta especificación incluyen microesferas (véase a este respecto, 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 a este respecto, Galovic et al. (2002) Eur. J. Pharm. Sci. 15, 441-448; Wagner et al. (2002) J. Liposome Res. 12, 259-270). Preferiblemente, el polipéptido CocE mutante se encapsula en RBC (véase más arriba; Ejemplo 12).

MÉTODOS DE DETECCIÓN SELECTIVA

[0116] Otro aspecto de la invención se dirige a métodos de detección selectiva para la generación, identificación y purificación de los polipéptidos CocE mutantes termoestables. Generalmente, los polipéptidos CocE mutantes pueden diseñarse inicialmente de acuerdo con los métodos ya descritos. Tales polipéptidos diseñados pueden detectarse entonces selectivamente tomando en cuenta características preferidas, tales como retención de eficiencia hidrolítica, termoestabilidad incrementada, vida media plasmática incrementada, y/o antigenicidad reducida. Además, los polipéptidos CocE mutantes aleatorios pueden detectarse selectivamente tomando en cuenta las características deseadas.

[0117] Los métodos de detección para identificar selectivamente mutantes termoestables abarcan una amplia variedad de técnicas. El siguiente es un resumen ejemplar de un protocolo genérico. Ácido nucleico que codifica los polipéptidos CocE mutantes (generados, por ejemplo, mediante diseño racional, mutagénesis aleatoria, o mutagénesis de hospedero) se transforma en un hospedero de expresión apropiado (por ejemplo, células de *E. coli* tales como BL21 Gold de *E. coli* (Stratagene)), y se induce expresión del polipéptido mutante de acuerdo con protocolos estándar (por ejemplo, mediante IPTG). La expresión

se lleva a cabo a temperaturas para producir expresión óptima de la proteína (por ejemplo, 16°C para CocE, véase a este respecto, Ejemplo 1) durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, donde sea desde 30 minutos a 24 horas o más). Alternativamente, la expresión se realiza a una temperatura incrementada (por ejemplo, la temperatura incrementada puede ser por lo menos alrededor de 35°C, por lo menos alrededor de 36°C, por lo menos alrededor de 37°C, por lo menos alrededor de 38°C, por lo menos alrededor de 39°C, por lo menos alrededor de 40°C, o incluso mayor). Preferiblemente, la temperatura incrementada a la cual se expresa el polipéptido CocE mutado es 37°C. Alrededor de esta temperatura, el polipéptido CocE tipo silvestre se escinde casi exclusivamente en cuerpos de inclusión. Células que contienen los polipéptidos mutantes expresados se detectan selectivamente tomando en cuenta la presencia de variantes termoestables de CocE.

[0118] La detección selectiva de la presencia de variantes termoestables de CocE implica generalmente la medición directa en células cultivadas, en lisados de células, o luego del rompimiento celular y aislamiento del polipéptido CocE mutante. El rompimiento celular puede incluir choque osmótico, lisis química, sonicación, y/o homogeneización, y el aislamiento del polipéptido mutante puede obtenerse mediante numerosos métodos, incluidos absorción directa a una matriz o absorción por afinidad a través del uso de anticuerpos anti-cocaína o sistemas de captura específicos de proteína de fusión. Una matriz apropiada para absorción incluye papel de nitrocelulosa, filtros, placas de microvaloración tratadas por afinidad o no tratadas, resinas de agarosa o sefarosa, y o puntas recubiertas con afinidad.

[0119] La actividad esterasa de las células cultivadas o un polipéptido mutante aislado puede medirse posteriormente a una o más temperaturas para determinar la termoestabilidad de los mutantes. La temperatura a la cual se realiza el análisis de la actividad determina el grado de detección de la termoestabilidad. Por consiguiente, aunque los mutantes finales tendrán preferiblemente una temperatura de fusión de 45°C o más (determinada, por ejemplo, mediante dicroísmo circular), a menudo la detección selectiva inicial a 45°C no encontrará enzimas activas. Más bien, pueden llevarse a cabo varios ciclos de mutagénesis y detección selectiva, a temperaturas consecutivamente crecientes, para obtener mutantes termoestables. Por consiguiente, la detección selectiva inicial puede

realizarse a 30°C y, luego de ciclos adicionales de mutagénesis, puede llevarse a cabo una detección selectiva con temperaturas incrementalmente crecientes (por ejemplo, 34°C, 37°C, 40°C, 42.5°C, 45°C, etc.), hasta obtener un mutante de termoestabilidad apropiada. Los aumentos de temperatura incremental se determinan empíricamente durante el procedimiento, y se afectan por el número de aciertos a temperaturas particulares, y la T_m determinada de los mutantes generados.

[0120] Aunque sin obligación de hacerlo, y sin querer entrar en limitaciones teóricas, sigue en esta especificación lo que se cree ser una explicación mecánica de la fusión de varias incorporaciones de los polipéptidos CocE mutantes descritos en esta especificación. Los datos de espectros CD ilustran que la fusión CD de cocaína esterasa y mutantes es irreversible, ya que enfriar a 0 grados no reforman los espectros originales (véase, por ejemplo, Ejemplo 19). Aunque no pueden verificarse parámetros termodinámicos, los espectros CD pueden utilizarse para determinar comparativamente si los mutantes son más o menos estables, si tienen estructuras secundarias diferentes o propiedades de agregación. Se cree que los polipéptidos CocE descritos en esta especificación se funden mediante un paso intermedio, es decir, los polipéptidos experimentan un proceso de fusión de 2 pasos.

[0121] 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 que dan cuenta de actividad esterasa general tales como 4-nitrofenil acetato. El sistema de detección puede acoplarse directamente a las especificidades del sustrato, por ejemplo: 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 de 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 Ellmany 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).

[0122] Los polipéptidos CocE mutantes identificados a través de los procedimientos anteriores, o un análisis similar de gran productividad, pueden evaluarse además empelando procedimientos *in vitro* descritos en esta especificación (por ejemplo, valores Kcat y Km, estabilidad a 37°, temperatura de fusión (Tm), niveles de endotoxina, capacidad de degradar cocaína en plasma). Los polipéptidos CocE mutantes con actividad esterasa termoestable y/o inmunogenicidad reducida, pueden evaluarse además utilizando procedimientos *in vivo* descritos en esta especificación (por ejemplo, potencia, duración de la acción, efectos con dosificación repetida, y/o evaluación inmunológica). Preferiblemente, en los polipéptidos CocE mutantes se examina primero la disminución en magnitud de la toxicidad de la cocaína (véase a este respecto, Ejemplos 5, 7 y 8), y aquellos mutantes que reducen la toxicidad en por lo menos alrededor de 5-10 veces pueden evaluarse adicionalmente con respecto al ciclo de tiempo de acción (véase a este respecto, Ejemplo 6). Los polipéptidos CocE mutantes candidatos pueden estabilizarse adicionalmente mediante, por ejemplo, pegilación y/o encapsulación en RBC y re-evaluarse en los procedimientos ya descritos.

[0123] Habiendo descrito la invención en detalle, será evidente que son posibles modificaciones, variaciones e incorporaciones equivalentes sin apartarse del ámbito de la invención definida en las reivindicaciones adjuntas. Más aún, se observará que todos los ejemplos en la presente divulgación se proveen como ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

21

[0124] Los siguientes ejemplos no limitantes se proveen para ilustrar aún más varias incorporaciones de la invención divulgada en esta especificación. Debe observarse por los expertos en el arte que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan métodos que los inventores han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y, por consiguiente, pueden considerarse que constituyen ejemplos de modos para su práctica. No obstante, a la luz de la presente divulgación, los expertos en el arte deben observar que pueden introducirse muchos cambios en las incorporaciones específicas que se divulgan y obtener aún un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y el ámbito de la invención.

EJEMPLO 1: EXPRESIÓN DE COCE

[0125] Se estableció un método para la expresión y purificación de CocE, donde CocE se expresa en *E. Coli* como una proteína de fusión con una marca-Hisx6 del término carboxilo. El gen de la cocaína esterasa se subclonó en el vector de expresión de *E. coli* pET-22b(+) y se indujeron altos niveles de la enzima cocaína esterasa que contenía una marca histidina C-terminal luego de la adición de IPTG a 23°C. La proteína recombinante se acumuló a aproximadamente 10-15% de la proteína total. CocE se enriqueció en una columna de cobalto-quelato (Talon™ Clontech) o una columna de agarosa quelada con níquel (Pierce) en virtud de la marca Hisx6. La proteína eluida fue aproximadamente 95% pura por SDS-PAGE y coloración con azul Coomassie y, posteriormente, se resolvió por columna FPLC de cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) usando un gradiente NaCl. La proteína eluida como un pico simple fue aproximadamente 99% pura, como se indicó por SDS-PAGE y coloración con azul Coomassie (véase a este respecto, Figura 3).

[0126] La actividad enzimática se determinó mediante dos análisis: un análisis de actividad de radio-ligando en el cual cocaína tritiada se hidrolizó y luego, después de la acidificación, se separó el producto ácido benzoico tritiado a partir del clorhidrato de cocaína tritiado mediante cromatografía; y un análisis espectrofotométrico bajo condiciones similares, como se describe por Turner et al. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307. Los espectros de absorción únicos de cocaína (coeficiente de extinción 6.7 L/mmol/cm, a 240 nm) permiten la

77
72

observación de cocaína remanente luego de la escisión enzimática. Los porcentajes lineales ideales de descenso de la cocaína, representando velocidad, se determinaron en un lector de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices) usando software SOFTmax Pro (v1.13). La reacción se inició agregando 150 μL de una solución enzimática 2x a los 150 μL de una solución de cocaína 2x. Las concentraciones finales de CocE variaron desde 100 ng/mL a 20 ng/mL. Las concentraciones finales de cocaína fueron las siguientes: 250, 126, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91 y 1.95 μM . Para la cinética de todas las enzimas, el amortiguador fue solución salina amortiguada con fosfato, pH 7.4. Los porcentajes iniciales se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, con K_{cat} y K_{m} como parámetros ajustables (GraphPad; PRISM, v4).

[0127] Como se determinó utilizando el análisis espectrofotométrico de cocaína, el polipéptido CcoE tipo silvestre purificado hidroliza la cocaína con un K_{cat} de aproximadamente 500 min^{-1} y un K_{m} de aproximadamente 2 μM , lo cual es consistente con valores informados anteriormente (véase a este respecto, Turner et al. 2000).

[0128] Tales procedimientos de expresión pueden utilizarse para los polipéptidos CocE mutantes descritos en esta especificación.

EJEMPLO 2: ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE COCE EX VIVO

[0129] La determinación *ex vivo* de los niveles de cocaína luego de la cocaína esterasa se examinó en plasma humano (University of Michigan Hospital blood bank). Se obtuvo cocaína de The National Institute of Drug Abuse (Bethesda, MD, USA). La cocaína se disolvió en agua esterilizada. Alícuotas (3 ml) de plasma humano se mantuvieron a 37°C en un baño maría durante 10 minutos antes del inicio y durante el experimento. Luego de equilibrar el plasma en un baño maría, se agregó la cocaína a una concentración final de 300 μM y se homogeneizó durante 30 segundos. Se retiraron muestras del plasma y se pusieron en un tubo de microcentrífuga que contenía el estándar interno y una solución de fluoruro de sodio saturada para impedir el metabolismo posterior de la cocaína. Inmediatamente después de tomar la primera muestra de plasma (cocaína sola), se agregó 0.05 mg/ml CocE o vehículo CocE y se homogeneizó. Se recogieron las muestras de plasma a 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos

23 5/6

después de agregar CocE. Se midieron los niveles de cocaína usando cromatografía líquida de alto rendimiento en tándem con espectrometría de masas.

[0130] Se realizó cromatografía líquida usando un sistema HPLC Surveyor (ThermoElectron Corp., Franklin, MA) con una bomba cuaternaria y autosampler configurado con un ciclo de inyección de 10 µl. La separación se logró empleando una columna Phenomex C18 3 µm 30 x 4.6 mm con una columna de guarda correspondiente (Waters Corp., Milford, MA) con un caudal de 600 µl/min. El disolvente A consistía de una solución de ácido fórmico 0.1%, y el disolvente B ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo (alto grado de pureza; Burdick and Jackson, Muskegon, MI). Se empleó un gradiente balístico de 3 minutos con cocaína y el estándar interno co-eluyendo a 2.3 minutos.

[0131] Para la detección y cuantificación por espectrometría de masas, se usó un espectrómetro de masas triple quadrapole Finnigan TSQ Quantum Ultra AM, equipado con una fuente de ionización electrospray IonMax (ThermoElectron Corp., Franklin, MA), en ión positivo, en modo de monitorización de reacción seleccionado. Nitrógeno sirvió como el gas nebulizador y argón como el gas de colisión. Se optimizaron los caudales de gas, voltajes de aspersión y energías de colisión. Se determinaron las curvas de calibración para la cocaína con 50 nM de cocaína deuterada (cocaína D₃) como el estándar interno en muestras de plasma no tratado. Las muestras no conocidas se fijaron también con cocaína D₃. La evaluación de todas las muestras se realizó en triplicado. Las curvas estándar y las no conocidas se analizaron mediante el programa Quan Browser en software versión Xcalibur 1.4 (ThermoElectron Corp., Franklin, MA). Se construyeron curvas de calibración empleando regresión lineal de la relación área de pico/área del estándar interno de la cocaína como una función de la concentración estándar con un factor de ponderación de 1/x. Se aceptaron valores estándar de ajuste de curva con un valor mayor que 0.99, y los valores RSD para muestras replicadas están entre 0-10%.

[0132] Los resultados demuestran que la CocE es capaz de degradar cocaína muy rápidamente cuando las dos se mezclan brevemente en plasma humano (véase a este respecto, Figura 4). El primer punto de tiempo indica la concentración de cocaína antes de la adición de cocaína esteras o vehículo

74

esterasa. Antes del tratamiento con esterasa, los niveles de cocaína fueron similares, pero en el término de 1 minuto de la administración de la cocaína esterasa, los niveles de cocaína disminuyeron por lo menos 100 veces a aproximadamente 2 μ M comparados con la muestra de plasma tratada con vehículo. Los niveles de cocaína siguieron disminuyendo en las muestras de plasma tratadas con esterasa, cayendo por debajo de 1 microM en el punto de tiempo de 2 minutos.

[0133] Se demostró la eficiencia terapéutica de la enzima aumentando la dosis de cocaína requerida para producir efectos tóxicos luego de una inyección intravenosa única de CocE. La enzima tipo silvestre demostró una cinética rápida para la degradación de la cocaína *ex vivo* en suero de rata y suero humano. Dos mutantes inactivos de CocE no protegieron las ratas de los efectos tóxicos de la cocaína, confirmando que los efectos protectores son debidos a la actividad hidrolítica. Además, la CocE no cambió la mortalidad de WIN-35065-2, un análogo de cocaína que carece de la fracción éster de benzoilo dianizada por CocE. La caracterización *in vivo* y *ex vivo* de CocE sustenta el papel de la enzima como un antídoto apropiado a la toxicidad en humanos.

EJEMPLO 3: COCE MUTANTE TERMOESTABLE PREVISTA

[0134] El diseño racional de la CocE mutante descrita en esta especificación se basó en simulaciones de dinámica molecular (MD). Se construyó un modelo computacional de CocE usando la estructura cristalina publicada de CocE tipo silvestre (véase a este respecto, Figura 2). Tales modelos pueden emplearse para identificar ciertas modificaciones de aminoácidos que aumentan la temperatura de fusión teórica de la proteína sin alterar la estructura en el sitio activo. La simulación MD clásica permite el estudio de la evolución en el tiempo de un sistema grande, tomando muchos pasos de tiempo sucesivos pequeños bajo fuerzas atómicas determinadas por un conjunto de funciones de interacción parametrizadas (campo de fuerza), incluidas interacciones enlazadas (enlaces, ángulos y ángulos diédricos), interacciones van der Waals no enlazadas e interacciones electrostáticas basadas o cargas atómicas netas. Debido a la forma simple de campo de fuerza la simulación MD puede llevarse a cabo durante un tiempo de simulación suficientemente largo para ofrecer propiedades significativas promediadas por el ensamble, incluso para un sistema muy grande que implica

más de cien mil átomos. Así, para CocE y cada mutante propuesto, la simulación MD llevará a una estructura 3D dinámicamente promediada, razonable, del polipéptido simulado en agua.

[0135] Basado en la estructura cristalina de rayos X (código PDB 1JU3) de la cocaína esterasa bacteriana (CocE) (Larson et al. (2002) Nature 9, 17), se construyó un modelo 3D completo de CocE que se une con (-)-cocaína, apropiado para modelación computacional de su estabilidad termodinámica. Para aumentar la termoestabilidad de CocE, se implementó un método computacional en el programa RosettaDesign (Kuhlman and Baker (2000) PNAS 97, 10383) capaz de predecir mutaciones termoestabilizadoras en un múltiplo dado, minimizando al mismo tiempo cualquier cambio en el esqueleto que pudiera alterar estructuralmente la estructura del sitio activo o extinguir su flexibilidad. El método implementado en el programa RosettaDesign usa una función de energía para evaluar la idoneidad de una secuencia particular para un múltiplo dado ("*a given fold*") y un algoritmo de búsqueda Monte Carlo para muestrear el espacio de la secuencia. Un método similar se ha empleado exitosamente por otros investigadores para aumentar la termoestabilidad de una enzima sin reducción en la eficiencia catalítica (Korkegian et al. (2005) Science 308, 857). Las cargas atómicas parciales para los átomos residuales no estándar se calcularon usando el protocolo RESP estándar implementado en el módulo Antechamber del paquete del programa Amber7 (u 8) (Case, 2002). El modelamiento computacional que utiliza el programa RosettaDesign permitió la predicción de un conjunto de mutaciones CocE calculadas como poseedoras de energía más baja y, por lo tanto, termoestabilidad incrementada (véase a este respecto, Tabla 2). Para este ejemplo, la computación consideró únicamente las mutaciones posibles en los residuos de aminoácidos con una distancia de entre 6-25 Å de la molécula de sustrato de cocaína.

[0136] Los polipéptidos CocE de mutación única identificados, calculados para estabilizar CocE en alrededor de 2.1 a alrededor de 4.5 kcal/mol incluían: L163V (SEQ ID NO: 3); V121D (SEQ ID NO: 4); SWA (SEQ ID NO: 5); Q123E (SEQ ID NO: 6); V225I (SEQ ID NO: 7); I218L (SEQ ID NO: 8); A310D (SEQ ID NO: 9); A149S (SEQ ID NO: 10); S159A (SEQ ID NO: 11); S265A (SEQ ID NO: 12); S56G (SEQ ID NO: 13); W220A (SEQ ID NO: 14); T122A (SEQ ID NO: 15); S140A (SEQ ID NO: 16); F189L (SEQ ID NO: 17); A193D (SEQ ID NO:

SA
76

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

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

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Mutación de Consenso	Cambio de Energía (kcal/mol)
163	163	163	163	163	163	163	163	163	163	L163V	-4.5
121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	V121D	-3.9
167	167	167	167	167	167	167	167	167	167	S167A	-3.9
123	123	123	123	123	123	123	123	123	123	Q123E	-3.8
225	310	310	225	225	225	225	310	225	218	V225I	-3.6
218	225	218	218	218	218	218	225	218	225	I218L	-3.5
310	218	225	310	310	310	310	218	310	152	A310D	-3.4
149	149	152	149	149	149	149	149	149	310	A149S	-3.3
159	159	140	159	159	159	159	159	159	149	S159A	-3.3
189	265	149	265	265	265	265	265	189	265	S265A	-3.3
265	140	265	56	56	56	56	220	265	159	S58G	-3.2
56	220	159	220	220	220	220	122	56	220	W220A	-3.2
220	122	220	122	122	122	122	140	220	56	T122A	-3.1
122	189	122	140	140	140	140	189	122	122	S140A	-3.1
140	193	189	189	189	189	189	193	140	140	F189L	-3.1
254	42	193	193	193	193	193	42	254	189	A193O	-3.1
262	262	42	254	254	254	254	254	42	193	T254R	-3.1
508	508	262	42	42	42	42	262	262	262	N42V	-3.0
152	152	508	262	282	262	262	508	508	508	V262L	-3.0
160	160	198	508	508	508	508	152	152	198	L508G	-2.9
74	198	160	152	152	152	152	160	160	254	Y152H	-2.9
172	74	74	160	160	160	160	198	198	74	V160A	-2.8
193	172	172	198	198	74	198	74	172	160	T172R	-2.8
532	532	532	532	74	172	74	172	74	172	Y532F	-2.7
146	146	56	74	172	532	172	532	193	532	T74S	-2.7

6.6
7X

285	285	285	172	532	146	532	146	532	285	W285T	-2.6
533	290	146	285	146	285	146	285	285	290	L146P	-2.6
173	254	533	146	285	533	285	533	146	146		
194	533	173	533	533	173	533	173	533	533	D533S	-2.5
477	56	194	173	194	194	173	194	173	173	A194R	-2.4
531	173	200	194	200	290	194	200	194	194	G173Q	-2.4
42	194	477	200	290	477	200	290	200	200	C477T	-2.4
119	200	531	290	477	531	477	477	290	477	K531A	-2.4
200	477	305	477	531	200	531	531	477	531		
41	531	41	41	41	41	41	41	531	42	R41I	-2.2
46	41	119	119	119	119	119	119	41	119	L119A	-2.2
84	119	46	46	173	46	46	46	119	41	K46A	-2.1
305	46	84	84	46	84	84	56	46	46	F84Y	-2.1
478	57	158	478	84	478	305	84	84	57		
57	84	307	57	478	57	478	307	478	84		
87	478	478	142	57	87	57	478	57	158		
142	87	57	263	87	142	87	57	142	478		
263	142	142	307	142	263	142	142	263	142		
307	263	263	78	263	307	263	263	307	263		
78	307	78	257	307	78	307	78	78	78		
257	78	257	531	48	257	78	257	257	257		
290	257	290	49	78	49	257	49	49	49		
291	201	49	201	257	305	201	201	201	201		
49	49	201	305	45	291	290	412	305	307		
176	291	291	412	49	176	291	291	412	291		
45	305	412	291	201	45	49	176	291	176		
54	176	176	176	305	54	176	45	45	305		
406	45	254	45	291	406	45	413	176	45		
50	54	45	413	176	50	54	54	413	54		
	406	54	54	54		406	305	54	406		
	50	413	50	406		50	406	406	50		
		406	406	50			50	50			
		50									

EJEMPLO 4: PARÁMETROS CINÉTICOS DE COCE MUTANTE T172R Y S159A

[0137]CocE tipo silvestre y polipéptidos CocE mutantes T172R y S159A se analizaron con respecto a eficiencia catalítica.

61
78

[0138] Se realizó mutagénesis dirigida al sitio (QuickChange™, Invitrogen) de CocE para generar el polipéptido CocE mutante S159A (SEQ ID NO: 11). Las técnicas de clonación y expresión utilizadas para producir el S159A fueron las mismas del Ejemplo 1, excepto lo indicado en contrario. Se amplificó el gen CocE a través de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) en la presencia de cebadores que contienen la mutación requerida (Integrated DNA Technologies, Inc.). La mutación específica se volvió a clonar en el plásmido de expresión y se determinó la secuencia nucleotídica de estos plásmidos para verificar la presencia de la mutación.

[0139] El mutante T172R se generó por PCR traslapante utilizando cebadores 5' y 3' que contenían la mutación T172R específica, así como un sitio de enzima de restricción Sac II para fácil detección del gen mutado. Las parejas de cebadores CocE 20-5'F-Nde I (5' GATATACCATATGGTGGACGGGAATTAC 3') y T172R-3'R (5' CAGACCTCGACGTGATGAGCCCGCGGCCTATGAGAGCTGACCAGC 3') así como CocE-1800-3'R (5' GTGGTGGCTCGAGTCGCTTGATAATCG 3') y T172R-5'F (5' GCTGGTCAGCTCTCATAGGCCGCGGGGCTCATCACGTCGAGGTCTG 3') se amplificaron mediante PCR empleando la enzima Pfu de alta fidelidad (Stratagene) con una temperatura de hibridación de 55°C. Los productos PCR resultantes se combinaron y se re-amplificaron, generando un gen CocE de longitud total que codificaba la mutación T172R. El gen se digirió con Nde I y Xho I; se subclonó en el vector de expresión y se secuenció en su totalidad para verificar tanto la presencia de la mutación como la ausencia de mutaciones adicionales por error de copia de PCR.

[0140] Plásmidos que contenían las mutaciones se transformaron en células BL21 de *E. coli* y la enzima inducida por IPTG se purificó en Ni-Agarosa. Las proteínas expresadas se probaron luego con respecto a actividad enzimática y termoestabilidad a 37°C. Se cuantificó la actividad enzimática empleando el análisis espectrofotométrico como se describe en el Ejemplo 1. Igualmente se probó la termoestabilidad mediante el análisis espectrofotométrico por pre-incubación de la enzima tipo silvestre y de los mutantes a 37° C durante varios tiempos. Adicionalmente, se analizó la naturaleza de la termoinestabilidad de la enzima tipo silvestre y del mutante T172R por electroforesis en gel de

79

poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes. Concretamente, mutante y enzima tipo silvestre a 0.1mg/ml se incubaron a 37°C durante varios puntos de tiempo, se enfriaron a 4°C, se mezclaron con colorante de carga SDS que contenía β -mercaptoetanol y se corrieron en geles 10% SDS-PAGE (condiciones desnaturalizantes) o se corrieron en geles de 10% de poliacrilamida nativa (condiciones no desnaturalizantes) a 4°C. Los geles se fijaron con 10% metanol, 7% ácido acético durante 30 minutos, y luego se colorearon con colorante de gel de proteína Sypro-Ruby (Molecular Probes, Invitrogen) durante 3 horas. La coloración de la proteína se visualizó bajo luz UV utilizando un Alphamager™ 3400 (Alpha Innotech). Finalmente, se determinó la temperatura exacta de fusión de la enzima tipo silvestre y del mutante T172R mediante dicroísmo circular usando un espectropolarímetro JASCO-810 operado por un programa de análisis JASCO V500/FP-750 para Windows. Los espectros CD se cuantificaron en miligrados y se normalizaron contra amortiguador PBS.

[0141] Los resultados del análisis espectrofotométrico mostraron que T172R tenía Vmax y Km elevados a temperatura de la sala y un Vmax y Km sumamente elevados a 37°C, comparado con CocE tipo silvestre (véase a este respecto, Tabla 3; Figura 5). En efecto, el Vmax y Km de T172R a 37° C fue comparable con el Vmax y Km de CocE tipo silvestre a temperatura de la sala. La CocE mutante S159A mostró un Vmax y Km ligeramente elevados a 37°C, pero un Vmax y Km disminuidos a temperatura de la sala, comparada con la CocE tipo silvestre. La electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes (Figura 6a) indicó una banda de proteína única para la enzima tipo silvestre y T172R de aproximadamente 65000 Da, sin importar la temperatura de incubación, indicando que la degradación proteolítica no describe adecuadamente el mecanismo de la inestabilidad térmica. Los geles no desnaturalizantes (Figura 6b) mostraron una banda de proteína única para la enzima tipo silvestre antes de la incubación a 37°C; sin embargo, luego de la incubación a 37°C, se observa aparecer especies de peso molecular más alto a medida que la banda original se desdibuja. Estos supuestos agregados de proteína pueden observarse igualmente para el mutante T172R; no obstante, el tiempo hasta la agregación luego de la incubación a 37°C es mayor, y en este procedimiento el mutante T172R se aproximó a tener una vida media 8x más prolongada a 37°C que la enzima tipo silvestre. El análisis de la temperatura de fusión de la proteína mediante dicroísmo circular (Figura 7) indicó que cambios sensibles a la temperatura en la estructura terciaria de la proteína estaban

80

ocurriendo en el rango cercano a UV del espectro (entre 260nm y 320nm). El ajuste de curva de los cambios sensibles a la temperatura en esta región del espectro indicó que la CocE tipo silvestre tiene una temperatura de fusión de 36.15°C, comenzando la desnaturalización detectable a aproximadamente 30°C. Se determinó que el mutante T172R tenía una temperatura de fusión de 41.43°C, empezando la desnaturalización detectable a aproximadamente 28°C. En consecuencia, se determinó el cambio único de aminoácido de tirosina a arginina en el aminoácido 172, con un aumento 2.8kCa/mol estimado en termoestabilidad tenía una temperatura incrementada en 5 grados completos, comparado con la CocE tipo silvestre.

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

	S159A	S159A (40min @ 37°C	T172R	T172R (40min @ 37°C	CocE tipo silvestre	CocE tipo silvestre (40 min@ 37°C
Vmax	876.6	130.7	1466	1267	1264	94.06
Km	43.65	15.69	88.20	78.80	71.81	12.30

EJEMPLO 5: PREVENCIÓN POR COCE TIPO SILVESTRE IN VIVO DE LA MORTALIDAD DE LA COCAÍNA EN RATAS

[0142] Para determinar la actividad esterática de la CocE *in vivo* se implementó un modelo de roedores de la toxicidad aguda de la cocaína. Cuando se trataron con altas dosis de cocaína, las ratas exhibieron primeramente convulsiones seguidas por cesación de la respiración y el movimiento. La dosis tóxica mínima de cocaína, cuando se administró intraperitonealmente, producirá una fatalidad en el término de 15 minutos del tratamiento.

[0143] La protección contra la mortalidad, inducida por la cocaína, mediante la CocE tipo silvestre se determinó y comparó con los efectos protectores de BChE humana. La actividad esterática de la CocE se estableció evaluando la actividad de dos enzimas mutantes, cada una de las cuales carecía

de uno de tres aminoácidos en el sitio activo. Adicionalmente, se determinó la actividad de una enzima tipo silvestre, modificada por una modificación covalente de Ser17 en el sitio activo, con fluoruro de fenilmetil sulfonato (PMSF - *phenylmethyl sulphonate fluoride*). Se demostró que la degradación esteárica de la cocaína era el mecanismo de los efectos protectores de la CocE verificando si la enzima protegía contra la toxicidad inducida por WIN 35065-2 (Madras et al. (1989) J Pharmacol Exp Ther 251, 13-141), un análogo de cocaína que carece del puente éster en el sitio propuesto de hidrólisis enzimática.

[0144] Ratas machos Sprague-Dawley (300 gramos) (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) se alojaron en jaulas de tres animales. Luego de la implantación quirúrgica de un catéter yugular, todas las ratas se alojaron individualmente hasta la terminación del experimento. Las ratas se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, encendiendo las luces a 7:30 a.m. y disponiendo de alimento y agua *ad libitum*. Luego de anestesiarse las ratas con clorhidrato de ketamina (100mg/kg, i.p.) y xilazina (10 mg/kg, i.p.), se implantaron catéteres intravenosos (tubos Micro-renetano, 15 cm, MRE-040, Braintree Scientific Inc., Braintree, MA) en la vena yugular derecha. Aproximadamente 3 cm del catéter se insertaron en la vena; el tubo restante se pasó subcutáneamente a la espalda, donde salió de una incisión practicada entre las paletillas. El tubo expuesto se tapó con una pieza de 1 cm de acero inoxidable (0.28 de diámetro, Small Parts Inc., Miami, FL). Los catéteres se lavaron diariamente con 0.5 ml de solución salina heparinizada (50 U/ml) para mantener la patencia del catéter. Luego de la cirugía, se dejó que las ratas se recuperaran durante una semana. Cada rata se utilizó para un solo experimento, y todos los grupos experimentales constaban de 6-8 ratas.

[0145] Para determinar la dosis efectiva mínima de CocE bloqueaba las convulsiones inducidas por la cocaína y la muerte, se administraron 0.1, 0.32, o 1.0 mg de CocE o vehículo (solución salina amortiguada con fosfato, PBS - *phosphate buffered saline*) intravenosamente un minuto después de 180 mg/kg de cocaína (i.p.). Para determinar los límites catalíticos de la CocE, se administraron dosis crecientes de cocaína (100, 560, 1000 mg/kg, i.p.) un minuto antes de 1.0 mg CocE (i.v.). Se administraron mutantes y CocE bloqueada en PMSF (1mg, i.v.) un minuto antes de 180 mg/kg de cocaína (i.p.). Se administró igualmente CocE (1.0 mg, i.v.) un minuto después de la dosis mínima de WIN-35065-2 (560 mg/kg,

15/12/2022
82

i.p.). CocE (1.0 mg, i.v.) se aplicó antes y después de la cocaína (100 mg/kg, i.p.) para determinar la vida media *in vivo* de la esterasa. Todas las inyecciones intravenosas fueron seguidas por un lavado con solución salina heparinizada (0.5 ml). Luego del tratamiento, se observaron las ratas en cuanto a convulsiones y muerte. Se registraron el número de episodios convulsivos, la duración de cada episodio y el tipo de convulsión. La muerte se definió como la cesación de movimiento y respiración observados. Se calculó el porcentaje de animales en cada grupo experimental que exhibían convulsiones y mortalidad. Seguidamente se calculó la media de error estándar porcentual para cada punto de datos.

[0146] Los resultados mostraron que, en el modelo con roedores de toxicidad aguda, la cocaína indujo convulsiones, dependientes de la dosis, y muerte en las ratas; la muerte se observó en menos de 15 minutos después de la en 100% de los animales a los que se administraron 100 mg/kg de cocaína (véase a este respecto, Figura 9). CocE (1.0 mg) infundida después de la administración de la cocaína produjo un cambio de 10 veces en la curva de efecto de la dosis de la cocaína sobre la toxicidad (véase a este respecto, Figura 9), de modo que se requirieron 1000 mg/kg de cocaína para superar las propiedades catalíticas protectoras de la CocE. Este régimen de tratamiento se asemeja muy de cerca a situaciones de toxicidad humana, donde el antídoto a sobredosis se da únicamente después que la cocaína se ha ingerido, inhalado, o inyectado.

[0147] La CocE tipo silvestre mostró eficiencia catalítica superior sobre la BChE humana. Aplicada un minuto antes de 180 mg/kg de cocaína, 1 mg de CocE ofreció una protección del 100% contra la mortalidad inducida por la cocaína (véase a este respecto, Figura 10), mientras que una dosis equivalente molar de 10 veces de BChE humana (13 mg) no ofreció protección, similar a una dosis 10 veces más baja de CocE (0.1 mg) (véase a este respecto, Figura 10).

[0148] Ambas mutaciones de la CocE (Ser117Ala o Tyr44Phe) carecieron de actividad *in vivo* y, por lo tanto, no tuvieron efectos protectores (Figura 11b). Más aún, la enzima tratada con PMSF eliminó igualmente el efecto protector de la CocE contra la cocaína (Figura 11b). Adicionalmente, el efecto letal del análogo de cocaína no hidrolizable, WIN 35065-2, no fue superado por el tratamiento con CocE (Figura 12). Basándose en estudios de protección *in vivo* realizados con preparaciones catalíticamente inactivadas de la enzima (mutantes

tratados con PMSF e inactivos de CocE), es claro que los efectos protectores de la enzima son debidos a su habilidad de hidrolizar cocaína. Tomados en conjunto, estos datos satisfacen las evaluaciones *in vitro* de la actividad esteérica de la CocE y confirman el mecanismo de protección de la enzima contra la mortalidad inducida por la cocaína *in vivo*.

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

[0149] Se examinaron los efectos de administrar CocE tipo silvestre antes de la dosificación de cocaína. El modelo de toxicidad en ratas fue como se describe en Ejemplo 5. La CocE tipo silvestre se aplicó 100, 30, 10, 3 y 1 minutos antes y 1 y 6 minutos después de la administración de la cocaína. Se realizaron extracciones compuestas de muestra de plasma humano en 100% de acetronitrilo (volumen 3x), se incubaron durante aproximadamente 15 minutos, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 4.5 minutos, y se recogió el sobrenadante resultante. Los extractos se concentraron en un Savant Speed Vac (ThermoElectron Corp., Franklin, MA) para retirar el acetronitrilo. Las muestras extraídas se reconstituyeron en agua y se diluyeron 10-1.000 veces.

[0150] Muestras de plasma humano se fijaron con 300 uM de cocaína y se mantuvieron a 37°C. Se tomó una alícuota de plasma antes de la adición de cocaína esterasa o vehículo de esterasa, y otra alícuota se recogió 1 minuto luego de la administración de esterasa. Las alícuotas de plasma se mezclaron inmediatamente con el estándar interno (cocaína-D3) y una solución de fluoruro de sodio saturado para impedir el metabolismo posterior de la cocaína. Se practicaron extracciones de tejido y se cuantificaron los niveles de cocaína y estándar interno por HPLC con espectrometría de masas en tándem.

[0151] Para la inactivación dependiente del tiempo de CocE *in vitro*, se incubó enzima CocE purificada (a 250 ng/ml) en solución amortiguadora de análisis en la ausencia de cocaína a 37°C durante varios tiempos. Luego de la incubación a 37°C las muestras se pusieron en hielo. Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la CocE, las muestras se incubaron con (-)cocaína a diferentes concentraciones como se indica con una concentración enzimática final de 125 ng/ml. El porcentaje de decrecimiento de la (-)-cocaína a

A240 se cuantificó en un lector multiplacas. Los datos se ajustaron a un decrecimiento exponencial único usando Kaleidagraph™ (software Synergy) produciendo un $t_{1/2}$ de 13.2.

[0152] Se descubrió que la CocE tipo silvestre tenía efectos protectores dependientes del tiempo; 100% de las ratas se salvaron cuando se trataron con CocE (1 mg) 1 minuto antes de la cocaína, sobreviviendo únicamente el 66% y el 32% de las ratas cuando se trataron con CocE 30 y 1 minutos antes de la cocaína, respectivamente (véase a este respecto, Figura 14). Los efectos protectores de la CocE se eliminaron cuando las ratas se trataron 100 minutos antes de la cocaína. Este efecto dependiente del tiempo se debe muy probablemente a la desactivación térmica de la enzima *in vivo*. En el plasma de rata, se encontró que la CocE tenía una vida media notablemente corta (alrededor de 10 minutos, Figura 13), muy probablemente debido a la sensibilidad a cambios en pH y temperatura. Adicionalmente, datos preliminares *in vitro* con la enzima purificada sugieren que la CocE experimenta una inactivación dependiente de la temperatura con un $t_{1/2}$ de aproximadamente 15 minutos a 37° C.

[0153] Dados estos datos, se puede que un 1 mg de dosis de CocE administrada 30 minutos antes de la cocaína, decrecerá 3 vidas medias, dejando 0.25 mg de enzima tipo silvestre en la circulación natural cuando se administra cocaína.

[0154] Estudios previos han sugerido que concentraciones letales en la sangre de cocaína en la rata varían entre 50-128 μ M (Mets B and Virag L(1995) AnesthAnalg 81, 1033-1038; Mets et al. (1999) Life Sci 65, 1317-1328), y niveles pico en el plasma de cocaína ocurren alrededor de 13 minutos después de una inyección intraperitoneal (Sun et al. (2002) J Pharmacol Exp Ther 302, 710-716). Con base en informes de la cinética de la administración de cocaína intraperitoneal (Sun et al. (2002) J Pharmacol Exp Ther 302, 710-716), se calcula que 100 y 320 mg/kg de cocaína producen una concentración pico de cocaína en la sangre de 35 μ M y 113 μ M, respectivamente. Concentraciones letales de cocaína son de una magnitud similar en humanos (20-200 μ M) (Finkle BS and McCloskey KL (1978) J Forensic Sci 23, 173-189; Wetli and Wright (1979) J Am Med Assoc 241, 2519-2522). Como 1 mg de CocE tipo silvestre salvó las ratas tratadas con estas dosis de cocaína (Figura 9), puede predecirse justificadamente

que la enzima protegerá contra la toxicidad de la cocaína en el humano. Adicionalmente, los niveles de cocaína medidos usando espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida de alto rendimiento en plasma humano fijado con 300 μ M de cocaína, una concentración que excede los niveles tóxicos de cocaína informados, y luego tratado con CocE (un equivalente molar de nuestra dosis *in vivo* de 1.0 mg), redujo la concentración de cocaína a aproximadamente 2 μ M en menos de un minuto (Figura 10).

[0155] La protección contra una dosis LD₅₀ de cocaína en ratas requiere un tratamiento de 10 mg/kg de BChE (Lynch et al. (1997) Toxicol Appl Pharmacol 145, 363-371), asumiendo que la enzima se distribuya análogamente en el humano, un individuo de 70 kg necesitaría una dosis de 700 mg de BChE exógena para protegerlo contra una sobredosis. Además, no existe evidencia de que la BChE pueda actuar para revertir la toxicidad de la cocaína cuando se administra después de la cocaína, una característica necesaria de un antídoto para la toxicidad de la cocaína.

[0156] Queda así demostrado que una dosis de 1 mg de CocE tipo silvestre en una rata de 300 gramos es suficiente para proteger contra una dosis de cocaína que excede la LD₁₀₀ (Figura 9). Adicionalmente, la enzima administrada antes, y más importante aún, hasta 6 minutos después de la dosis LD₁₀₀ de cocaína, brindó protección de la toxicidad (Figura 14). La CocE metabolizó concentraciones de cocaína en el suero en 150 veces en menos de un minuto (Figura 15).

[0157] Dados estos datos, se predice que 250 mg de CocE administrados a un humano de 70 kg luego de la ingestión tóxica de cocaína liberarán al individuo de una muerte cierta. Lo anterior demuestra que la CocE tipo silvestre es una molécula eficiente anti-cocaína pero que el corto tiempo de actividad de la enzima bajo condiciones fisiológicas limita su valor terapéutico. Tales resultados señalan la importancia de ampliar la termoestabilidad de la CocE tipo silvestre.

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

19
86

[0158] La actividad hidrolítica de la CocE tipo silvestre y la CocE mutante T172R se caracterizó y confirmó *in vivo* evaluando su capacidad de prevenir la mortalidad inducida por la cocaína en ratas.

[0159] El tratamiento de los animales fue como se describe en Ejemplo 5. Se administraron dosis crecientes de cocaína (i.p.) a las ratas y, un minuto después, se administraron por vía intravenosa CocE tipo silvestre (0.32 mg), CocE T172R mutante (0.32 mg), o vehículo. Todas las inyecciones intravenosas fueron seguidas por un lavado heparinizado (0.5 ml). Después del tratamiento, se observó la muerte de las ratas. El tiempo hasta la muerte se registró para la dosificación de 1g/kg de cocaína. CocE tipo silvestre y CocE T172R (0.32 mg) se aplicaron en varios tiempos precedentes (1, 10, 30 y 60 minutos) a la administración de 320 mg/kg i.p. de cocaína, monitorizando entonces las ratas en cuanto a muerte.

[0160] Los resultados demuestran la capacidad de la CocE intravenosa y, especialmente, la CocE mutante de revertir o prevenir los efectos letales producidos por la cocaína. La CocE tipo silvestre aplicada un minuto después de la administración de la cocaína evitó la mortalidad con dosificaciones de cocaína, que mataron las ratas de control, y no ocurrió mortalidad del 100% hasta las dosificaciones de cocaína de 1g/kg (véase a este respecto, Figura 16). Las ratas tratadas con CocE mutante T172R fueron capaces de tolerar dosificaciones incluso mayores, resultando el 1g/kg de cocaína en únicamente alrededor de 70% de mortalidad. Además, los efectos profilácticos de la CocE mutante T172R fueron más prolongados que la CocE tipo silvestre (véase a este respecto, Figura 17).

EJEMPLO 8: DOSIS REPETIDA DE COCE IN VIVO EN RATONES

[0161] Se realizaron estudios adicionales del efecto de la CocE sobre la toxicidad en el ratón, particularmente con respecto a dosis repetidas.

[0162] El modelo de toxicidad animal fue similar al descrito previamente, excepto como se describe. Se emplearon ratones machos NIH Swiss. Para inyección intravenosa en la cola, los ratones se ponen en una pequeña cámara de reclusión que deja libre su cola. Se ubica una lámpara de calor con una bombilla infrarroja de 250w en una distancia de alrededor de 4

87

pulgadas de la cola, y se dejó durante un par de minutos. A continuación la cola se limpia frotándola con alcohol y se inserta una aguja deslizante de precisión 30G 1/2 (Fisher Scientific) en una de las venas laterales para infusión. Para verificar si la aguja está en la vena se infunde una pequeña cantidad de droga, [y] si está en la ubicación correcta, la solución se difundirá fácilmente sin ninguna indicación de localización subcutánea incorrecta, que aparece en color blanco en el sitio de inyección. Para caterización intravenosa, ratones machos NIH Swiss se anestesiaron con 100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilazina, co-administradas i.p. Cuando los ratones ya no responden más a la presión en la pata, se rasura el cuello y se prepara frotándolo alternadamente con betadina y alcohol. Bajo condiciones de limpieza, se practica una incisión en el cuello transversal derecho y se aísla la vena yugular externa. Se inserta un catéter en la vena con la ayuda de un microscopio disecante al nivel de la aurícula derecha, y se asegura en la vena con nylon, 4-0 suturas y adhesivo de tejido, 3M Vetbond (3M Animal Care Products, St. Paul, MN). Los catéteres son un tramo corto de tubo Tygon con un diámetro interno de 0.010 pulgadas y un diámetro exterior de 0.030 pulgadas. (Small Parts, Inc., Miami Lakes, FL). Se practica una pequeña incisión en el centro de la espalda del animal, y se inserta subcutáneamente un trocar con salida en el sitio de incisión ventral. El catéter se hala entonces a través del trocar y se saca de la espalda del animal donde se mantiene en su sitio con material de sutura de nylon y el adhesivo de tejido. Una corta pieza de alambre de acero con un diámetro de 0.011 pulgadas (Small Parts, Inc., Miami Lakes, FL) se inserta en el extremo del catéter. Se cierra la incisión ventral con material de sutura 4-0 Vicryl y el ratón se pone bajo una lámpara de calor para su recuperación. Aproximadamente una hora después, el ratón se devuelve a su jaula de residencia.

[0163] A los ratones que sobrevivieron una primera administración de la combinación de 0.32 mg CocE y 320 mg/kg de cocaína se les aplicó esta combinación una vez más, 14 días después de la administración inicial. Todos los ratones sobrevivieron esta segunda administración. Todos los ratones sobrevivieron también una tercera administración 21 después de la primera combinación de dosis. La efectividad de la administración repetida sugiere que no se está montando una respuesta inmunitaria fuerte a la CocE en esta preparación, quizá debido a su rápida depuración.

71
88

[0164] Los resultados mostraron que un cambio dramático a la derecha en la potencia de la cocaína en producir la muerte fue facilitado por 0.32 y 1.0 mg/kg de cocaína (véase a este respecto, Figura 18). La latencia a la muerte se amplió apreciablemente por la CocE: luego de la administración de 180 mg/kg i.p. de cocaína, los ratones murieron generalmente en alrededor de 3 minutos. Luego de una dosis de 1.0 gm/kg de cocaína más 1.0 mg de CocE, la muerte ocurrió en 28 minutos en promedio. Los datos se examinaron asimismo en cuanto a la capacidad de la hBChE de bloquear la toxicidad de la cocaína. Con una dosis de 1 mg, la hBChE produjo un ligero aumento en la dosis de cocaína necesaria para matar los ratones (véase a este respecto, Figura 18). La enzima es notablemente menos efectiva que la CocE. Aunque dosis mayores de cocaína fueron necesarias para matar los ratones luego de la administración de la hBChE, el tiempo hasta la muerte no se modificó por esta enzima.

EJEMPLO 9: VIDA MEDIA IN VIVO Y PRUEBAS DE BIODISTRIBUCIÓN

[0165] La vida media *in vivo* y la biodistribución de los polipéptidos CocE mutantes se examinan en ratones BALB/c. Concretamente, ¹²⁵I se etiqueta a los residuos tirosina de CocE mutante utilizando un método bien establecido de yodinación con cloramina-T (Hunter, WM and Greenwood, FC (1962) Nature 194, 495-496). Los ratones BALB/c se inyectan a través de las venas de su cola con 0.1 mL de CocE mutante etiquetada con 0.5 µCi ¹²⁵I o los conjugados CocE mutante-PEG. Cada grupo experimental se componía de 24 ratones. Se sacrifican tres ratones por dislocación cervical en intervalos de tiempo de 15, 30, 90 minutos, 3, 12, 24, 48 y 72 horas luego de la inyección de la droga. Se toman muestras de sangre, así como muestras de tejido de hígado, pulmón, corazón, riñón y bazo, se pesan y se miden en cuanto a radioactividad usando un contador gamma. Las muestras de sangre se centrifugan también, y se recogerán los sobrenadantes y se someten a conteo para calcular las radiomarcas asociadas con el plasma. La relación del pico a la del estándar interno se emplea como parámetro de análisis. Se calculan los parámetros PK usando el programa de computador de mínimos cuadrados no lineales KINFT (Kaltenbach, ML and Vistelle, R (1994) Anticancer Research 14, 2375-2377) ajustando los datos de radioactividad plasmática a una ecuación bi-exponencial (Gibaldi, M. and Perrier, D. (1982) Pharmacokinetics):

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

89

[0166] Donde $A(t) = \%ID/mL$ plasma e $ID =$ dosis inyectada. k_2 se usará para calcular el tiempo de eliminación de primer orden $t_{1/2}$. El área bajo la curva (AUC - *area under the curve*) de la curva concentración del plasma-tiempo, el volumen en estado de equilibrio de la distribución (V_{ss}), depuración del plasma total (Cl) y el tiempo medio de residencia (MRT - *mean residence time*) se calculan de A_1 , A_2 , k_1 , k_2 y el peso corporal (kg) del ratón, como se describe por Gibaldi and Perrier, 1982). El producto permeabilidad-área superficial del órgano (PS - *permeability-surface*) se calcula como:

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

[0167] Donde $CP_{(60min)}$ es la concentración plasmática terminal (dpm/ μL) a 60 minutos después de la inyección, V_d es el volumen de tejido de distribución determinado de la relación de desintegraciones por minuto por gramo de tejido a $C_{p(60 min)}$, y V_o es el volumen plasmático del órgano. El suministro al órgano de las muestras se determina como:

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

[0168] Donde $\%ID/g$ es el porcentaje de dosis inyectada absorbida por gramo de órgano.

EJEMPLO 10: INMUNOLOGÍA

[0169] La CocE puede usarse en adyuvante incompleto de Freund (IFA - *incomplete Freund's adjuvant*) para inmunizar los ratones (véase Tabla 4). Se estableció un ELISA directo específico de anticuerpos CocE por un protocolo estándar. CocE (1 $\mu g/ml$) se utilizó para recubrir una placa de micro-valoración de 96 pocillos empleando una solución amortiguada con borato (1.5 M NaCl, 0.5 M H_3BO_3 , 1.0 M NaOH) para resuspender la cocaína esterasa (50 $\mu L/pocillo$). Las placas recubiertas se dejaron de un día para otro a 4°C. El amortiguador de recubrimiento se retiró a la mañana siguiente y las placas se bloquearon con 2% suero de cabra normal en PBS durante 1 hora a 37°C y se lavaron 3 veces. Se diluyó en serie suero de los distintos grupos de ratones en 50 μL de PBS en los pocillos en un rango de 10^2 a 10^1 y se corrieron en duplicado. Las placas se cubrieron e incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces y [se agregaron] 50 $\mu L/pocillo$ de anticuerpo etiquetado con

90

peroxidasa IgG anti-ratón en cabra diluido a 1:400. Las placas se lavaron entonces 3 veces y se agregaron a cada pocillo 100 µL de solución de sustrato de peroxidasa (OPD disuelto en amortiguador de citratelfosfato). Luego de una incubación de 5-10 minutos (basándose en el desarrollo de color en los controles positivos), se detuvo la reacción usando 3M H₂SO₄ (50 µL/pocillo). Las placas se leyeron a 490 nm y se determinó la valoración por la dilución máxima que mostró incrementos sobre la absorbencia de fondo. Se derivaron controles positivos inmunizando ratones Balb/c con 100 µg en 100 µL de cocaína esterasa emulsionada en adyuvante incompleto de Freund (IPA) mediante inyección intraperitoneal (IP). En el grupo positivo 1 se aisló el suero de los ratones inmunizados 2 semanas. En el grupo positivo 2 los ratones inmunizados se reforzaron usando 100 µg en 100 µL mediante inyección IP 2 semanas de la inmunización pos-primaria y se recolectó el suero luego de una semana adicional (3 semanas pos-primaria).

[0170]Se derivaron valoraciones elevadas de los dos grupos de control positivos inmunizados con CocE, 10⁵ y 10⁶, respectivamente. Las valoraciones de anticuerpo de los animales a los que se administró CocE i.v. durante exposiciones a cocaína demostraron valoraciones detectables pero relativamente bajas, comparadas con los animales de control positivo inmunizados por CocE más IFA. El suero recogido de animales inmunizados una vez con CocE/IFA demostró una alta valoración de 10⁵, mientras que el suero de animales a los que se aplicó un refuerzo adicional tuvo una valoración más alta de 10⁸ (3 ratones/grupo). El suero recogido de estos animales servirá como controles positivos para todos los experimentos de valoración subsiguientes.

TABLA 4: Valoraciones CocE de ratones inmunizados

Grupo	Protocolo	Valoración (dilución log10 +/-SE
Positivo 1 (n=3) 2 semanas	Inmunizados (IFA/IP)	5
Positivo 2 (n=3) 3 semanas	Inmunizados / refuerzo (IFA/IP)	6
Expuestos y tratados (3x)	CocE administrada con cocaína	3.33 +/- 0.333
Expuestos y tratados (4x)	CocE administrada con	3.5 +/- 0.5

91

	cocaína	
--	---------	--

EJEMPLO 11: PEGILACIÓN DE COCE

[0171]La conjugación de uno a dos polímeros PEG por molécula de enzima es generalmente suficiente para proporcionar los efectos protectores deseados (Avramis et al. (2002) Blood 99, 1986-1994). Debido a que se informa que cada molécula de CocE tipo silvestre contiene 8 residuos de lisina, sin ninguna en el sitio activo sino únicamente 2 estando cerca del sitio activo (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307), dianizar lisina para pegilación es improbable que inactive la enzima. La CocE mutante se mezcla con varios polímeros monometoxi-PEG (m-PEG) (con un peso molecular (MW) que varía desde 3-12 KDa); todos contienen un grupo hidroxisuccinil éster funcional N-terminal activado (mPEG-NHS; from Shear Water Inc., Birmingham, AL). Se ensayará primeramente un PEG con un peso molecular de 5.5 KDa, porque los resultados de los inventores y aquellos de otros investigadores (véase a este respecto, Veronese, FM and Harris, JM (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54, 453-456; Avramis et al. (2002) Blood 99, 1986-1994) demostraron que este peso molecular ofrece protección benéfica. Relaciones molares diferentes de [NH₂]:[mPEG] (la primera se calcula con base en las moles totales de residuos de lisina de CocE mutante) que varían de 1:2 a 1:10 se prueban para obtener condiciones óptimas. La conjugación prosiguió durante alrededor de 40 minutos a 4°C agitando suavemente. Los productos de reacción se purifican entonces por ultrafiltración (MWCO 10.000) a 4°C. Se determinan las actividades de los productos de CocE mutante pegilada cuantificando las tasas iniciales de hidrólisis de cocaína utilizando el procedimiento previamente establecido (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307). Adicionalmente, se realiza espectrofotometría MALDi-TOF en estos productos para analizar el grado de pegilación y su peso molecular. Los productos pegilados se almacenan a -40°C y se descongelan inmediatamente antes de sus usos.

[0172]La caracterización estándar, incluida la determinación del pH óptimo, temperatura, resistencia iónica, así como los parámetros cinéticos (por ejemplo, Km, Vm) de los conjugados CocE mutante-PEG se llevan a cabo en PBS. Más aún, se examinan la estabilidad térmica de los productos pegilados y su estabilidad contra degradación proteolítica en la presencia de plasma o sangre humanos. Pruebas funcionales *in vivo* de los productos CocE mutante-PEG se

27

conducen como se describe anteriormente. La vida media *in vivo* y la biodistribución de los conjugados CocE mutante-PEG, comparadas con la CocE libre se realizan como se describe anteriormente (véase Ejemplo 9).

[0173] Se lleva a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos de los experimentos de pegilación. Se efectúa ANOVA aleatoria de doble vía en bloque aleatorio con pos-prueba de Dennett en conjuntos de datos con dos variables usando software GraphPad (San Diego, CA) Prism para Windows y GraphPad. Se efectúa una prueba *t* pareada para experimentos con dos condiciones.

[0174] Puede realizarse asimismo la conjugación de CocE mutante a PEG ramificado de alto peso molecular (por ejemplo, hasta 60 KDa) (véase a este respecto, Reddy et al. (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 571-586).

[0175] Adicionalmente, PEGilación específica del sitio puede ser una alternativa viable para reducir la heterogenicidad funcional y estructural. La eliminación de residuos de cisteína cerca del sitio activo o la incorporación de residuos de cisteína en la superficie de la proteína puede servir como sustratos mejores de PEGilación (a través de acoplamiento de maleimida). Análogamente, puede emplearse acoplamiento con amina de PEG a CocE mediante, por ejemplo, la sustitución conservadora de residuos de arginina para cualesquiera CocE's mutantes (total de nueve lisinas en CocE tipo silvestre, siete de las cuales son lisinas superficiales).

[0176] Hallazgos preliminares han demostrado que la CocE tipo silvestre (WT) se enlazó exitosamente con polímeros de monometoxy-PEG (m-PEG) (peso molecular (MW): 5.5KDa) que contenían un grupo funcional succinimidil activado en un extremo, utilizando los procedimientos descritos anteriormente. Se recuperó un alto rendimiento de actividad CocE inicial (>70%) luego de la reacción de pegilación. Los espectros de masas MALDI-TOF revelaron cuatro picos primarios para los productos PEG-CocE, indicando la presencia de una mezcla heterogénea de los conjugados que contenían diferentes números de cadenas PEG (que variaban de 1 a 4, respectivamente) (véase a este respecto, Figura 19). Se ha sugerido en la literatura que la conjugación de simplemente 1-2 cadenas PEG por molécula de proteína podría producir efectos protectores

inducidos por PEG (Veronese, FM and Harris, JM (2002b) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 457-606; Avramis et al (2002) *Blood* 99, 1986-1994). A este respecto, el método de pegilación empleado aquí satisface aparentemente tal requerimiento.

EJEMPLO 12: ENCAPSULACIÓN EN RBC

[0177] La encapsulación de CocE en RBC puede llevarse a cabo mediante un péptido PTD enlazado. LMWP se selecciona como el péptido PTD para transportar CocE mutante en RBC, debido a su potencia en transferir proteínas a través de la membrana de la célula (Park et al. (2005) *FASEB Journal*, in press) y su carencia de toxicidad (Chang et al. (2001) *AAPS Journal* 3, Article #17, #18 and #19). Para garantizar que la CocE mutante encapsulada se inserte permanentemente en RBC, la conexión entre CocE y LMWP puede degradarse automática y rápidamente una vez los conjugados CocE mutante-LMWP ingresen en RBC. Un conector, tal como un enlace disulfuro (S-S) que se degradará rápidamente en el interior de RBC debido a la presencia de glutatión citosólico elevado y actividad reductasa (Trouet et al. (1982) *Proceeding of the National Academy of Science* 79, 626-629), garantiza que la CocE permanecerá en el RBC.

[0178] Para producir conjugados CocE mutante-LMWP conectados con enlaces S-S, se activa primero con SPDP el grupo amina en el N-terminal de LMWP (éste es el único grupo -NH₂ en LMWP), y la LMWP activada se mezcla entonces con CocE mutante en la presencia de ditioneitol (DTT) para permitir la formación del enlace S-S con uno de los residuos de cisteína libres (cuatro en tipo silvestre) en la CocE mutante (Turner et al. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307); de acuerdo con un procedimiento modificado, desarrollado previamente (Liang et al. (2000) *AAPS Pharmaceutical Science* 2, Article 7). CocE es estable cuando se almacena en DTT (Turner et al. (2002) *Biochemistry* 41, 12297-12307), sugiriendo que es improbable que el uso de estos grupos de cisteína libres para conjugación deteriore la actividad catalítica de esta enzima (la mutación ya realizada de cada cisteína en CocE tipo silvestre en una serina resultó en no disminución de la actividad). El producto LMWP-CocE final se purifica entonces mediante una columna de heparina y se almacena por liofilización.

[0179] La encapsulación se obtiene incubando RBC con CocE mutante-LMWP durante 30-60 minutos. Debido a que la entrada en la célula, mediada por

PTD, es independiente de la temperatura (Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572), la encapsulación se lleva a cabo a 4°C para preservar al máximo la funcionalidad del RBC. El proceso y la magnitud de atrapamiento de la CocE mutante en el RBC se monitorizan por microscopía confocal y análisis de citometría de flujo, usando CocE mutante etiquetada con FITC. La morfología de la CocE mutante atrapada en RBC se examina igualmente mediante SEM.

[0180]La caracterización básica — incluida la evaluación de la funcionalidad del RBC (por ejemplo, actividad de transferencia de oxígeno) y CocE mutante (por ejemplo, actividad hidrolizante de la cocaína, propiedades cinéticas tales como Km, Vm, etc.), fuga de CocE mutante del RBC (es decir, incubando el RBC cargado con CocE mutante en amortiguador y luego cuantificando la actividad enzimática en el sobrenadante), y la estabilidad de la CocE mutante atrapada contra degradación proteolítica — se lleva a cabo en amortiguador o en plasma. Los resultados obtenidos para la CocE mutante encapsulada en el RBC se comparan con los obtenidos para la enzima libre. Pruebas funcionales *in vivo* del RBC encapsulado con CocE mutante se efectúan como se describe anteriormente.

[0181]RBC humanos RBC (de American Red Cross, Detroit, MI) se utilizan para estudios *in vitro*. Para estudios animales *in vivo*, incluidas las pruebas funcionales y los estudios farmacocinéticos, sin embargo, se tienen que utilizar RBC autólogos de la misma especie animal con el fin de evitar la incompatibilidad celular y posibles efectos tóxicos.

[0182]La vida media en la circulación ($t_{1/2}$) de la CocE mutante atrapada en RCB se determina inyectando CocE mutante marcada con ^{125}I (es decir, antes de su carga en los RBC) en ratones, de acuerdo con los mismos procedimientos descritos anteriormente. Cada conjunto de experimentos se componía de 24 ratones. Se sacrifican ratones (3) en intervalos de tiempo de 3, 6, 12, 24 horas y 3, 6, 10 y 15 días. Se recogen muestras de sangre y tejido, se pesan y se miden en cuanto al contenido de radioactividad. Se calculan los parámetros PK incluida la $t_{1/2}$ de eliminación, así como la distribución en el tejido utilizando un programa KINFT, como se describe anteriormente. Los resultados farmacocinéticos obtenidos para la CocE mutante encapsulada en los RBC se comparan con lo obtenidos para la CocE mutante libre.

[0183]Se lleva a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos de los experimentos encapsulación en RBC. Se efectúa ANOVA aleatoria de doble vía en bloque aleatorio con pos-prueba de Dennett en conjuntos de datos con dos variables usando software GraphPad (San Diego, CA) Prism para Windows y GraphPad. Se efectúa una prueba t pareada para experimentos con dos condiciones.

[0184]Para examinar si lo ya sugerido podía cumplir los dos últimos requerimientos, se condujeron estudios preliminares de encapsulación en RBC mediada por PTD usando L-asparaginasa como una enzima modelo. LMWVP, un péptido PTD desarrollado previamente en el Laboratorio del Dr. Yang (Chang et al. (2001) AAPS Journal 3, Article #17, #1, and #19) con potente actividad demostrada de penetración de la membrana (Park et al. (2005) FASEB Journal, in press), se enlazó a asparaginasa empleando un procedimiento similar al descrito anteriormente. Los conjugados LMWP-ASNasa se incubaron entonces con RBC (recolectados de los ratones DBA/2) durante 2 horas a 4°C. Para comparación, se prepararon también RBC-Ghosts que contenían ASNasa encapsulada de acuerdo con los procedimientos previamente establecidos (Updike et al. (1976) Science 193, 681-683). Los resultados preliminares demostraron que la eficiencia de carga del método mediado por LMWP fueron por lo menos comparable con, si no mejores que, la técnica convencional, de ruptura de la célula, basada en ósmosis. Una ventaja principal del método mediado por PTD, sin embargo, es que sólo requiere un solo paso para procesamiento; a diferencia de los otros métodos de ingreso a la célula que requieren pasos múltiples de los procedimientos de carga y lavado.

[0185]Figura 20 presenta imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM – scanning electron microscopy) tomadas de muestras de RBC normales, RBC-Ghost cargados con ASNasa y RBC cargados con LMWP-ASNasa. Como se observa, aunque los RBC cargados con ASNasa del método de ruptura osmótica/resellado (es decir, RBC-Ghost) exhibieron un cambio significativo en forma y morfología, los RBC cargados con LMWP-ASNasa mostraron una forma y morfología virtualmente indistinguibles (es decir, disco bicóncavo) de las de los RBC normales. Estos hallazgos están de acuerdo con los informados por muchos otros investigadores de que la encapsulación de células, mediada por PTD, no

71/96

ocasiona ninguna perturbación o alteración significativas de la membrana de la célula (Dietz, GPH and Bahr, M (2004) Molecular Cell Neurosciences 27, 85-131; Schwarze et al. (1999) Science 285, 1569-1572; Suzuki et al. (2002) Journal of Biological Chemistry 25, 2437-2443).

[0186] Para evaluar aún más estos dos sistemas de encapsulación en RBC, se llevaron a cabo estudios preliminares de depuración. La vida media de la actividad de la ASNasa en plasma se evaluó luego de la inyección intravenosa de: (1) RBC-Ghost cargados con ASNas, y (2) RBC cargados con LMWP-ASNasa. Cada grupo animal se componía de 4 ratones DBA-2, y a cada ratón se le aplicaron 8 unidades de actividad de ASNasa cargada. Se tomaron muestras de sangre en diferentes intervalos de tiempo de la vena de la cola, y se cuantificó la cantidad de actividad de ASNasa en la sangre entera mediante Nesslerización directa del amoníaco producido (Ho et al. (1970) Journal of Biological Chemistry 245, 3708-15). Los resultados demostraron que hubo un aumento casi doble en la vida media en circulación para los RBC encapsulados con LMWP-ASNasa ($t_{1/2}$: 9.2 días) comparada con aquella ($t_{1/2}$: 5.9 días) para el RBC-Ghost (véase a este respecto, Figura 21). Actualmente se desconoce que la diferencia entre las vidas medias de los RBC encapsulados y los RBC normales, no tratados. No obstante, estos resultados de un doble aumento de la $t_{1/2}$ sobre los RBC-Ghost demuestran el mérito de esta estrategia, como se informó en la literatura, de que incluso utilizando el método de encapsulación de RBC-Ghost, la actividad de la ASNasa *in vivo* ya se había prolongado de 26 horas para la ASNasa libre a 29 días para la ASNasa encapsulada en RBC-Ghost (Kravtsoff et al. (1996) European Journal of Clinical Pharmacology 49, 465-470): ya un aumento de 10 veces. Por lo tanto, otro aumento de 2 veces de esta $t_{1/2}$ por el método de encapsulación, descrito en esta especificación, es particularmente efectivo.

[0187] Para confirmar que la ASNasa encapsulada en RBC podía conservar aún sus funciones biológicas originales, se examinaron los efectos anti-neoplásicos tanto por RBC-Ghost-ASNasa como por RBC-ASNasa en ratones con tumores. Se cultivaron células de linfoma de ratón L5178Y, y a cada ratón DBA/2 se inyectaron intraperitonealmente 7×10^5 células cancerosas. Cinco días después de la implantación del tumor, se seleccionaron los ratones con pesos corporales similares y se repartieron en tres grupos: (1) grupo de control al cual se administró solución salina únicamente; (2) RBC-Ghost cargados con ASNasa; y (3) RBC

97

cargados con LMWP-ASNasa. Cada grupo constaba de 5 ratones, y a cada ratón experimental se le administró 0.1 mL de los RBC encapsulados con droga (o Ghost). Los resultados mostraron que los tiempos medios de supervivencia para los grupos de control no tratados, tratados con ASNasa-RBC-Ghost y tratados con LMWP-ASNasa-RBC fueron 10.0, 12.6 y 14.4 días, respectivamente (véase a este respecto, Figura 22). Debe observarse que aunque el tiempo de supervivencia entre los tres grupos difirió únicamente alrededor de 2 días, los efectos del tratamiento con la ASNasa encapsulada en RBC fue todavía bastante dramático – considerando el hecho de que tan sólo 0.1 mL de suspensión de RBC, que era equivalente a simplemente 5% del volumen total de sangre del ratón, se administró a cada ratón durante el tratamiento anti-neoplásico. En general, estos hallazgos con la enzima modelo ASNasa demostraron que la enzima encapsulada en RBC fue aún terapéuticamente activa. Se anota que la cocaína es más permeable a través de la membrana RBC que el sustrato asparaginasa.

[0188] Por lo tanto, la utilización de CocE encapsulada en RBC en tratar afecciones relacionadas con la cocaína es una estrategia efectiva porque la cocaína atraviesa fácilmente la membrana del RBC (y efectivamente alguna parte se concentra en los RBC) (Javaid et al. (1978) Journal of Chromatography 15, 105-113), la encapsulación mediada por PTD no altera las propiedades físicas y/o químicas del RBC, y la enzima encapsulada en RBC funciona como si fuera libre.

EJEMPLO 13: ELIMINACIÓN DE ENDOTOXINA

[0189] La descontaminación de endotoxina de los mutantes CocE puede efectuarse en varias formas. En el mejor de los casos, la descontaminación de endotoxina disminuye la concentración a niveles menores a 10 EU/mg de proteína. Métodos de descontaminación incluyen condiciones alternativas de cromatografía en columna de intercambio iónico, exclusión por tamaño, cromatografía de columna hidrófoba y en polietilenimina (PEI), ultrafiltración y extracción con tensioactivo. Se emplea un sistema de detección de endotoxina (PYROGENT 5000, Cambrex) para determinar el contenido de endotoxina de las preparaciones. El análisis se basa en el factor anti-LPS del lisado de amebocito de Limulus (LAL - *Limulus ameobocyte lysate*). La sensibilidad del análisis está entre 0.01 y 100 EU/ml, bien dentro de los niveles requeridos. El análisis espectrofotométrico se diseña en un formato de placa de microvaloración de 96

98

pocillos. El fraccionamiento de la endotoxina y CocE y/o CocE mutante por los siguientes procedimientos puede examinarse tanto en cuanto al nivel de endotoxina como a la actividad de la cocaína esterasa. La actividad de la cocaína esterasa se mide utilizando un análisis espectrofotométrico que aprovecha la ventaja de la absorción intrínseca de la cocaína a 240 nm. Luego de la hidrólisis, los espectros de absorción revelan una dramática reducción en el pico 240 nm (Turner et al. (2002) Biochemistry 41, 12297-12307).

[0190] Cromatografía de intercambio aniónico: Condiciones actuales implican el uso de cromatografía líquida de rendimiento rápido (FPLC - *performance liquid chromatography*) en una columna Q-Sepharose a pH 8.0 para la descontaminación de endotoxina. Las condiciones de la solución amortiguadora (pH) pueden optimizarse para maximizar tanto la adsorción de CocE y/o CocE mutante como la separación de endotoxina. Se evalúan fracciones obtenidas por la técnica FLUTE ("**fluted fractions**") midiendo la actividad de la CocE o CocE mutante (análisis espectroscópico de la hidrólisis de cocaína, absorción a 240 nm). Los niveles de endotoxina se evalúan usando PYROGENT 5000 (véase más arriba).

[0191] Cromatografía de Exclusión de Tamaño y Ultrafiltración: La endotoxina puede existir como formas monoméricas ($MW \sim 1-2 \times 10^4$) o en forma micelar ($MW \sim 4 \times 10^5$ a 1×10^6), dependiendo de las condiciones de la solución amortiguadora. La presencia de detergentes tales como colato favorece la forma monomérica, mientras que los cationes divalentes (por ejemplo, Ca^{2+}) favorecen la forma micelar (Hirayama, C and Sakata, M (2002) Journal of Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Science 781, 419-432). Esta propiedad de la endotoxina se utiliza para separar la forma micelar (es decir, en la presencia de cationes divalentes tales como Mg^{2+} o Ca^{2+}) de CocE y/o CocE mutante mediante cromatografía de filtración en gel empelando una resina de columna Sephadex 75 o Sephadex 200 (Pharmacia). La endotoxina micelar no debe retenerse en la columna y debe atravesar los espacios vacíos, mientras que CocE y/o CocE mutante deben eluirse como una proteína monodispersada correspondiendo a una proteína de 65 kDa. Análogamente, se evaluará la capacidad de unidades de ultrafiltración para separar las formas micelares de la endotoxina de CocE y/o CocE mutante. Actualmente se dispone de unidades de ultrafiltración con separaciones de peso molecular de 3×10^5 a 1×10^6 , bien dentro del rango

requerido para retener endotoxina micelar pero no CocE en sí.

[0192] Cromatografía en Polietilenimina: Mitzner et al. (1993) y Morimoto et al. (1985) han usado PEI inmovilizada en microesferas de celulosa o en fibra de celulosa, respectivamente, para extraer endotoxina de preparaciones BSA. La columna de cromatografía en PEI es un intercambiador aniónico muy débil que, de hecho, puede sacar ventaja de algunas propiedades hidrófobas de la endotoxina y, por consiguiente, adsorberla preferencialmente. Varias preparaciones de microesferas de PEI-sílice se obtienen de Sigma, dependiendo del tamaño de las microesferas. Aunque las microesferas a base de sílice se asocian más clásicamente con aplicaciones de HPLC, empacaremos columnas para trabajo a menor presión y seleccionaremos los tamaños de ancho de malla de 200 μm .

[0193] Extracción con Triton X-114: La separación de fase con Triton X-114 se ha empleado exitosamente para separar endotoxina de albúmina y catalasa (Aida, Y and Pabst, MJ (1990) J Immunological Methods 132, 191-195). Aida y Pabst informan de una disminución de 1.000 veces en la concentración de endotoxina luego de un paso único de extracción con Triton X-114. Muestras de CocE y CocE mutante se incuban con volúmenes iguales de Triton 114 y se dejan incuban primero en hielo y luego a 37°C durante 15 minutos. La fase Triton X-114 que contiene la endotoxina se retira mediante centrifugación. Como se anotó anteriormente, se ha demostrado que la CocE es considerablemente lábil al calor, pero puede protegerse en cierto modo por la presencia del sustrato, cocaína. Si la incubación de CocE con Triton X-114 a 37°C resulta en una inactivación significativa de CocE, la enzima se estabilizará incluyendo exceso de sustrato durante la extracción.

EJEMPLO 14: MUTAGÉNESIS DEL ORGANISMO HOSPEDERO COCE

[0194] Existen varias cepas bacterianas que exhiben crecimiento sensible a la temperatura en subproductos de cocaína esterada, incluidas varias cepas de *Pseudomonas*, y estos organismos pueden adaptarse para crecimiento sensible a la temperatura en cocaína por la adición del gen CocE codificado en vectores de plásmidos apropiados. Por ejemplo, el gen CocE se secuenció originalmente de *Rhodococcus* MB1 subclonando fragmentos del gen en *Rhodococcus erythropolis*

87
100

CW25, una bacteria incapaz de metabolizar cocaína pero capaz de crecer en los subproductos de cocaína esterasa ecgonina metil éster y benzoato (Bresler et al. (2000) Applied & Environmental Microbiology 66, 904-908). El gen CocE se ha subclonado en vectores lanzadera pJAK-14 y pMMB67EH (véase a este respecto, Ejemplo 1). Estos plásmidos son capaces de expresión en cualquier bacteria gram-negativa incluidas *Pseudomonas* y, adicionalmente, el plásmido pMMB67EH posibilita niveles altos de expresión y facilidad de transformación mediante conjugación bacteriana con el uso del plásmido cooperador pRK2013. La transformación de cualquiera de los dos plásmidos en bacterias que exhiben crecimiento sensible a la temperatura en subproductos de cocaína esterasa (por ejemplo, cepas de *Pseudomonas*), permite el crecimiento sensible a la temperatura en placas que contienen cocaína como fuente exclusiva de carbono. La mutagénesis de las dos cepas de *Pseudomonas*, que contienen el *Rhodococcus* MB1 original y el plásmido CocE, se lleva a cabo usando radiación con luz UV a 260nm. Se determina la concentración de la exposición de modo que se elimine el 90-95% de las células. Las células restantes se recuperan en medio nutriente durante 1 hora a 26°C, se recogen y se enriquecen en la presencia de cocaína como se describe previamente (Britt, et al. (1992) Journal of Bacteriology 174, 2087-2094). El enriquecimiento se lleva a cabo a 37°C para seleccionar las variantes termoestables de la CocE. Finalmente, las células se esparcen sobre placas con medio agar mínimo que contienen 10mM de cocaína y se incuban a 37°C. Se desarrollan colonias únicas y se examinan con respecto a actividad CocE a 37°C. La amplificación por PCR del gen CocE se realiza en mutantes que se descubrió que producen CocE activa y soluble a 37°C, y los productos de amplificación se subclonan en el plásmido pET-22B(+) para posterior caracterización. Como preludio a la mutagénesis de CocE, puede ser necesario mutagenizar las cepas *Pseudomonas* nativas con el fin de preseleccionar en cuanto a no sensibilidad a la temperatura a 37°C cuando crecen en productos de hidrólisis de cocaína, y luego demuestran sensibilidad a la temperatura en cocaína a 37°C luego de clonarse en CocE.

EJEMPLO 15: MÉTODO DE DETECCIÓN SELECTIVA DE GRAN PRODUCTIVIDAD PARA IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES COCE TERMOESTABLES

[0195] Se implementaron varios métodos de detección selectiva de

9/101

gran productividad para la identificación de variantes CocE termoestables. Debido a que la enzima tipo silvestre es conocida por tener inestabilidad térmica a temperaturas por encima de 30°C, luego de la transformación en células BL21 de *E. coli*, se subcultivan colonias y se induce la expresión de proteína a 16°C. A continuación las proteínas expresadas se examinan con respecto a actividad esterasa a temperaturas de 30°C y más. Después de varias rondas de mutagénesis y experimentación a temperaturas crecientes se logran los mutantes termoestables. Se prepara entonces cada CocE mutante individual, se purifica y examina con respecto a actividad y termoestabilidad a 37°C, como se describe más arriba (véase los Ejemplos 1 y 4)

[0196] Colonias bacterianas, que contienen polipéptidos mutantes, se detectan selectivamente directamente de placas de agar mediante huella en filtro de nitrocelulosa de placas de replicación, seguida por lisis de las bacterias y fijación de proteína. La determinación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas se logra monitorizando la acumulación de ácido benzoico, el subproducto ácido de la (-)cocaína. Una huella húmeda de nitrocelulosa se pone sobre un papel de filtro seco, saturado previamente con una mezcla de cocaína con un pH de 7.4 sin solución amortiguadora y un indicador de pH que pasa de incoloro a color luego de la acidificación, por ejemplo, rojo metilo. Se identifica la enzima activa por el cambio de color y se recolectan las colonias en la forma apropiada. El método de detección, basado en la acidificación a través de la formación de ácido benzoico, se emplea para la detección de la expresión celular de anticuerpos catalíticos que hidrolizan la cocaína en el grupo éster de benzoilo, el mismo sitio escindido por CocE. Alternativamente, la detección por huella de nitrocelulosa se obtiene por exposición a un derivado tiol de cocaína y detección subsiguiente de grupos sulfhidrilo mediante un sistema indicador de metal pesado precipitante (por ejemplo, a base de mercurio).

[0197] Las colonias bacterianas que contienen los polipéptidos mutantes se detectan también selectivamente subcultivando en medio líquido y examinando directamente en cuanto a la presencia de actividad cocaína esterasa empleando un derivado tiol de cocaína y detección utilizando el indicador tiol colorimétrico, reactivo de Ellman (véase a este respecto, Figura 6). El reactivo de Ellman forma rápidamente un enlace disulfuro con los grupos tiol libres y libera un ión tiolato coloreado que absorbe a 412 nm. Los cultivos incubados de un día para

97
102

otro a 16°C en la presencia de IPTG para inducir la expresión de proteína (20µl) se mezclan con 1mM de derivado de cocaína benzoiltioéster, y 500uM de reactivo de Ellman en 100mM de fosfato sódico, pH 7.4, a un volumen final de 200µl. Los resultados (véase a este respecto, Figura 6) indican que las células que contienen la enzima CocE tipo silvestre son capaces de escindir el benzoiltioéster en niveles mucho más elevados que las células solas.

[0198] Finalmente, las colonias bacterianas que contienen polipéptidos mutantes se detectan selectivamente subcultivando en medio líquido, seguido por lisis y aislamiento de polipéptidos mutantes usando un medio de afinidad. Por ejemplo, células lisadas se lavan a través de placas con filtro de agarosa-níquel que permiten la recolección y elución subsiguiente de proteínas marcadas 6xHIS (por ejemplo, Ni-NTA Superflow 96-Bio-robot kit (Qiagen). Alternativamente, las células se desintegran por lisis en placas de microvaloración recubiertas con níquel, que permiten la unión de proteínas de fusión 6xHIS y la extracción subsiguiente de contaminantes (por ejemplo, placas inmovilizantes con quelato de níquel (Nunc) o placas flash con quelato de níquel NEN (Perkin Elmer)). Análogamente, células lisadas se incuban con microesferas recubiertas con níquel (tales como las microesferas de agarosa magnéticas Ni-NTA (Qiagen)), seguidas por extracción subsiguiente de las proteínas contaminantes. La actividad de la proteína esterasa aislada se examina entonces usando cualquiera de los análisis mencionados previamente (tales como el análisis de actividad espectrofotométrico (Ejemplos 1 y 4), el análisis de actividad de la cocaína tritiada (Ejemplo 1), el análisis de actividad con indicación del pH del ácido benzoico, los sistemas de detección de cocaína con el derivado tiol, el empleo de aptámeros de cocaína (Stojanovic, M. N., de Prada, P. & Landry, D. W. (2001) J Am Chem Soc 123, 4928-31; Stojanovic, M. N. & Landry, D. W. (2002) J Am Chem Soc 124, 9678-9) monitorizando los cambios en fluorescencia luego de la degradación de la cocaína, o mediante el uso de un sustrato genérico de esterasa tal como 4-nitrofenil acetato y monitorización de los cambios colorimétricos a 420nm como se describe previamente (Halgasova, N. et al. (1994) Biochem J 298 Pt 3, 751-5; O'Conner, C.J. & Manuel, R.D. (1993) J Dairy Sci. 76:3674-3682).

EJEMPLO 16: ANÁLISIS PRELIMINAR DEL POLIPÉPTIDO MUTANTE N197K

86
(03)

[0199]Análisis preliminares del polipéptido mutante N197K (SEQ ID NO: 42) mostraron excelente estabilidad luego de 1 hora a 37°C el día 0. Los valores Vmax y Km se muestran en la Tabla 5. Una segunda verificación el día 3 mostró una estabilidad similar. Los valores Vmax y Km se muestran en la Tabla 6. Los valores Km más elevados el día 3 se debieron a la reutilización de la cocaína vieja. La filtración en gel de las muestras incubadas a 37°C mostró la formación de agregados.

TABLA 5: Prueba inicial de N197K (Día 0)

	N197K (0)	N197K(60)
Ecuación 1		
Valores de ajuste óptimo		
VMAX	2928	2187
KM	34.77	24.24

TABLA 6: Prueba inicial de N197K (Día 3)

	N197K (0)	N197K(60)
Ecuación 1		
Valores de ajuste óptimo		
VMAX	3357	3085
KM	102.2	113.5

EJEMPLO 17: IDENTIFICACIÓN DE POLIPÉPTIDOS COCE MUTANTES TÉRMICAMENTE ESTABLES

[0200] Polipéptidos CocE mutantes térmicamente estables se identificaron determinando el $t_{1/2}$ de los polipéptidos CocE mutantes. En pocas palabras, las enzimas se preincubaron a 37°C durante tiempos diferentes. Las mediciones de la actividad se determinaron a temperatura de la sala (RT – *room temperature*) (25°C). Las enzimas mutantes con $t_{1/2}$ de más de 12 minutos (el $t_{1/2}$ de la CocE tipo silvestre) se consideraron térmicamente estables (véase, por ejemplo, Figura 27 y Tabla 7). Como se demostró por el polipéptido CocE mutante de combinación T172R/G173Q, en varias incorporaciones, la combinación de dos mutaciones únicas con ninguna estabilidad o estabilidad más baja puede resultar

87
104

en una combinación térmicamente estable.

TABLA 7: Polipéptidos CocE mutantes térmicamente estables

Mutante	Estabilidad @37°C (t _{1/2})
T122A	No
Q123E	No
S159A	No
S140A	No
S167A/W52L	No
T172R	~46 minutos
V121D	No
L163V	No
F189A	No
F189A/T172R	~40 minutos (similar a T172R)
C107S	No
W220A	No
F189L	No
A193D	No
T172R/A193D	~40 minutos (similar a T172R)
G173Q	~25 minutos
T254R	No
N42V	No
T172R/G173Q	~326 minutos
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 minutos
T172R/G173Q-T176-G-G-D185	-75 minutos
S177Q	No
D45R	No
F47R	No

88
105

L169K	~274 minutos
L174R	No
A181K	No
S179R	No
F189K	25 minutos
V190K	No
A194K	No
R182K	No

**EJEMPLO 18: PROTECCIÓN CONTRA AGREGACIÓN DE LOS
MUTANTES DE COCAÍNA ESTERASA TERMOESTABLES**

[0201] La protección contra agregación de los mutantes CocE termoestables se evaluó usando cromatografía de exclusión molecular. Concretamente, se preincubaron las enzimas a 37°C durante 0 minutos o 60 minutos y se resolvieron mediante cromatografía de exclusión molecular. Los resultados para la CocE tipo silvestre, T172R y T172R/G173Q se muestran en Figura 28.

**EJEMPLO 19: ESPECTROS DE BAJA ABSORCIÓN UV (LOW-UV
SPECTRA)**

[0202] Datos de espectros CD de baja absorción UV se obtuvieron usando un espectropolarímetro Aviv Mode 400, con la ayuda de Norma Greenfield, UMDNJ, que empleaba un soporte de 5 celdas y 0.2mg/ml de concentraciones de proteína. Los valores de los datos brutos se calibraron en PBS de control, se emparejaron (la curva se alisó estadísticamente) y se restauraron ("**deconvoluted**") utilizando el algoritmo CCA, como se describe por A. Perczel, K. Park, and G.D. Fasman, [Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide. Analytical Biochemistry 203, 83-93 (1992).] Este algoritmo encuentra el número mínimo de curvas necesarias para reconstruir un conjunto de datos, y expresa el porcentaje en que cada curva contribuye al conjunto de datos como una función de la temperatura.

89
106

[0203] Más adelante se presenta un análisis de restauración CCA con baja absorción UV ("*a low UV CCA deconvolution analysis*") de CocE tipo silvestre (WT) y 4 mutantes, obtenido en una fusión de espectros CD únicos usando un soporte de 5 celdas. El experimento se llevó a cabo durante un período de 8 horas, de 0-80°C.

[0204] Se observó fusión dependiente de la temperatura entre las longitudes de onda examinadas (200-250nm), y los espectros emparejados (alisados estadísticamente) para cada mutante se muestran en Figura 29. La restauración mediante el algoritmo CCA indicó que cada uno de los espectros se describió mejor por un conjunto de tres curvas, como se muestra en Figura 30. Esto sugiere que la fusión de CocE es por lo menos un proceso de dos pasos, que se mueve de una curva original (curva 1) a un paso de desenvolvimiento intermedio (curva 2) y, finalmente, una proteína completamente desnaturalizada (curva 3). La contribución porcentual (%) que cada temperatura ejerció en describir estas tres curvas se ilustra en Figura 31. Se empleó análisis de respuesta a la dosis para aproximar la temperatura a la cual el espectro inicial se fusiona (1), la formación y fusión del estado intermedio (2), y la acumulación de la proteína completamente fusionada (3). Estos números de recolectaron y graficaron en Figura 32 y se muestran en Tabla 8.

TABLA 8: Puntos de fusión de cada paso

	Fusión #1	Formación #2	Fusión #2	Formación #3
—●— WT	37.04	34.57	50.98	59.86
—■— T172R	39.22	38.11	54.56	56.85
—●— T172R-A193D	38.11	46.47	47.68	58.72
—×— T172R-F189K	38.8	46.81	48.42	57.23
—*— T172R-G173Q	40.62	45.61	46.17	56.61

[0205] El mutante más termoestable T172R-G173Q (según se determinó en otros análisis) mostró la temperatura de fusión más alta de la curva original 1 (40°C vs 37°C para el tipo silvestre), y la temperatura más baja para la desaparición del intermedio de la curva 2 (46°C vs 50°C para el tipo silvestre) y la aparición de la curva de fusión completa 3 (56°C vs 59°C para el tipo silvestre).

907
107

[0206] En resumen, es evidente que todos los mutantes experimentan un proceso de fusión de 2 pasos.

EJEMPLO 20: ESTABILIZACIÓN UTILIZANDO PRODUCTOS E INHIBIDORES

[0207] La cocaína esterasa (CocE) escinde la cocaína para producir ácido benzoico y ecgonina metil éster. Concretamente, se investigaron sustratos alternativos e inhibidores de cocaína, así como compuestos capaces de termoestabilizar la enzima, generalmente sustituyendo amida y análogos de tiol en el enlace éster reactivo, o eliminando el enlace (para inhibidores), sustituyendo análogos de benzolilo en lugar del grupo saliente ácido benzoico, y/o eliminando o alterando el grupo metil éster en la porción ecgonina de la molécula. Tal como se discute a continuación, se determinó que algunos sustratos, productos e inhibidores estabilizaron la desnaturalización térmica de la CocE tipo silvestre, así como evitaron la agregación inducida térmicamente en electroforesis en gel.

[0208] La cocaína es el sustrato natural de la cocaína esterasa (CocE). La escisión de la cocaína se monitorizó por una caída en absorbencia a 240nm. La cocaína (rango mM) impidió la formación inducida a 37°C de agregados de CocE de alto peso molecular (concentraciones de enzima de 0.1 mg/ml) (véase, por ejemplo, Figura 33). La cocaína (cantidades uM) estabilizó la pérdida de actividad inducida a 37°C (véase, por ejemplo, Figura 34), si bien el mecanismo de esta estabilización es complicado debido a la inhibición del sustrato en concentraciones más altas.

[0209] El ácido benzoico es el producto natural de la CocE y un débil inhibidor de la escisión por CocE de 4-nitrofenil acetato (K_i 310uM). El ácido benzoico impidió la formación inducida a 37°C de agregados de CocE de alto peso molecular (concentraciones de enzima de 0.1 mg/ml) (véase, por ejemplo, Figura 35). El ácido benzoico estabilizó (cantidades uM) la pérdida de actividad inducida a 37°C (véase, por ejemplo, Figura 36), si bien el mecanismo de esta estabilización es complicado debido a la inhibición del sustrato en concentraciones más altas.

21
108

[0210] CocE cataliza la escisión de 4-nitrofenil acetato (4NPA) en 4-nitrofenol (4NP) y acetato. Se monitorizó la reacción de escisión mediante observación de la formación de producto a 400 nm. Tanto el 4NP como el 4NPA (rango mM) impidieron la formación inducida a 37°C de agregados de CocE de alto peso molecular (concentraciones de enzima de 0.1 mg/ml).

[0211] El ácido fenilbórico es un potente inhibidor de CocE (K_i 250nM). El ácido fenilbórico estabilizó la agregación inducida a 37°C de CocE con una EC_{50} de 0.2UM mediante análisis de densitometría.

[0212] Usando lo anterior, se desarrolla un análisis de detección selectiva para identificar selectivamente pequeñas moléculas que podrían estabilizar análogamente la enzima la enzima pero que no necesariamente ocupan el sitio activo. Las moléculas identificadas como moléculas estabilizadoras se emplean para estabilizar las proteínas divulgadas en esta especificación hasta que estén listas para uso.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de cocaína esterasa (CocE) mutante aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en donde por lo menos un residuo de aminoácido se sustituye de tal modo que el polipéptido CocE mutante tenga actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C comparado con la CocE tipo silvestre.
2. El polipéptido CocE aislado de la reivindicación 1, en donde se sustituyen por lo menos dos residuos de aminoácido.
3. El polipéptido CocE aislado de la reivindicación 2, en donde se sustituyen por lo menos tres residuos de aminoácido.
4. El polipéptido CocE aislado de la reivindicación 3, en donde se sustituyen por lo menos cuatro residuos de aminoácido.
5. El polipéptido CocE aislado de la reivindicación 4, en donde se sustituyen por lo menos cinco residuos de aminoácido.
6. Un polipéptido de cocaína esterasa mutante aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO: 3 (L163V); SEQ ID NO: 7 (V225I); SEQ ID NO: 8 (I218L); SEQ ID NO: 9 (A310D); SEQ ID NO: 10 (A149S); SEQ ID NO: 11 (S159A); SEQ ID NO: 12 (S265A); SEQ ID NO: 13 (S56G); SEQ ID NO: 14 (W220A); SEQ ID NO: 16 (S140A); SEQ ID NO: 17 (F189L); SEQ ID NO: 18 (A193D); SEQ ID NO: 19 (T254R); SEQ ID NO: 20 (N42V); SEQ ID NO: 21 (V262L); SEQ ID NO: 22 (L508G); SEQ ID NO: 23 (Y152H); SEQ ID NO: 24 (V160A); SEQ ID NO: 25 (T172R); SEQ ID NO: 26 (Y532F); SEQ ID NO: 27 (T74S); SEQ ID NO: 28 (W285T); SEQ ID NO: 29 (L146P); SEQ ID NO: 30 (D533S); SEQ ID NO: 31 (A194R); SEQ ID NO: 32 (G173Q); SEQ ID NO: 33 (C477T); SEQ ID NO: 34 (K531A); SEQ ID NO: 35 (R41I); SEQ ID NO: 36 (L119A); SEQ ID NO: 37 (K46A); SEQ ID NO: 38 (F84Y); SEQ ID NO: 39 (T172R-G173Q); SEQ ID NO: 40 (L169K); SEQ ID NO: 41 (F189A); SEQ ID NO: 42 (N197K); SEQ ID NO: 43 (R182K); SEQ ID NO: 44 (F189K); SEQ ID NO: 45 (V190K); SEQ ID NO: 46 (Q191K), y SEQ ID NO: 47 (A194K), o u fragmento funcional de las mismas.

9/11/20

7. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido CocE mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

8. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica, que se hibrida a SEQ ID NO: 2 o al complemento de SEQ ID NO: 2 bajo condiciones de alta restricción, en donde el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido CocE mutante que tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C, comparado con CocE tipo silvestre.

9. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido CocE mutante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido CocE mutante codificado tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C, comparado con CocE tipo silvestre.

10. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 7 en donde la identidad de secuencia se selecciona del grupo conformado por 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% por lo menos.

11. El polipéptido o ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en donde el aumento en termoestabilidad del polipéptido CocE mutante sobre la CocE tipo silvestre es por lo menos alrededor de 2.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.3 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.4 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.5 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.6 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.7 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.8 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.9 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.0 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.3 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.4 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.5 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.6 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.7 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.8 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.9 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.0 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.3 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.4 kcal/mol, o por lo menos alrededor de 4.5 kcal/mol.

9/4
111

12. El polipéptido o ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en donde el polipéptido CocE mutante tiene inmunogenicidad reducida, comparado con la CocE tipo silvestre.

13. El polipéptido o ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en donde el polipéptido CocE mutante tiene por lo menos alrededor de 60%, por lo menos alrededor de 65%, por lo menos alrededor de 70%, por lo menos alrededor de 75%, por lo menos alrededor de 80%, por lo menos alrededor de 85%, por lo menos alrededor de 90%, por lo menos alrededor de 95%, por lo menos alrededor de 100%, por lo menos alrededor de 105%, por lo menos alrededor de 110%, por lo menos alrededor de 115%, por lo menos alrededor de 120%, por lo menos alrededor de 125%, por lo menos alrededor de 130%, por lo menos alrededor de 135%, o por lo menos alrededor de 140% de la actividad esterasa del polipéptido CocE tipo silvestre.

14. El polipéptido o ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en donde el polipéptido CocE mutante conserva por lo menos una eficiencia catalítica sustancialmente la misma o mayor del polipéptido CocE tipo silvestre.

15. Una composición farmacéutica que contiene el polipéptido CocE mutante o el polipéptido CocE mutante codificado por el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y una sustancia portadora o excipiente farmacéuticamente aceptable.

16. El polipéptido, polipéptido codificado por el ácido nucleico, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el polipéptido CocE mutante se pegila.

17. El polipéptido, polipéptido codificado por el ácido nucleico, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el polipéptido CocE mutante se encapsula en un glóbulo rojo.

18. El polipéptido, polipéptido codificado por el ácido nucleico, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en

9/3
(12)

donde el polipéptido CocE mutante se estabiliza por un sustrato o inhibidor.

19. El polipéptido, polipéptido codificado por el ácido nucleico, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 7-18, en donde el polipéptido comprende una pluralidad de sustituciones de residuo de aminoácido seleccionadas del grupo conformado por: T122A; 123E; S159A; S140A; S167A/W52L; T172R; V121D; L163V; F189A; F189A/T172R; C107S; W220A; F189L; A193D; T172R/A193D; G173Q; T254R; N42V; T172R/G173Q; G171Q/T172R/G173Q; G171A; G173A; wt-M75-G-D185; wt-T176-G-G-D185; T172R/G173Q-I175-G-D185; T172R/G173Q-I175-G-G-A186; T172R/G173Q-T176-G-G-D185; S177Q; D45R; F47R; L169K; L174R; A181K; S179R; F189K; V190K; A194K; y R182K.

20. Un método de tratar una afección inducida por la cocaína, que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad efectiva del polipéptido CocE mutante, el polipéptido CocE mutante codificado por el ácido nucleico, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19.

21. El método de la reivindicación 20, en donde la afección inducida por la cocaína se selecciona del grupo conformado por sobredosis de cocaína, toxicidad de la cocaína, adicción a la cocaína y dependencia de la cocaína.

22. Un método de detección selectiva de gran productividad para la identificación de polipéptidos CocE mutantes termoestables, que comprende los pasos de:

transformar establemente una célula con un ácido nucleico que codifica un polipéptido CocE mutante;

expresar el polipéptido CocE mutante en la célula;

aislar el polipéptido CocE expresado;

medir la actividad esterasa del polipéptido CocE mutante aislado a una o más temperaturas predeterminadas de por lo menos alrededor de 30°C hasta alrededor de 50°C, para determinar la termoestabilidad de los polipéptidos CocE mutantes aislados;

seleccionar el polipéptido CocE mutante aislado con actividad esterasa a la temperatura(s) predeterminada.

23. El método de detección selectiva de gran productividad de la reivindicación 22 en donde medir la actividad esterasa de los polipéptidos mutantes aislados comprende:

contactar el polipéptido CocE mutante aislado con (i) cocaína y un indicador de pH o (ii) un tio-derivado de cocaína y un indicador de tiol;

detectar un cambio en el indicador de pH o el indicador de tiol; en donde un cambio del indicador de pH o el indicador de tiol se correlaciona con la formación de ácido benzoico de la hidrólisis de cocaína o derivado de cocaína por el polipéptido CocE mutante.

24. El método de detección selectiva de gran productividad de una cualquiera de las reivindicaciones 22-23 que comprende además repetir uno o más pasos del método de detección selectiva por lo menos una vez con una temperatura incrementada para medir la actividad esterasa.

25. El método de detección selectiva de gran productividad de la reivindicación 24 en donde un primer ciclo de detección selectiva tiene una primera temperatura para medir la actividad esterasa de alrededor de 30°C, y un ciclo subsiguiente de detección selectiva tiene una temperatura para medir la actividad esterasa de alrededor de 45°C.

26. El método de detección selectiva de gran productividad de una cualquiera de las reivindicaciones 22-25 en donde la expresión del polipéptido CocE mutante ocurre a una temperatura a la cual la CocE tipo silvestre conserva sustancialmente actividad catalítica.

27. El método de detección selectiva de gran productividad de una cualquiera de las reivindicaciones 22-25 en donde la expresión del polipéptido CocE mutante ocurre a una temperatura a la cual el polipéptido CocE tipo silvestre se divide sustancialmente en cuerpos de inclusión.

9A
114

SEQ_LIST_2nd_revised_88800730_0078
LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> COMPOSICIÓN ANTI-COCAÍNA Y TRATAMIENTO

<130> 88800730-0003

<140> PCTUS0715762

<141> 2007-08-03

<150> 60/819,569

<151> 2006-07-10

<160> 47

<170> Versión PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 574

<212> PRT

<213> Rhodococcus sp. MB1

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

98
415

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

```

accgatctga cgatgaccga tctgatggag ttcttccggc actggcatgc cgggcgttcg 2160
caggttcaga tctcaccggc gtttgggata gaccgcaaaa cctgacttgc acaagttgac 2220
ggcggtttcc ggactcggct gacatttgcg caagtagaag gccccgcggg ttcgggattt 2280
ggcgactaa cgggtcggta aaatctggcg agtggcggcg tacattcgca aggtcaggac 2340
cgcatcgggg gcgaccgcgg tgcagatcgc cgtcaagcag ggacgtcgcg acaaggtgcg 2400
tcgagcacct cggttccgca cacaccgaca gcgagcttgc tgcgctactg caggccgccg 2460
aggagaagct gcaggtcggg cagtaggaac tcgacctcga cctcggcggt agcggggatc 2520
gagggtcggt gatcgcggcg aagcgggtccc gctggttgat cgaggcgatc gagaccggat 2580
gacggcggct cggcttcgac gtgatcgacg acgaggtgtt catctaactg gtgatcggca 2640
ggctcgtcga accgacctcg atgagcgaca ccggccggga atcgccgaga tc 2692

```

<210> 3
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido CocE mutante
 <400> 3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

116 gg

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 4
- <211> 574
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Polipéptido CocE mutante
- <400> 4

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

100
117

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

515

520

525

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

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

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

<210> 5
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

191
118

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

405

410

415

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 6

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

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

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

102
119

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

<210> 7
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
Página 15

103
120

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 8

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

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

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

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

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
Página 17

104
121

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

<210> 9
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

105
nr

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 10

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

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

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

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

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

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

10/8
123

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

107
124

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

<210> 12
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

108
125

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 13

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

101
126

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078
520 525

515

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

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

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

<210> 14
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

110
128

405 SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078 410 415

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 15

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

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

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

111
120

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078
Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
545 550 555 560

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

<210> 16
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
Página 37

112
129

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 17
- <211> 574
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Polipéptido CocE mutante
- <400> 17

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

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

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

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

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
Página 39

117
130

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

<210> 18
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

131

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 19

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

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

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

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

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

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

113
132

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

116
133

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

<210> 21
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

134 / 17

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 22

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

118
135

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078
520 525

515

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

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

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

<210> 23
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

136

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

405

410

415

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 24

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

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

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

120
137

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078
Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
545 550 555 560

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

<210> 25
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu

181
138

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 26

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

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

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

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

Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
Página 61

122
139

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

<210> 27
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

123
940

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 28

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

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

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

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

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

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

124
141

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

125
142

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

<210> 30
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

126
143

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 31

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

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078
520 525

515

520

525

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

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

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

```
<210> 32
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial
```

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 32

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

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

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

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

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

Glu Gly Glu Phe⁸⁵ Val Pro His Val Asp⁹⁰ Asp Glu Ala Asp Ala Glu⁹⁵ Asp

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

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

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

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

128
145

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

405

410

415

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

<210> 33

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 33

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

129
146

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078
Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
545 550 555 560

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

<210> 34
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Ser Asp Ala Arg Pro Glu Asp Ala Ala Asp Phe Val Gln Leu
Página 81

130
147

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

<210> 36
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 36

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

1483

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 37

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

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

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

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

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

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

132
149

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

133
150

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

<210> 39
<211> 587
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

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

134
151

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 40
<211> 587
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 40

15213

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

500

505

510

Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
515 520 525
Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
530 535 540
Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
545 550 555 560
Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Lys Leu
565 570 575
Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
580 585

<210> 41
<211> 587
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 41

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

136
153

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078
375 380

370

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido CocE mutante

133
154

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

His His His His His His
580

- <210> 43
- <211> 582
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Polipéptido CocE mutante
- <400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

138
157

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078
Ala Asn Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Leu Ser Thr Ser Ile Ser Gly
370 375 380
Thr Glu Ser Ala Asp Thr Tyr Leu Tyr Asp Pro Ala Asp Pro Val Pro
385 390 395 400
Ser Leu Gly Gly Thr Leu Leu Phe His Asn Gly Asp Asn Gly Pro Ala
405 410 415
Asp Gln Arg Pro Ile His Asp Arg Asp Asp Val Leu Cys Tyr Ser Thr
420 425 430
Glu Val Leu Thr Asp Pro Val Glu Val Thr Gly Thr Val Ser Ala Arg
435 440 445
Leu Phe Val Ser Ser Ser Ala Val Asp Thr Asp Phe Thr Ala Lys Leu
450 455 460
Val Asp Val Phe Pro Asp Gly Arg Ala Ile Ala Leu Cys Asp Gly Ile
465 470 475 480
Val Arg Met Arg Tyr Arg Glu Thr Leu Val Asn Pro Thr Leu Ile Glu
485 490 495
Ala Gly Glu Ile Tyr Glu Val Ala Ile Asp Met Leu Ala Thr Ser Asn
500 505 510
Val Phe Leu Pro Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Ser Ser Ser Asn
515 520 525
Phe Pro Lys Tyr Asp Arg Asn Ser Asn Thr Gly Gly Val Ile Ala Arg
530 535 540
Glu Gln Leu Glu Glu Met Cys Thr Ala Val Asn Arg Ile His Arg Gly
545 550 555 560
Pro Glu His Pro Ser His Ile Val Leu Pro Ile Ile Lys Arg Leu Glu
565 570 575
His His His His His His
580

<210> 44
<211> 582
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

139
156

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

His His His His His His
580

<210> 45
<211> 582
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

140
151

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

287
158

SEQ_LIST_2nd_Revised_88800730_0078

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

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

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

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

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

His His His His His His
580

<210> 47
<211> 582
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido CocE mutante

<400> 47.

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

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

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

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

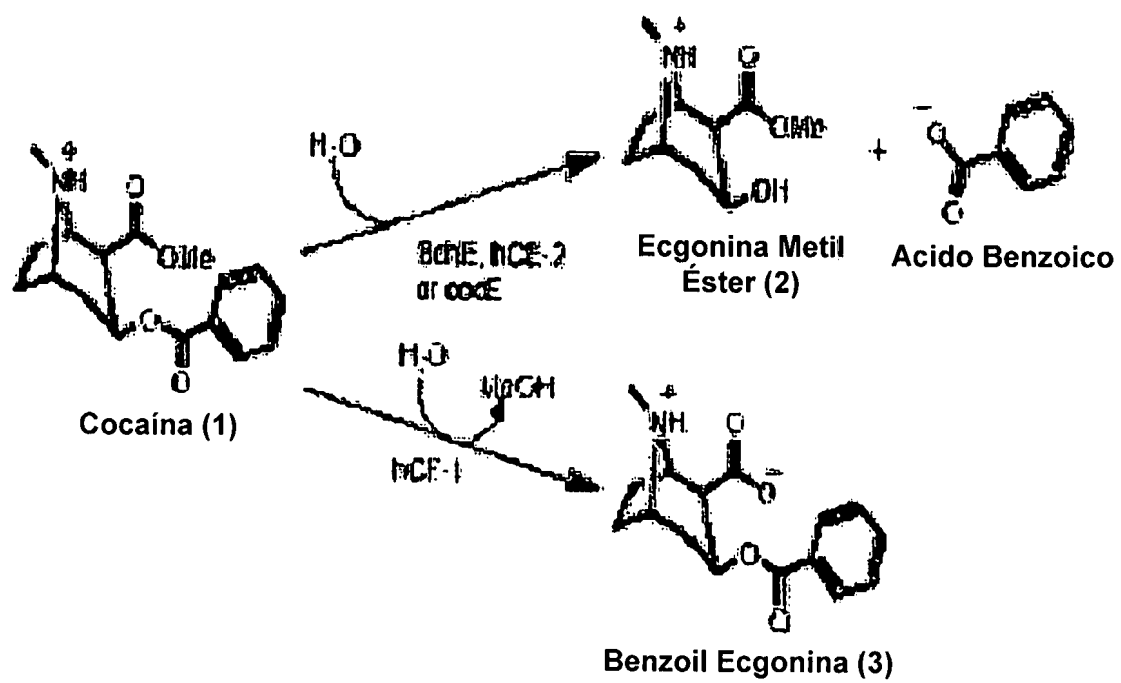
Asp Gly Tyr Ala Val Val Ile Gln Asp Thr Arg Gly Leu Phe Ala Ser
65 70 75 80

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

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

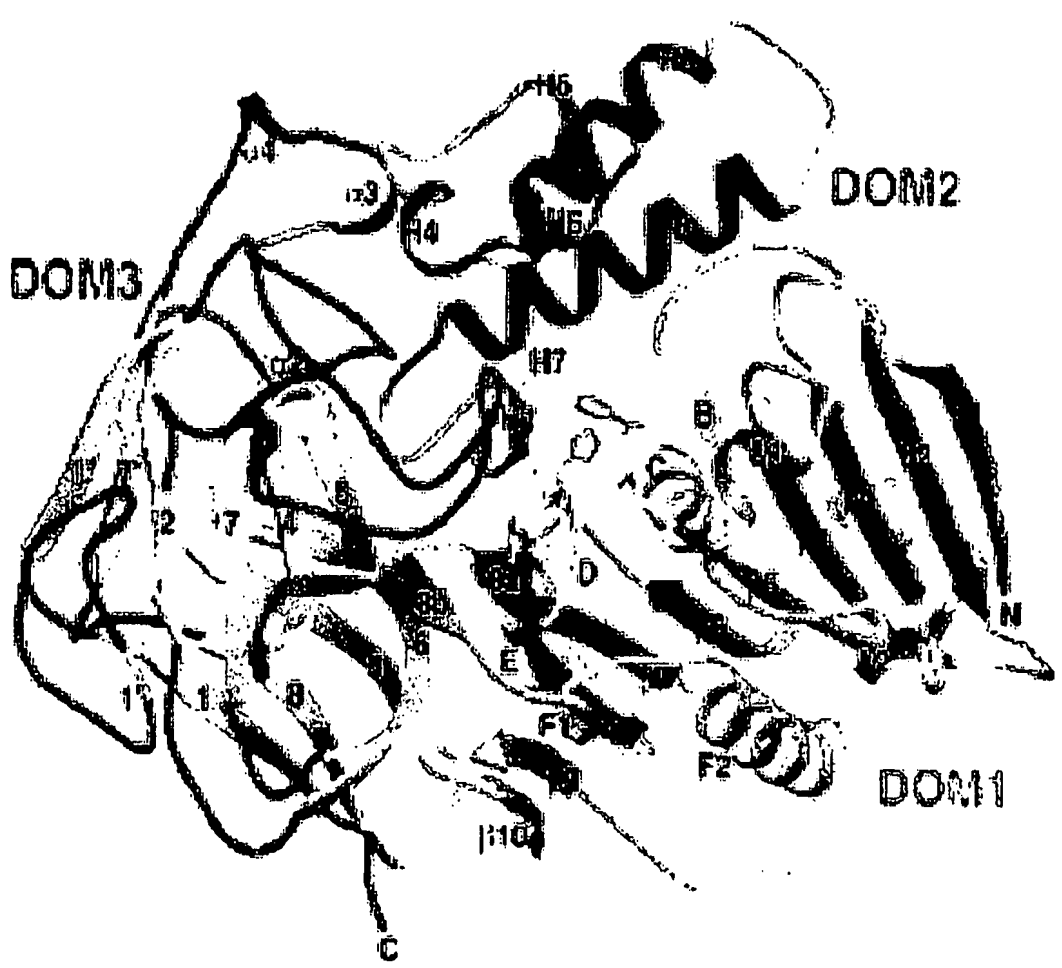
149
154

FIG. 1



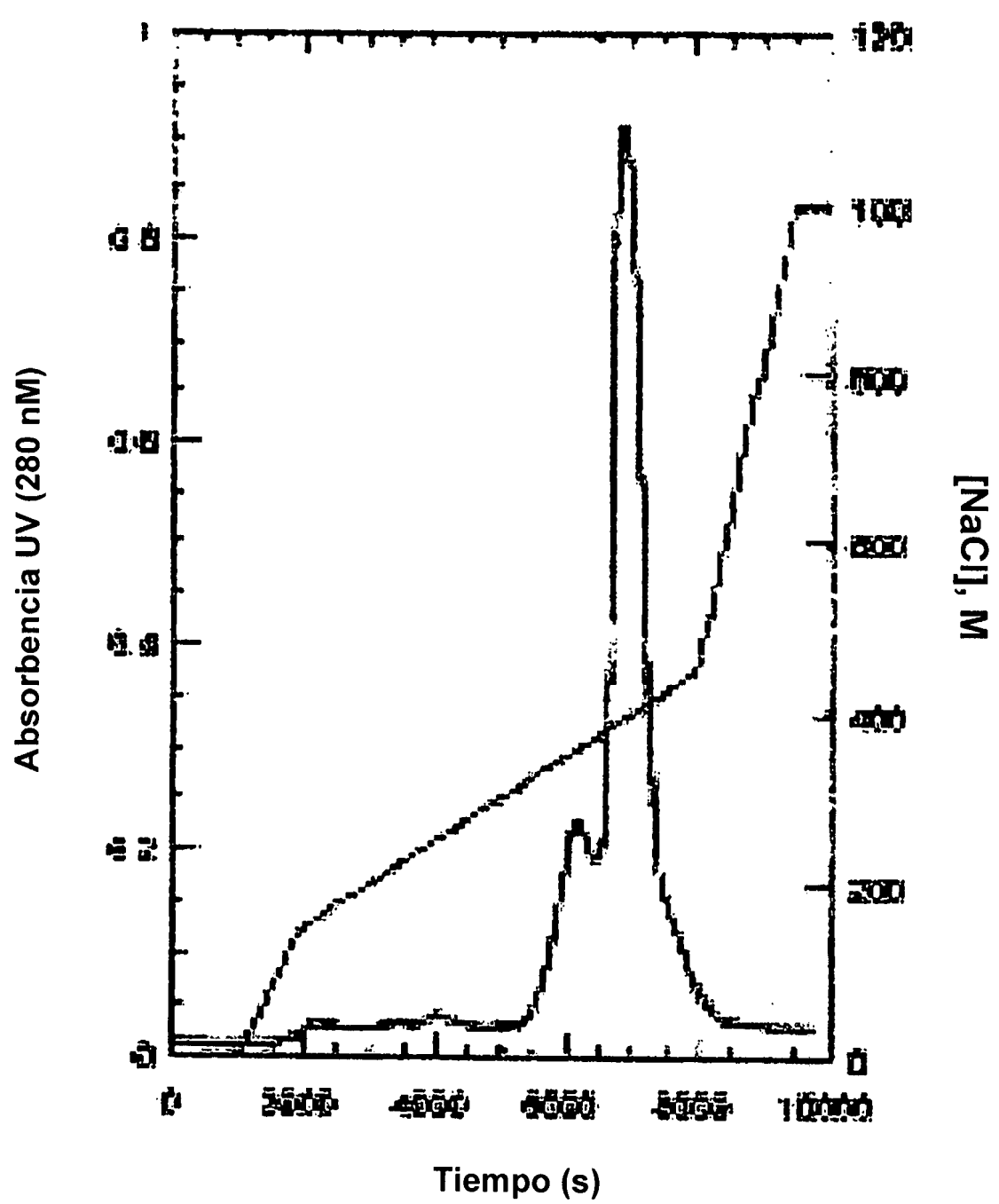
173
160

FIG. 2



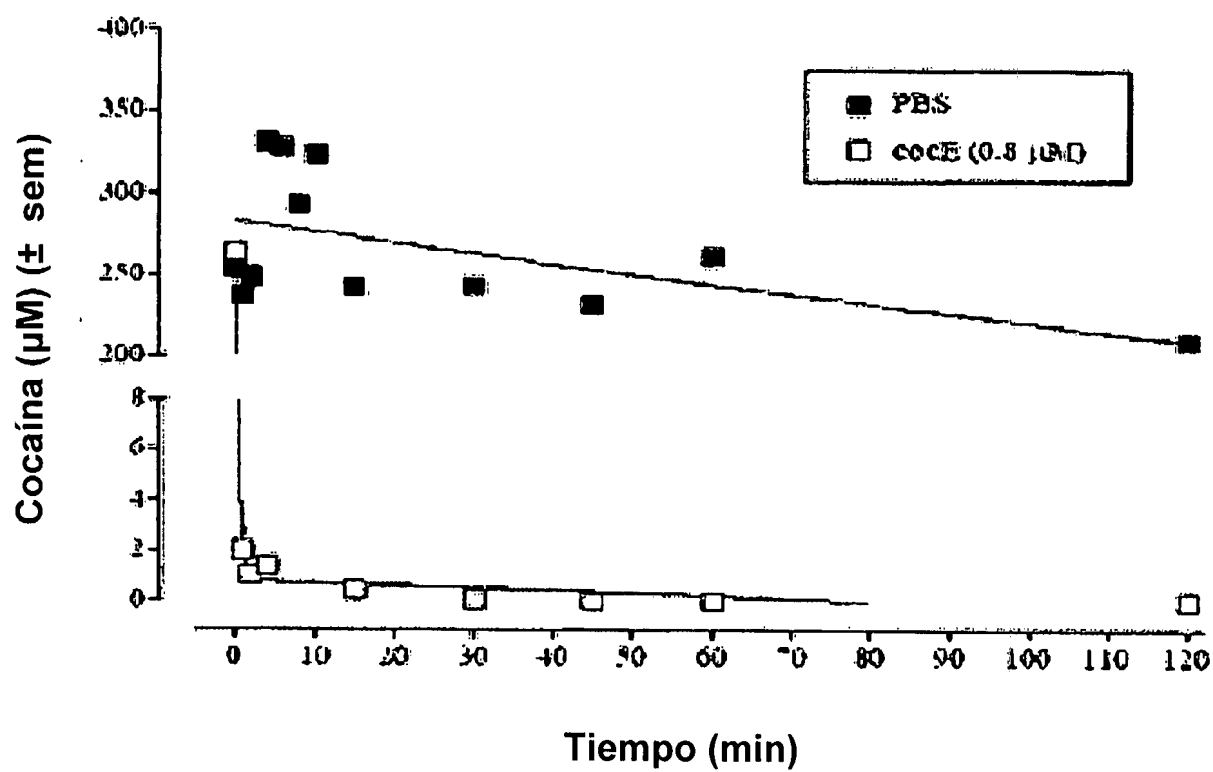
148
161

FIG. 3



145
162

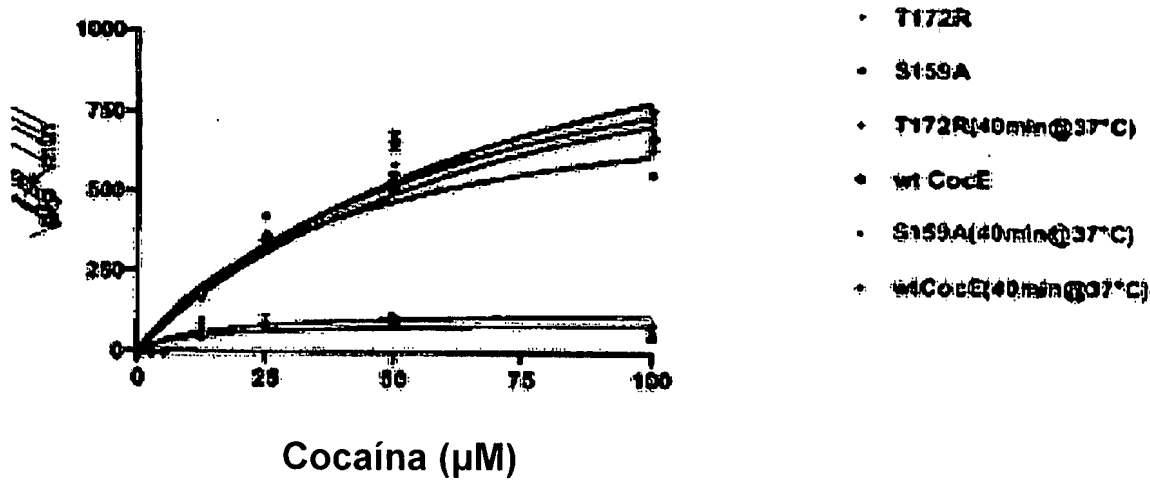
FIG. 4



148
163

FIG. 5

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



147
164

FIG. 6

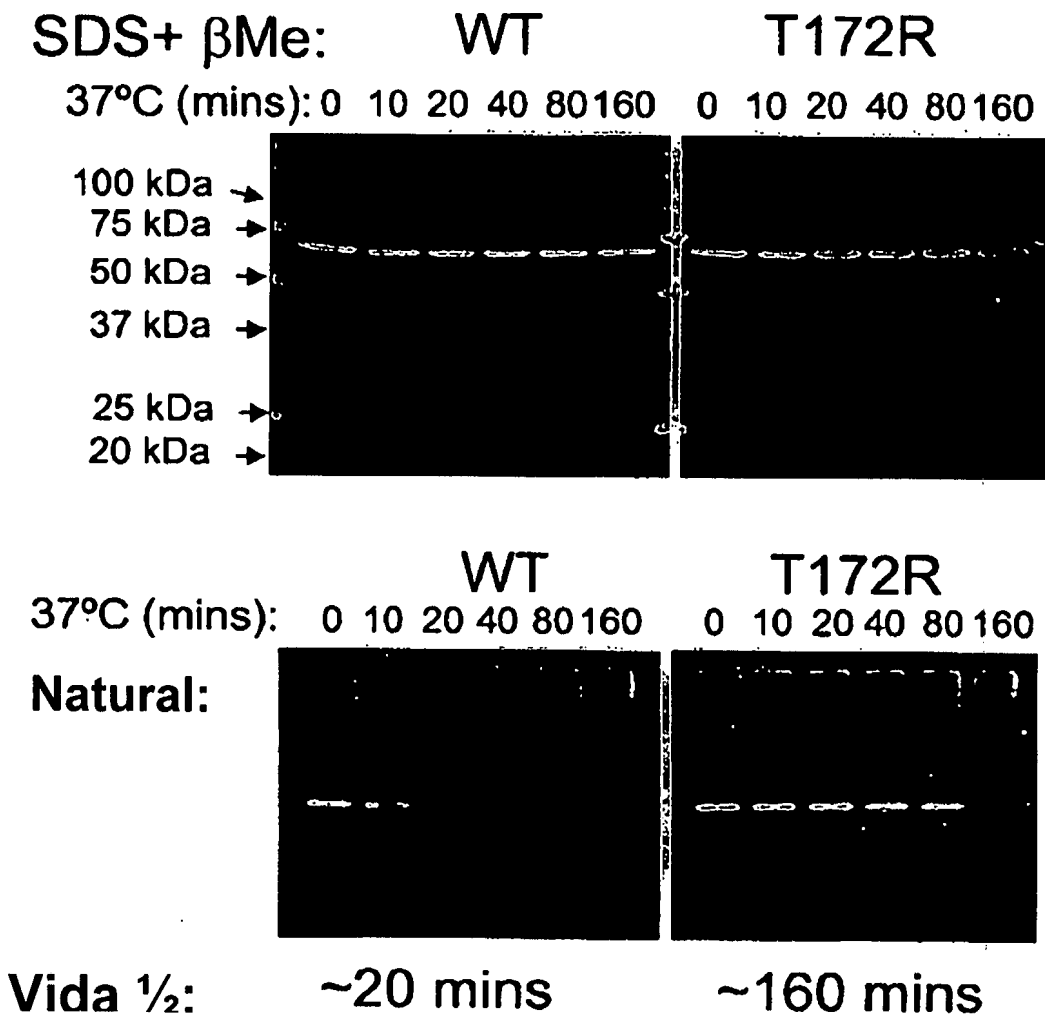
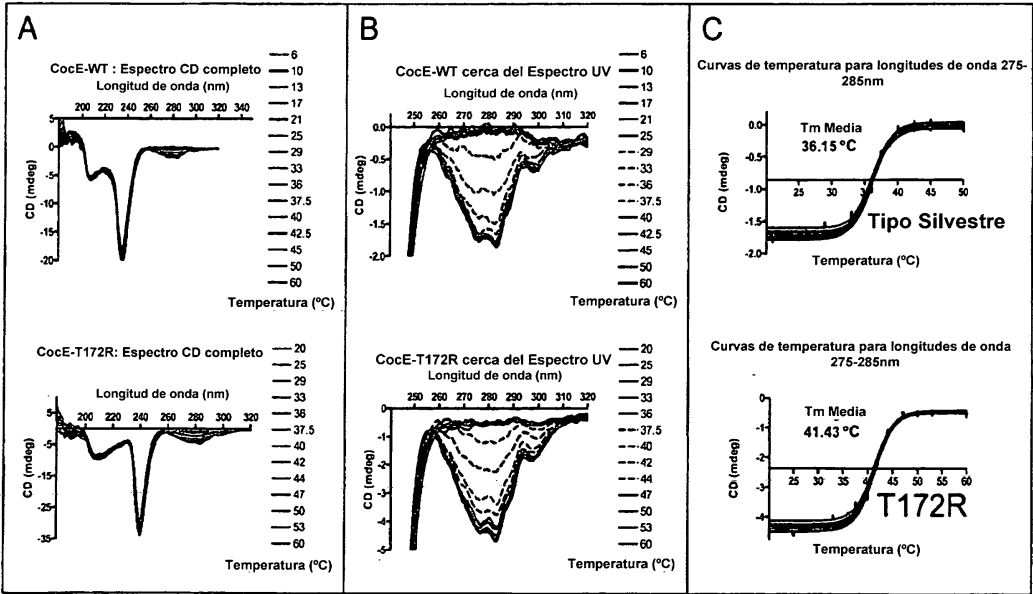
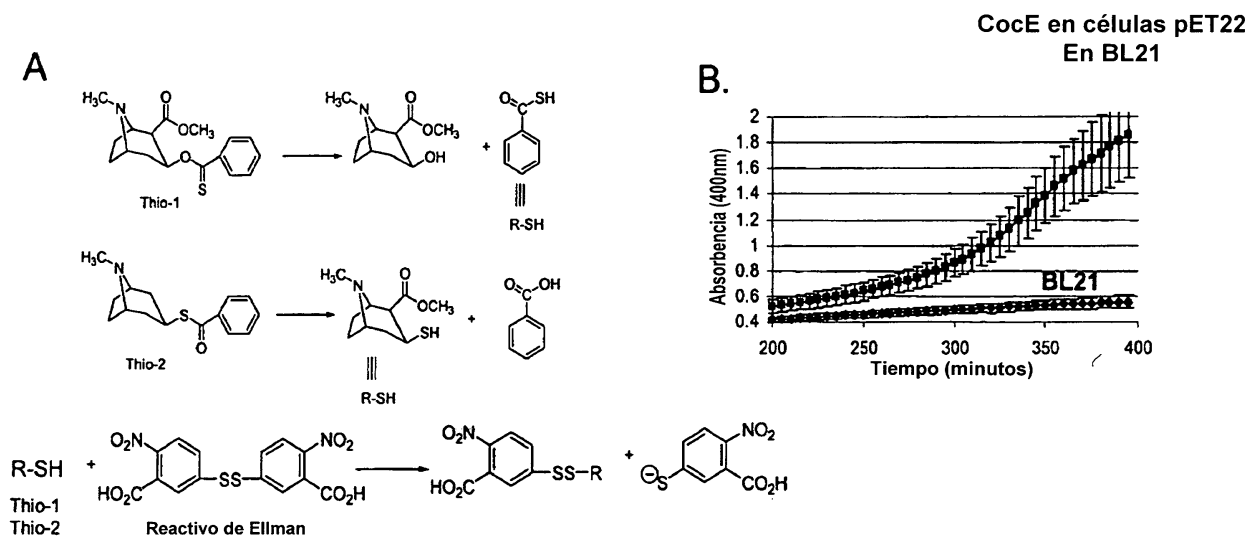


FIG. 7



165

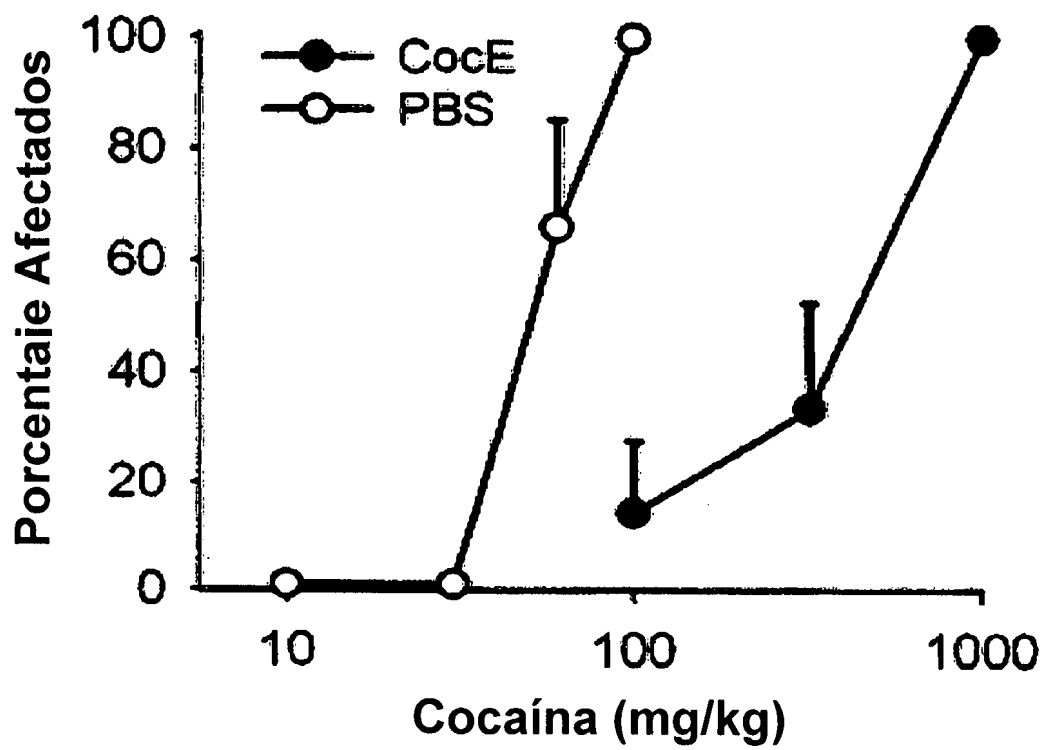
FIG. 8



168

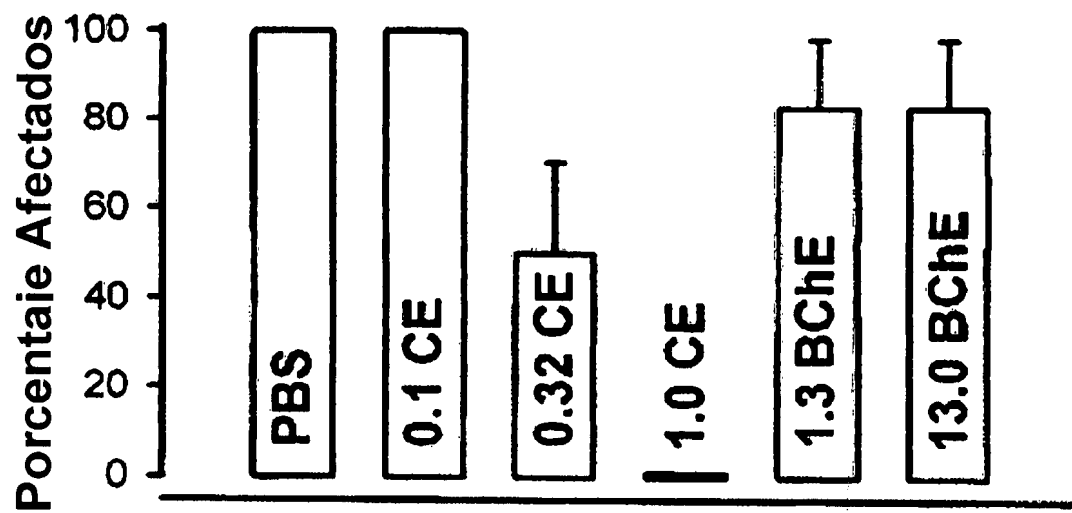
150
16x

FIG. 9



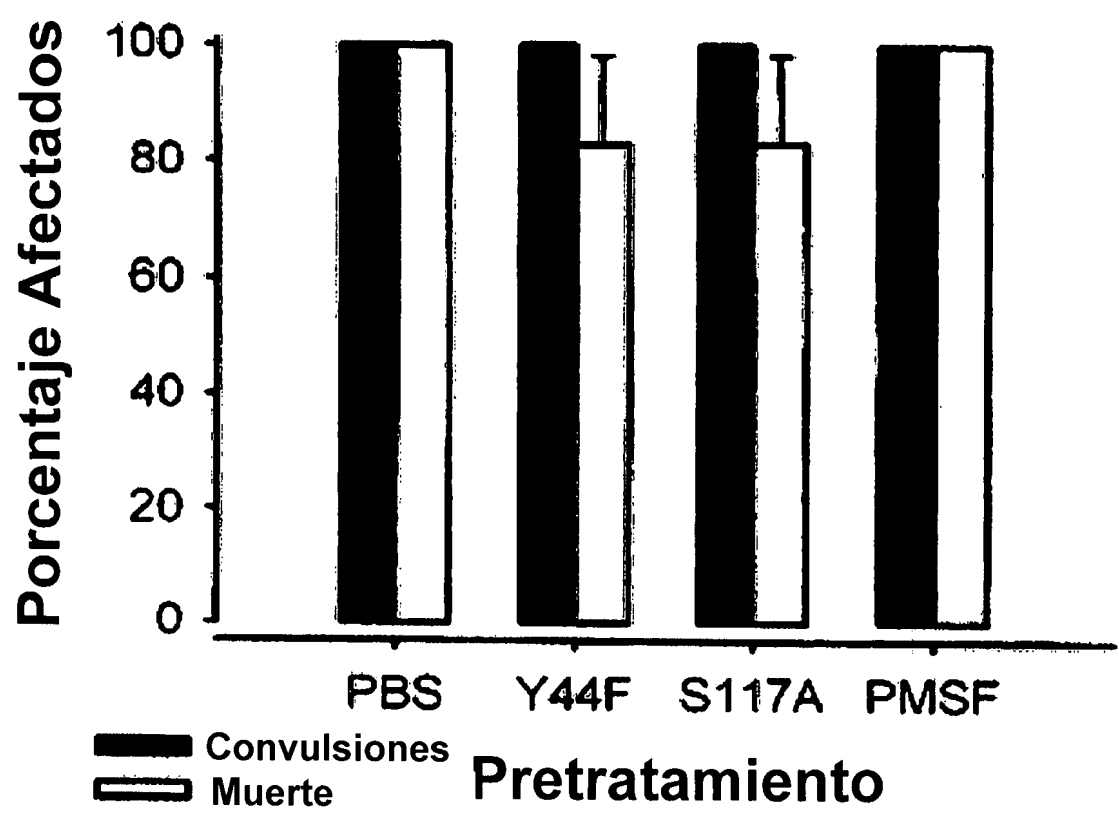
~~157~~
168

FIG. 10



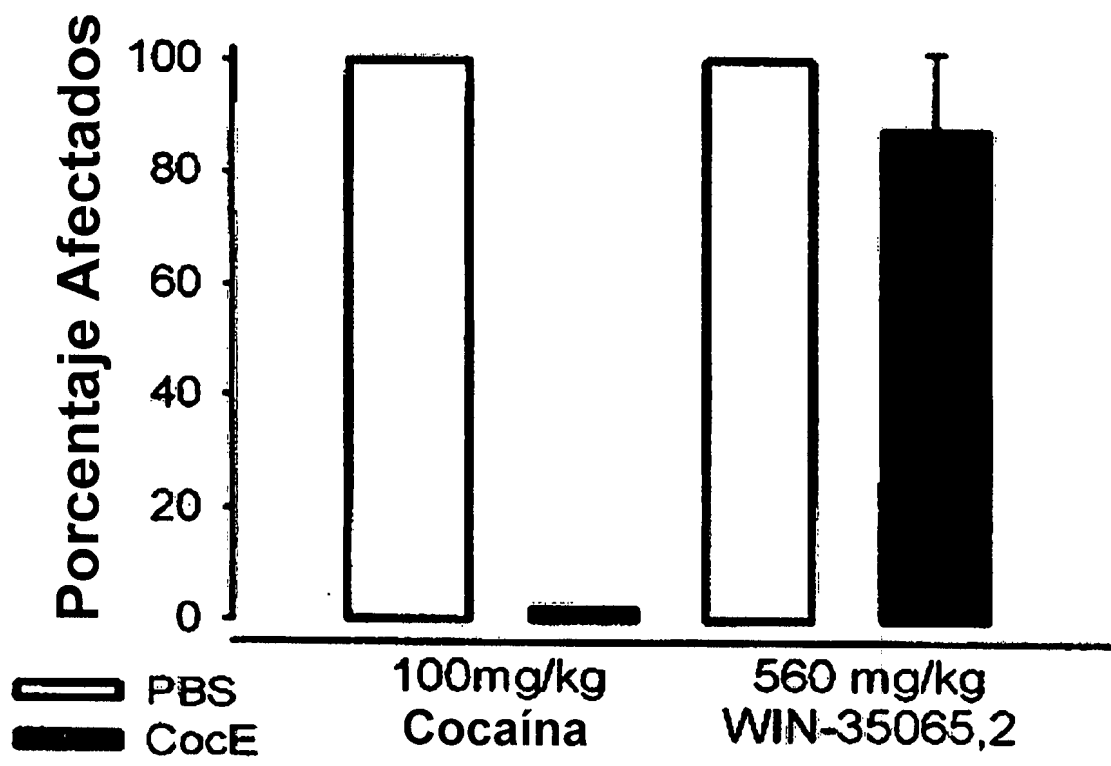
152
169

FIG. 11



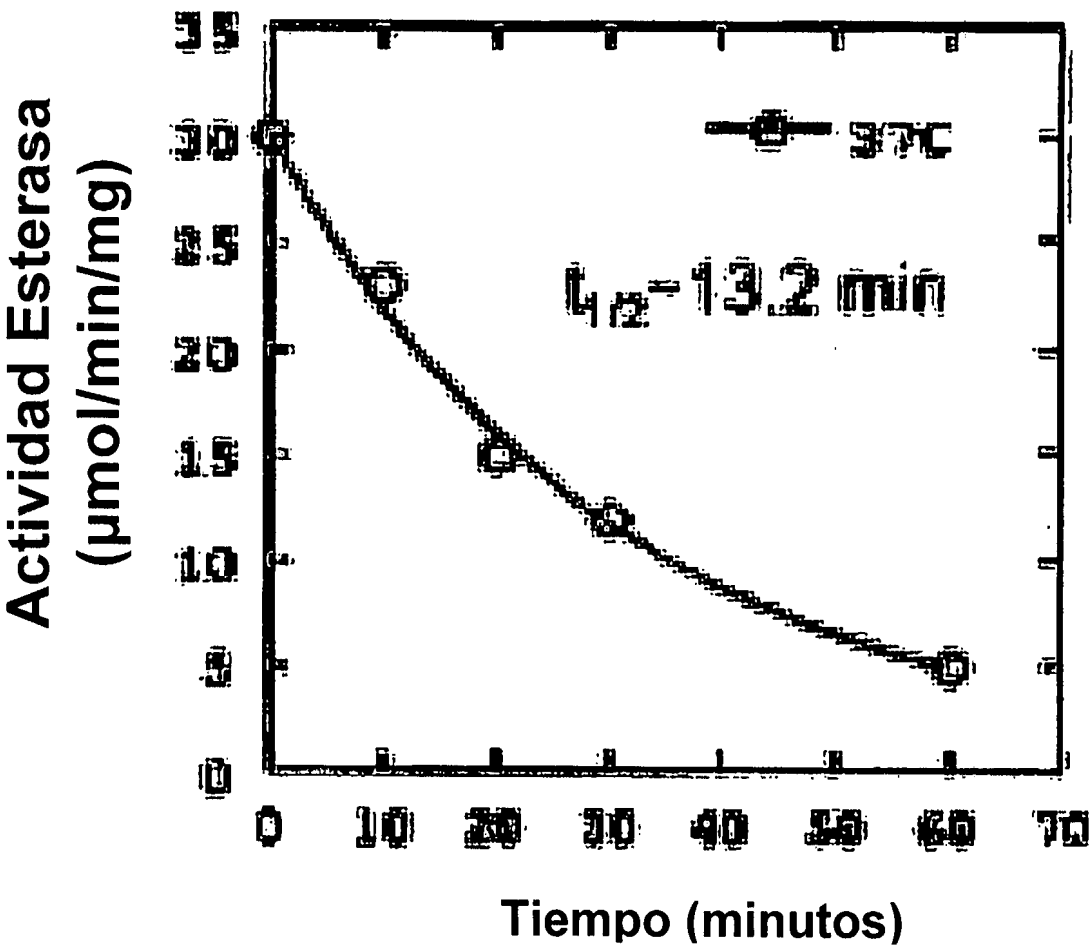
153
170

FIG. 12



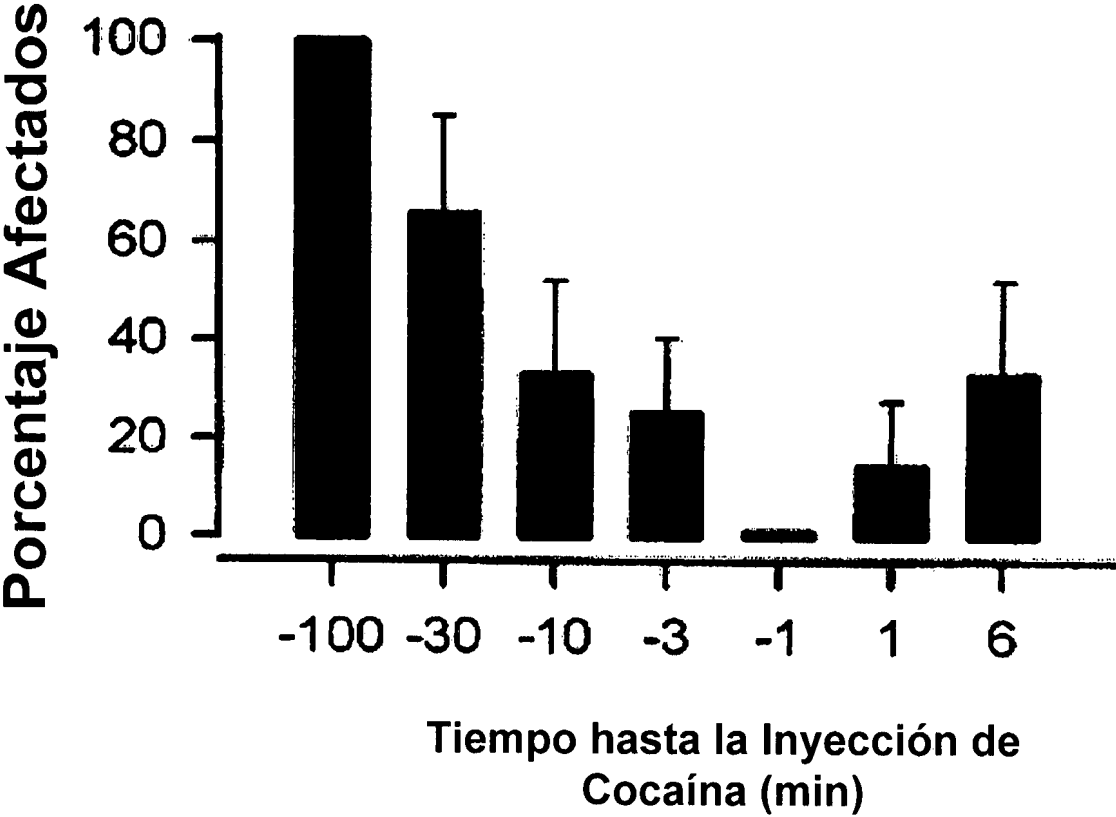
154
171

FIG. 13



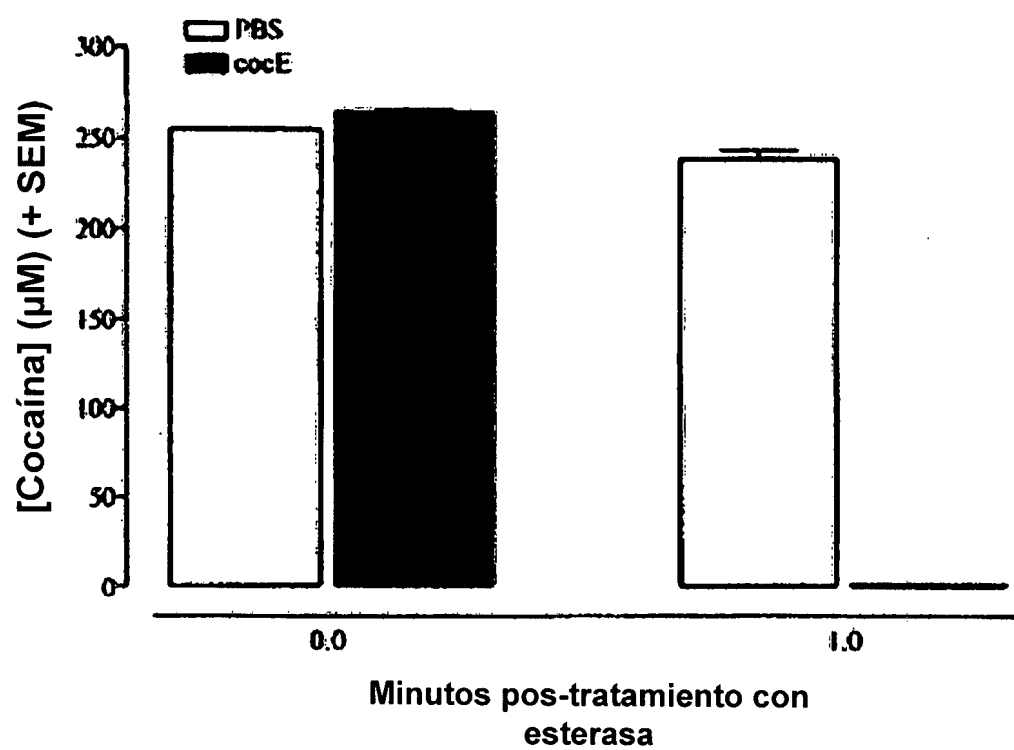
153
172

FIG. 14



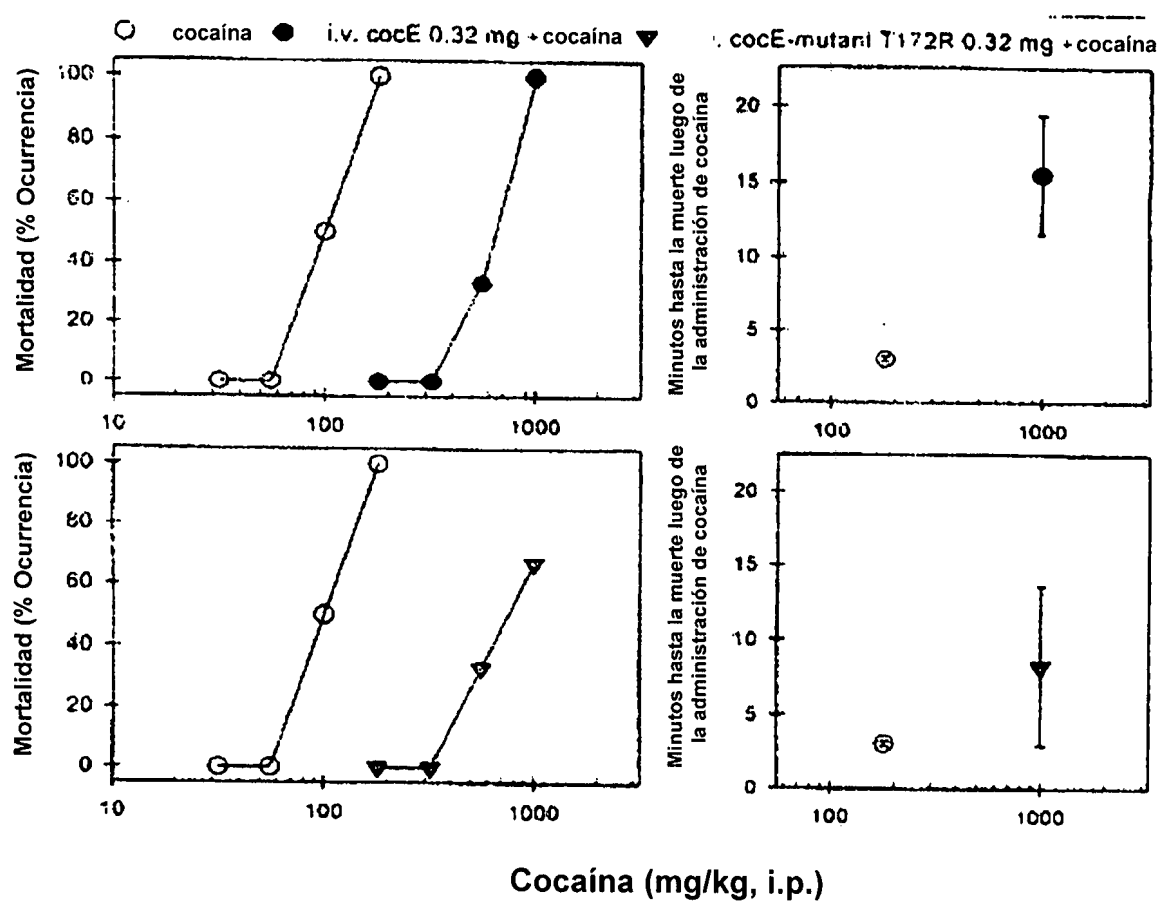
156
173

FIG. 15



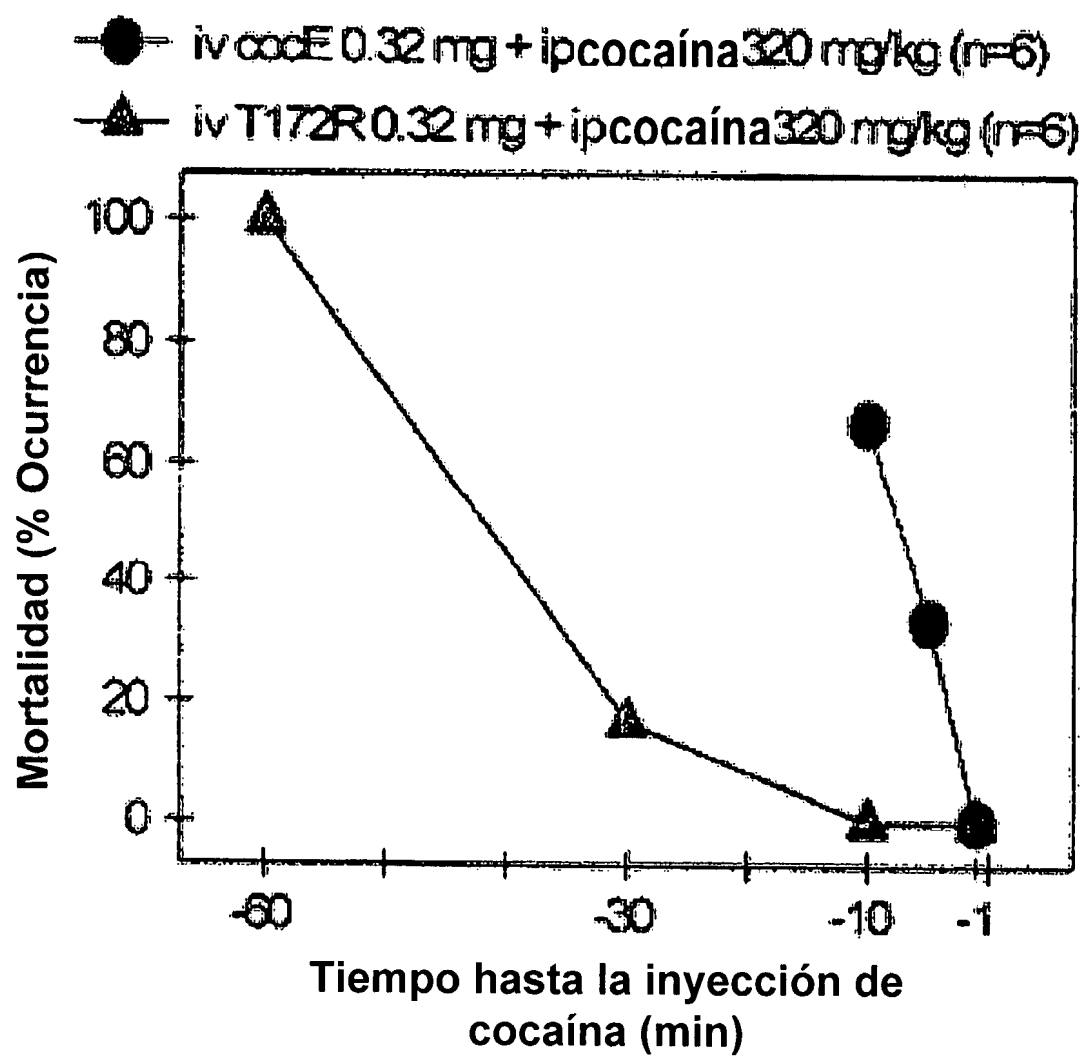
157
174

FIG. 16



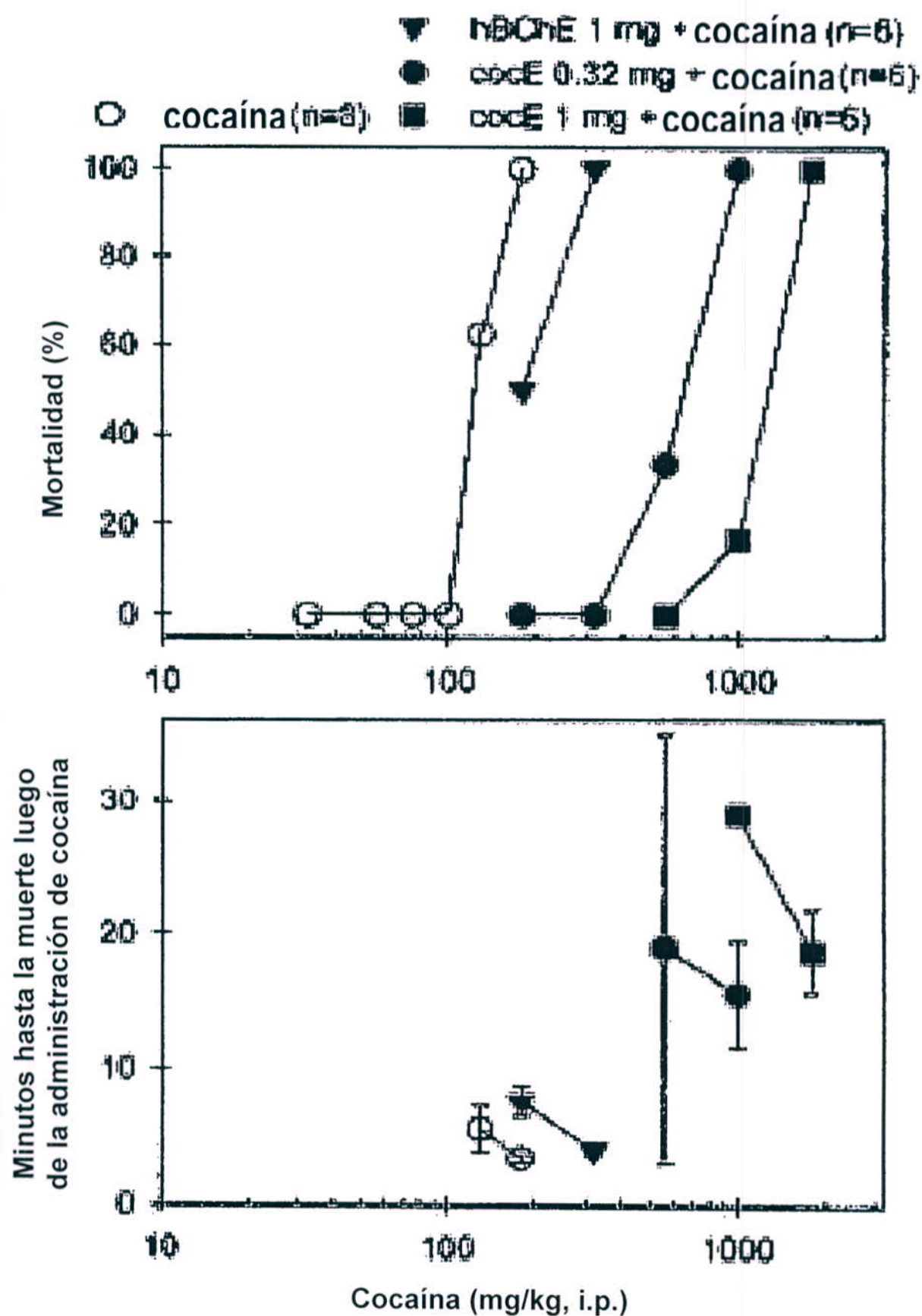
158
177

FIG. 17



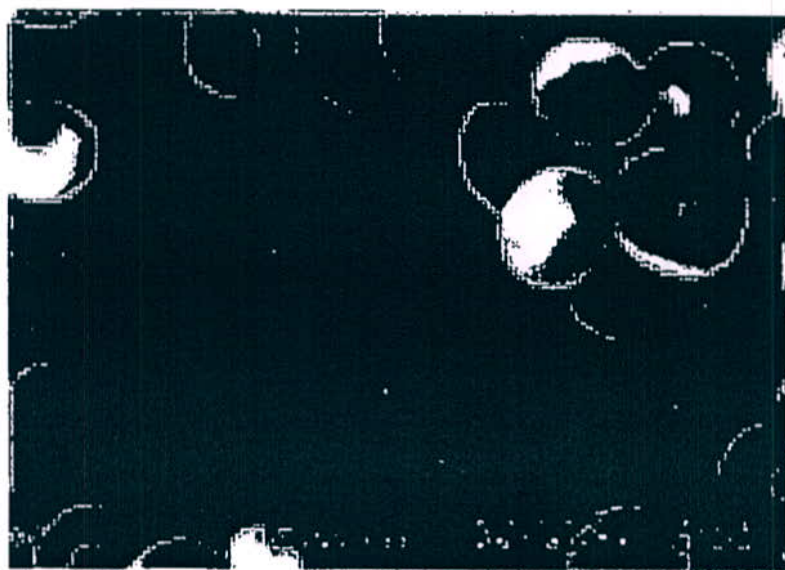
176/59

FIG. 18

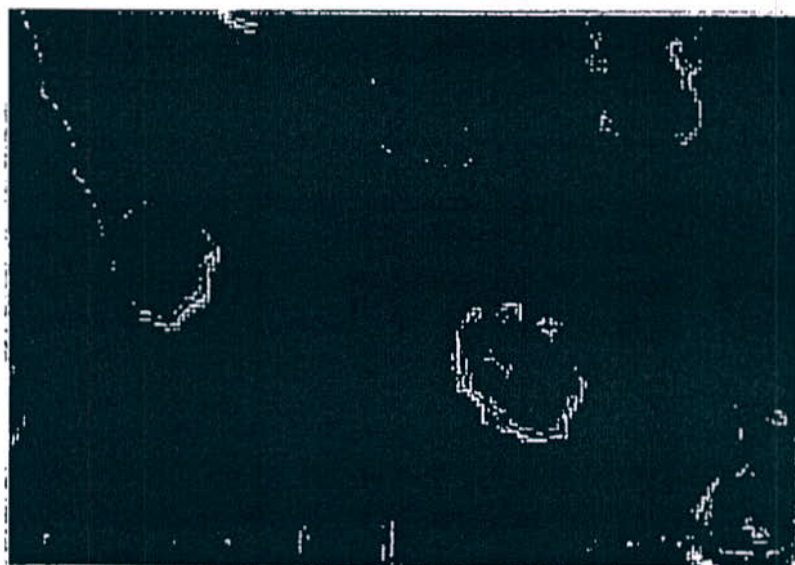


181
178

FIG. 20



A



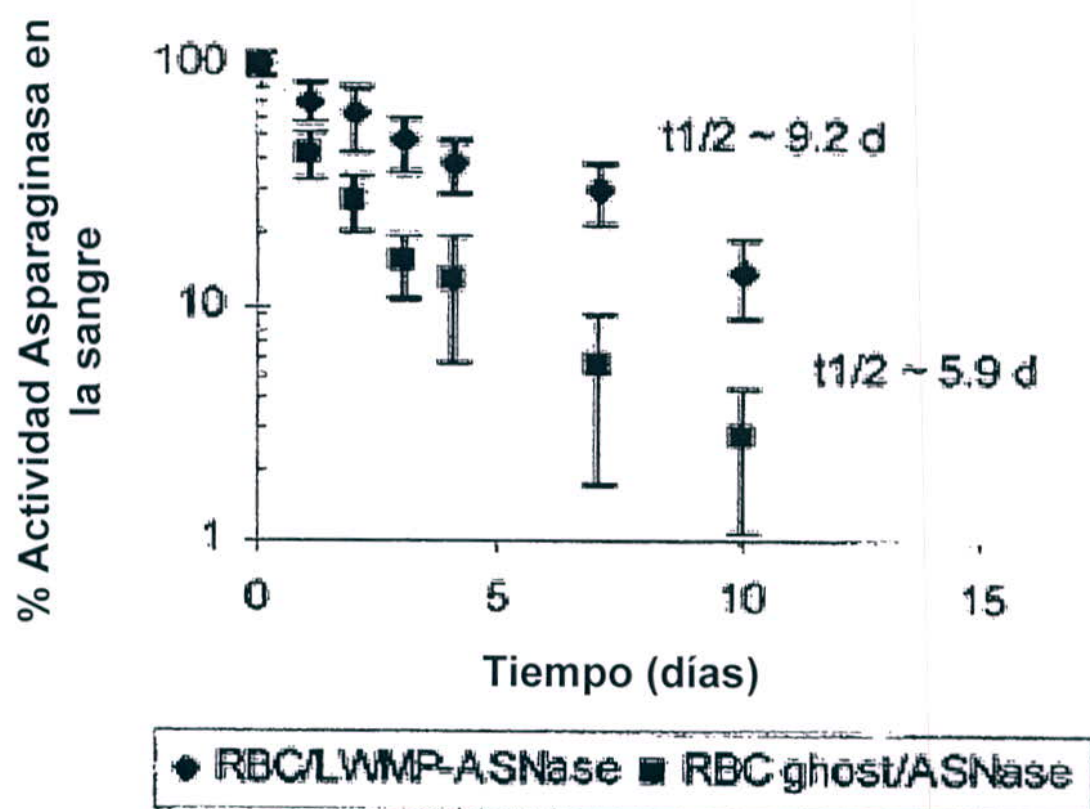
B



C

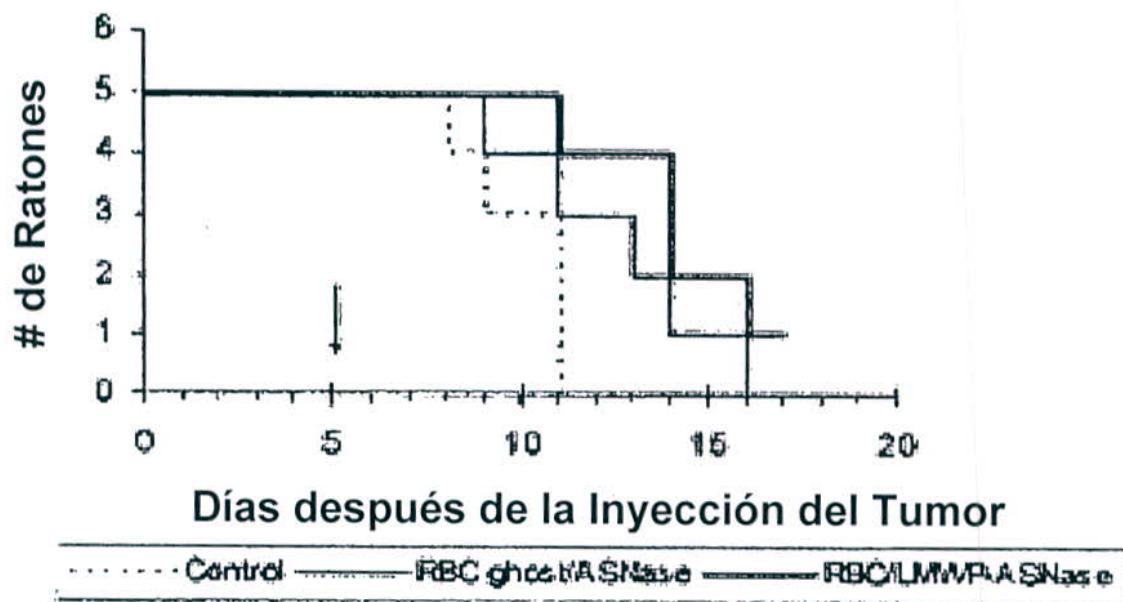
162
1x9

FIG. 21



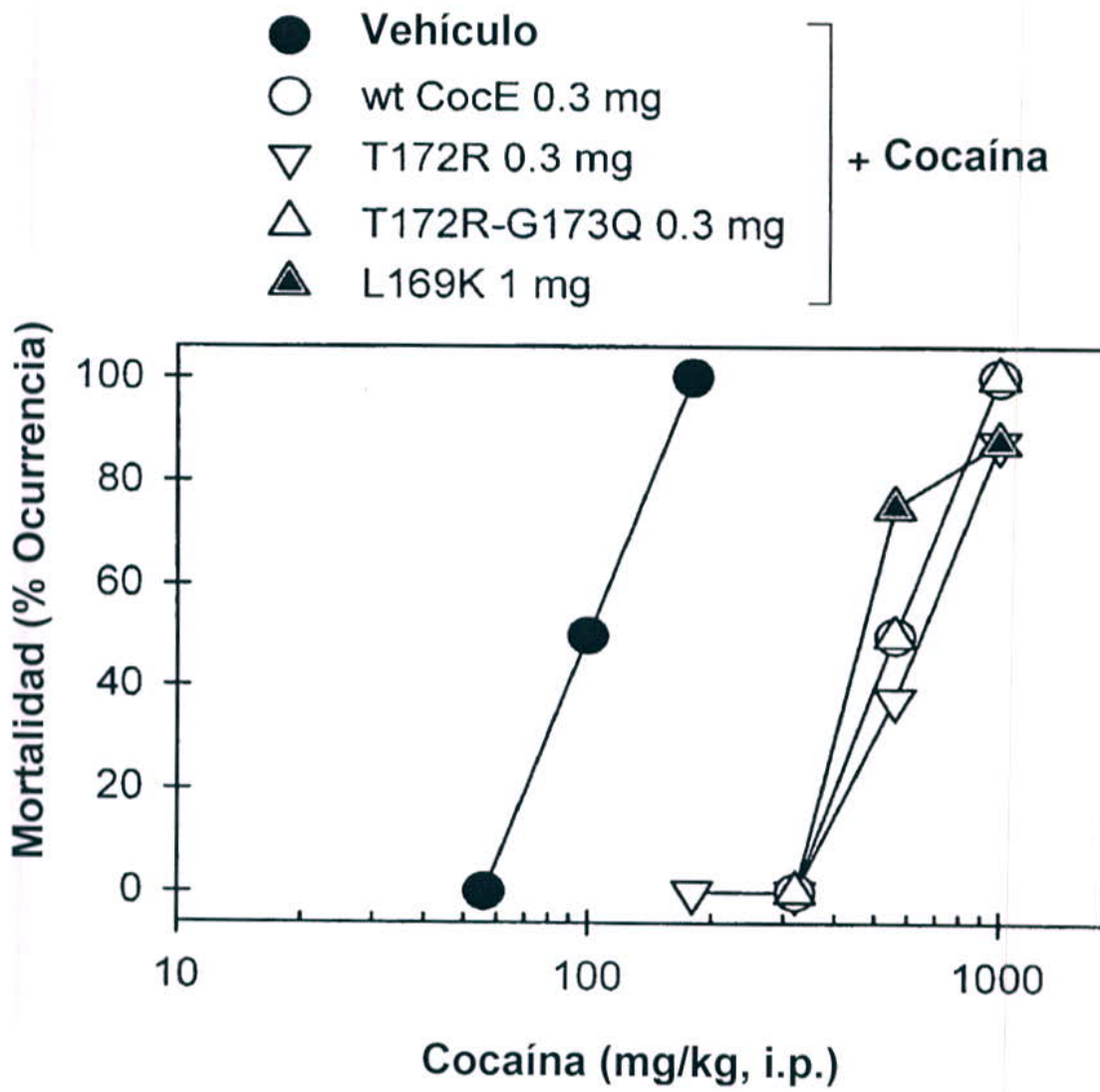
163
100

FIG. 22



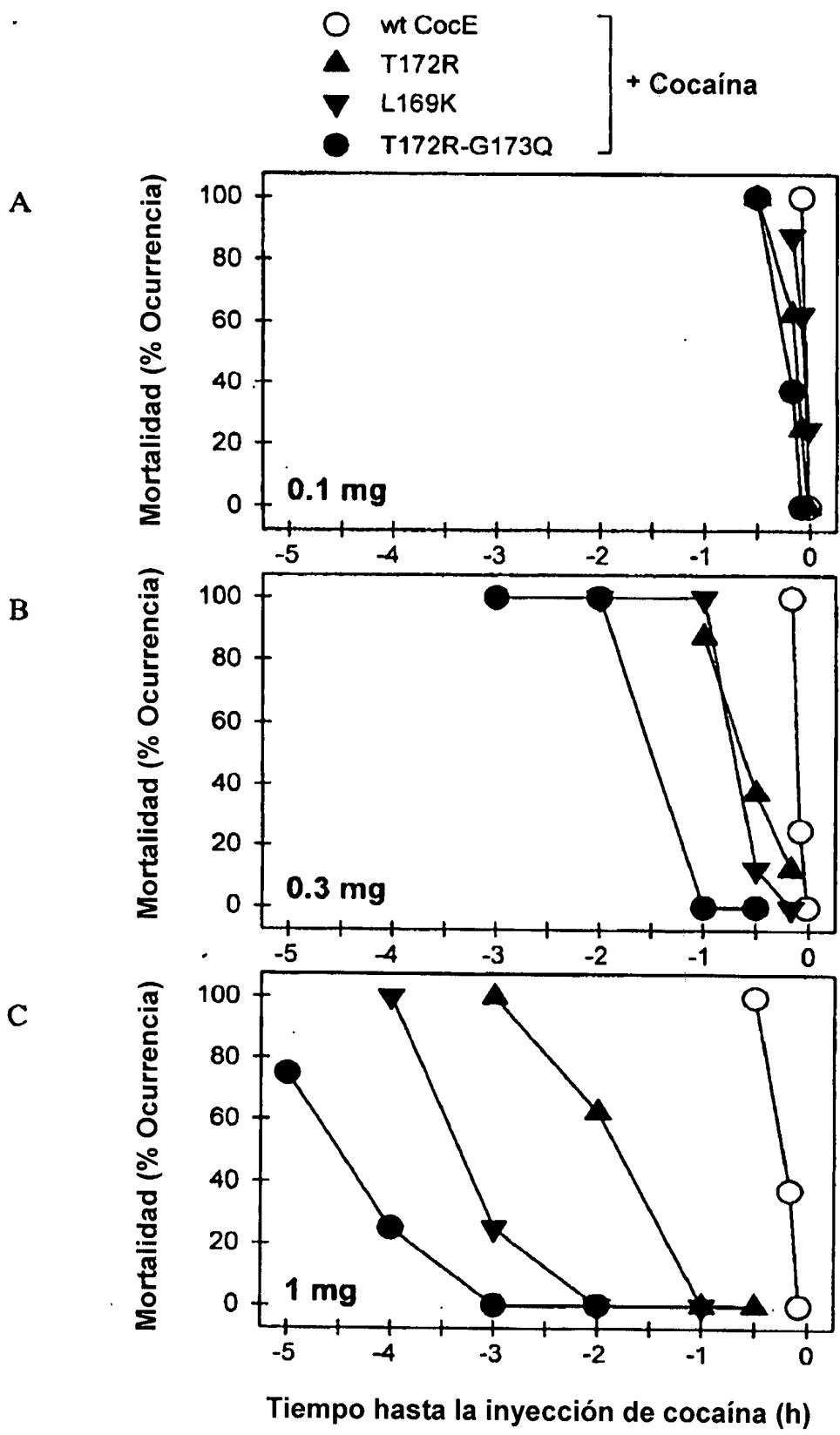
164
181

FIG. 23



165
182

FIG. 24



166
183

FIG. 25

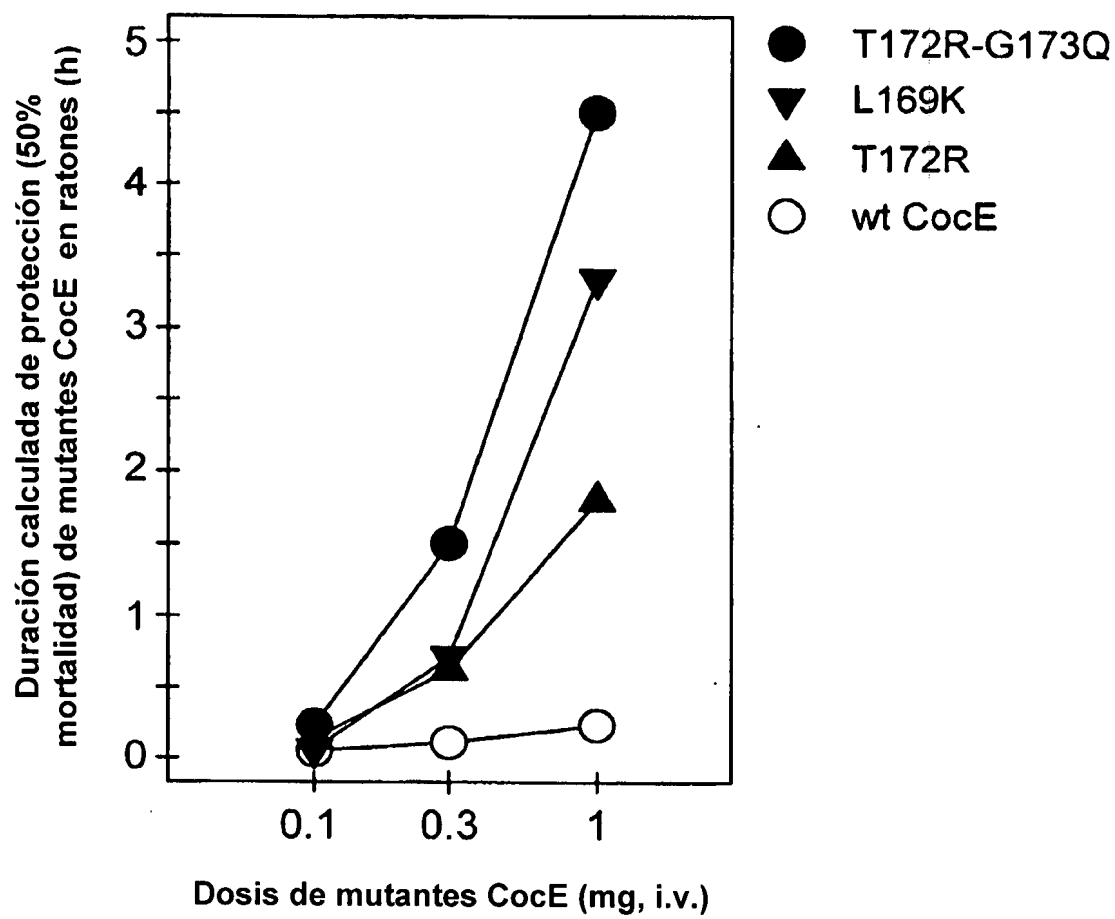
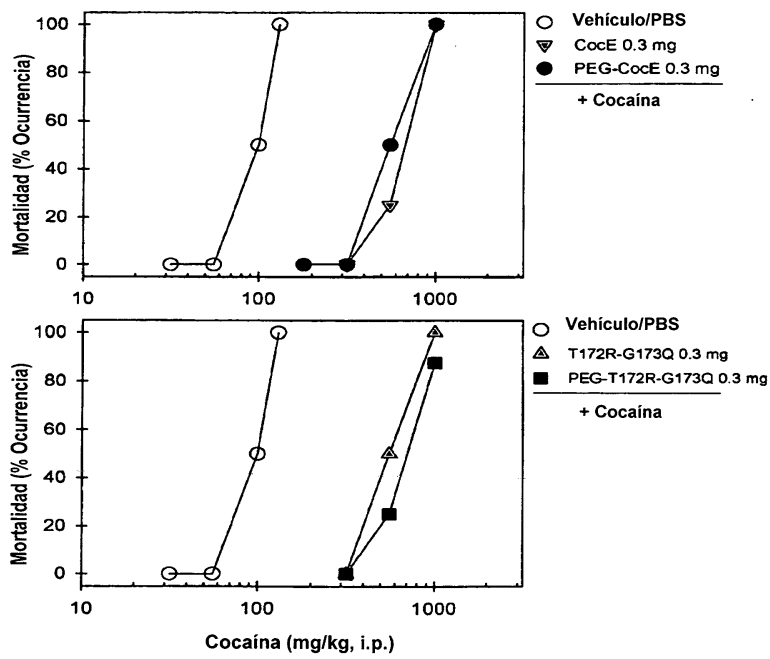


FIG. 26

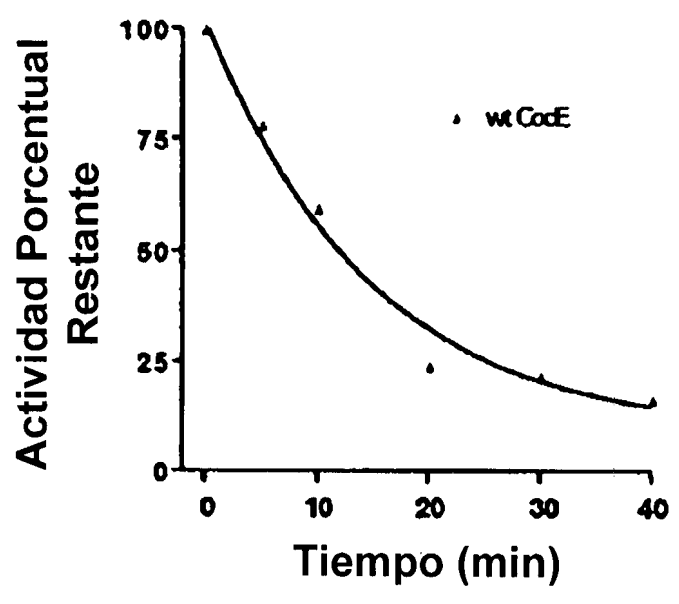


184

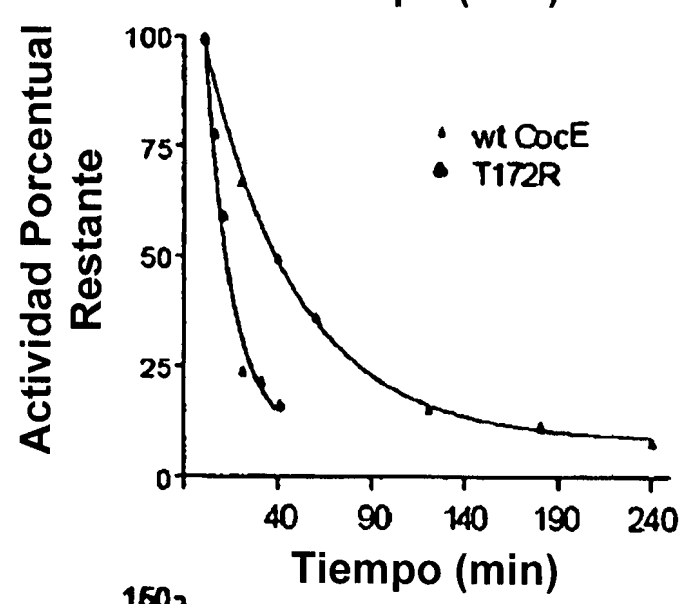
128
185

FIG. 27

A



B



C

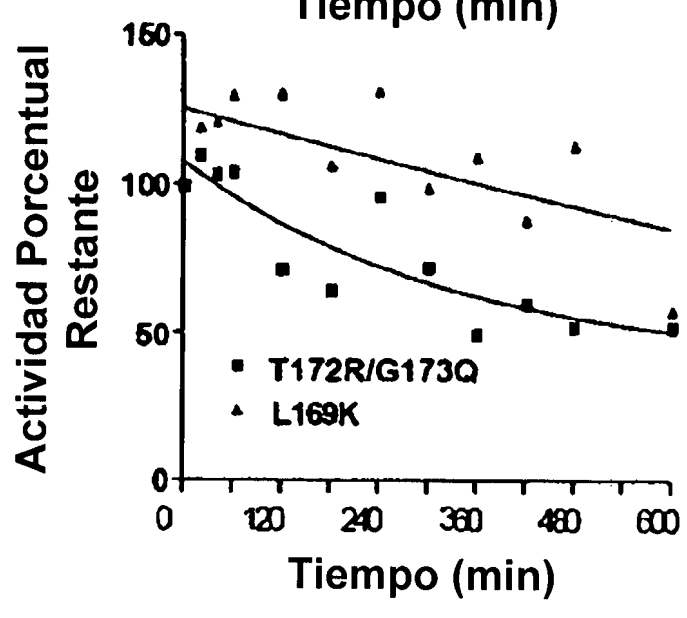


FIG. 28

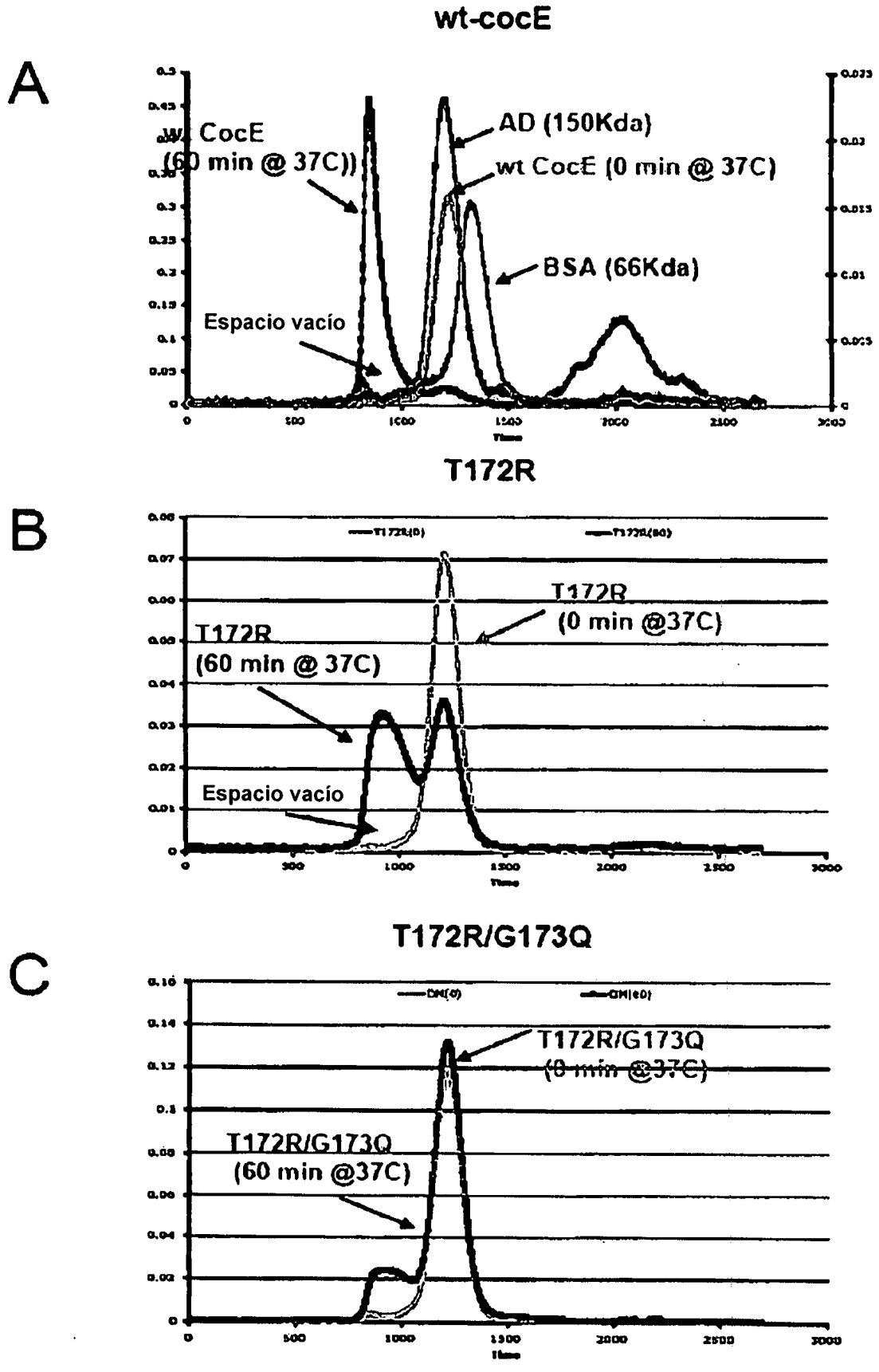
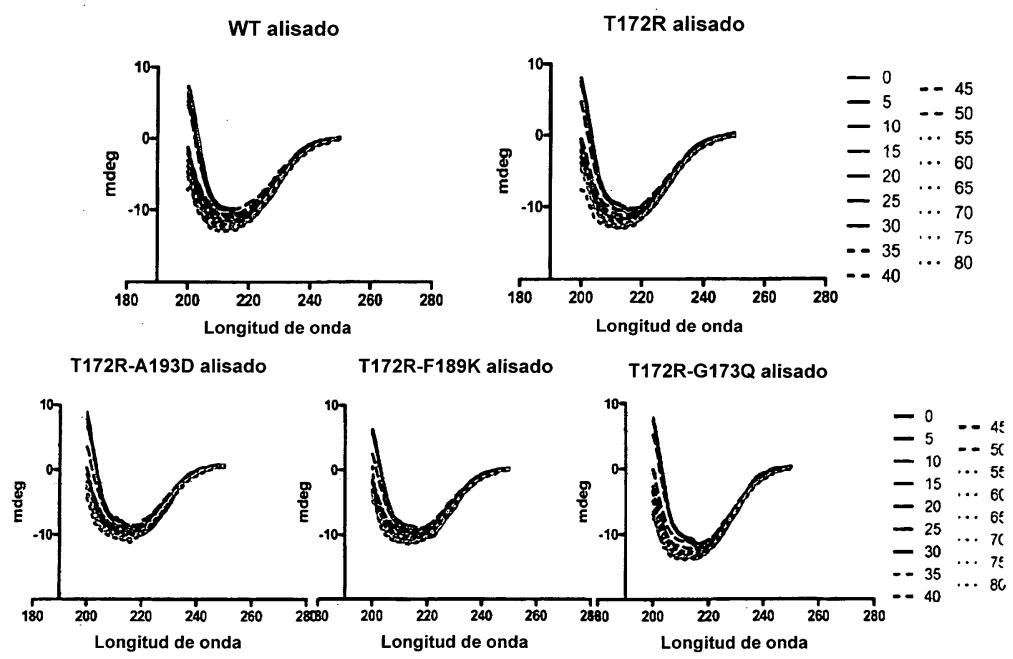


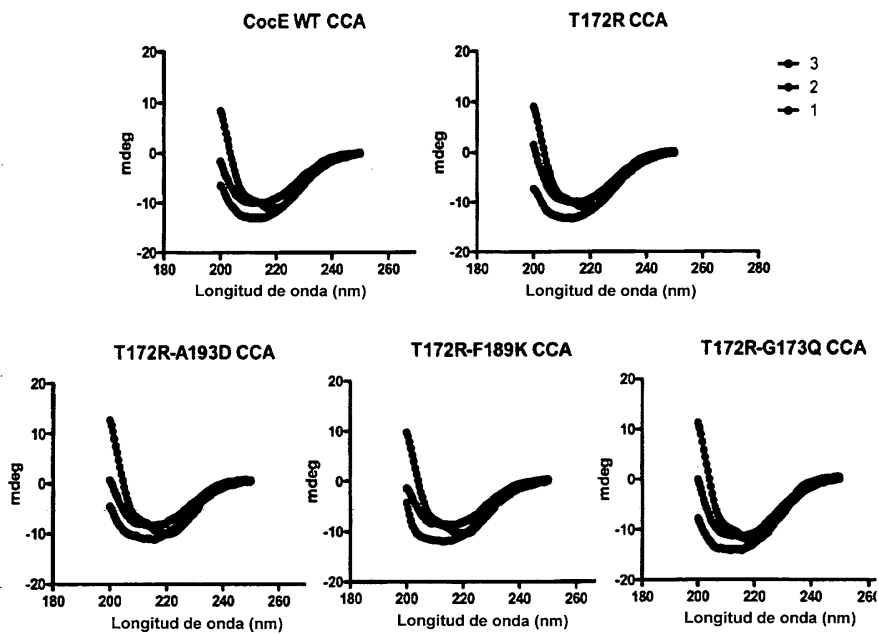
FIG. 29



187

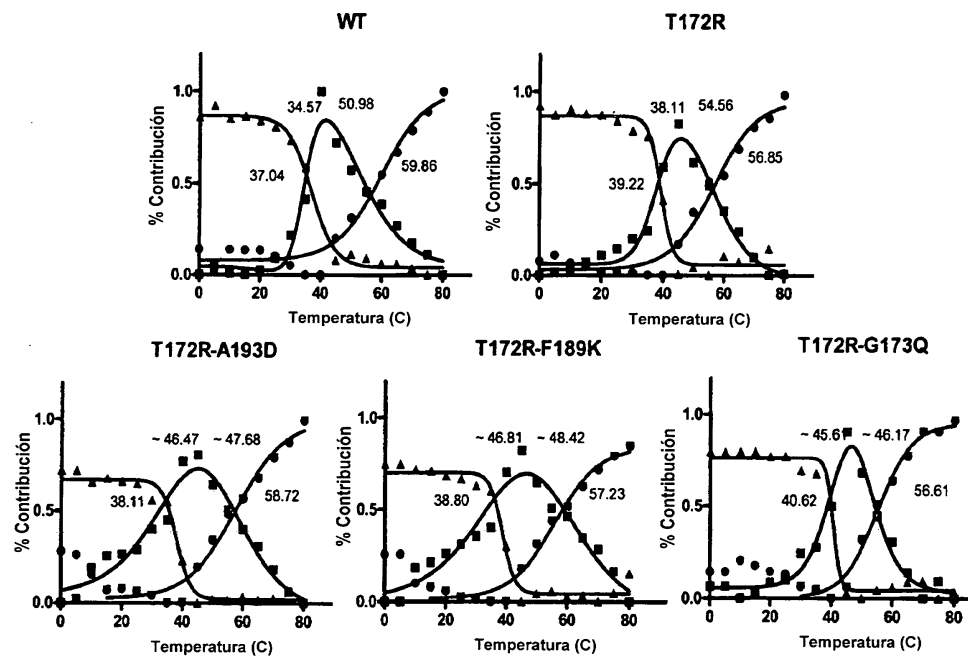
1770

FIG. 30



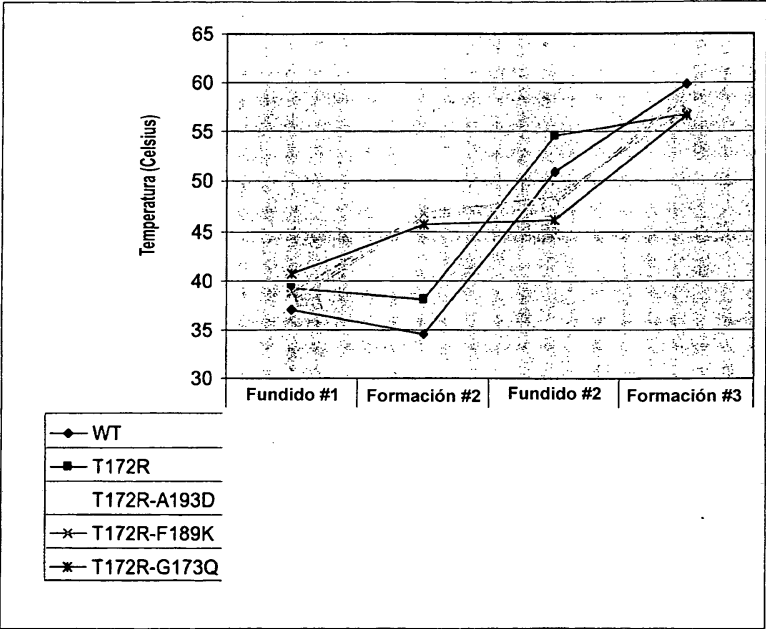
178

FIG. 31



109

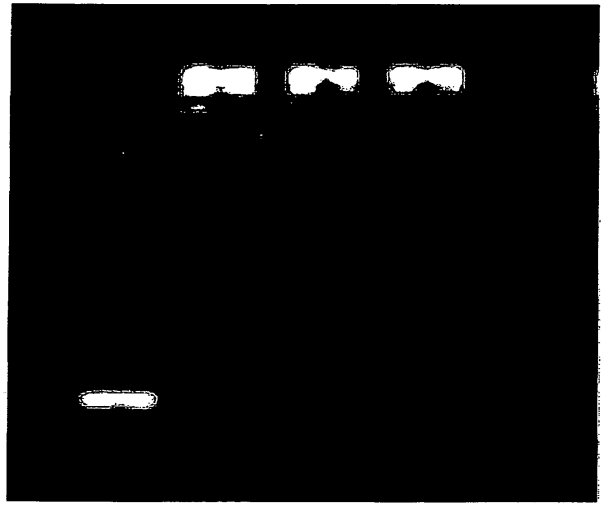
FIG. 32



140
173

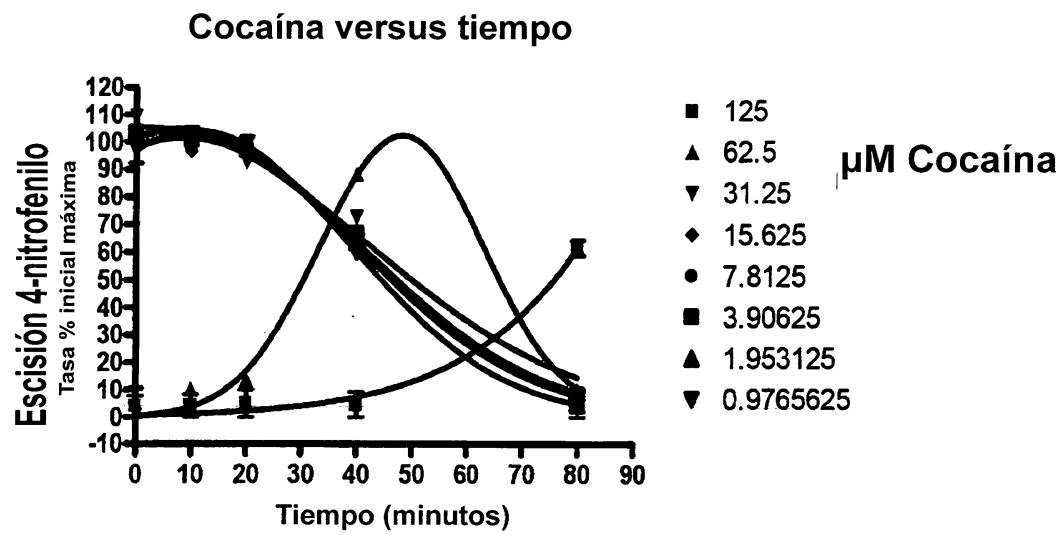
Sin calor
Solo
+Cocaína
0.1 1 10 mM

FIG. 33



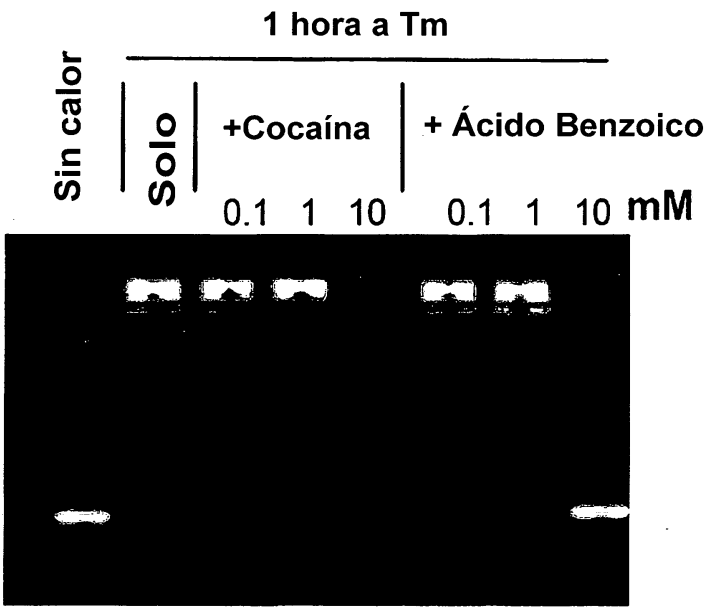
191
178

FIG. 34



142

FIG. 35



176
193

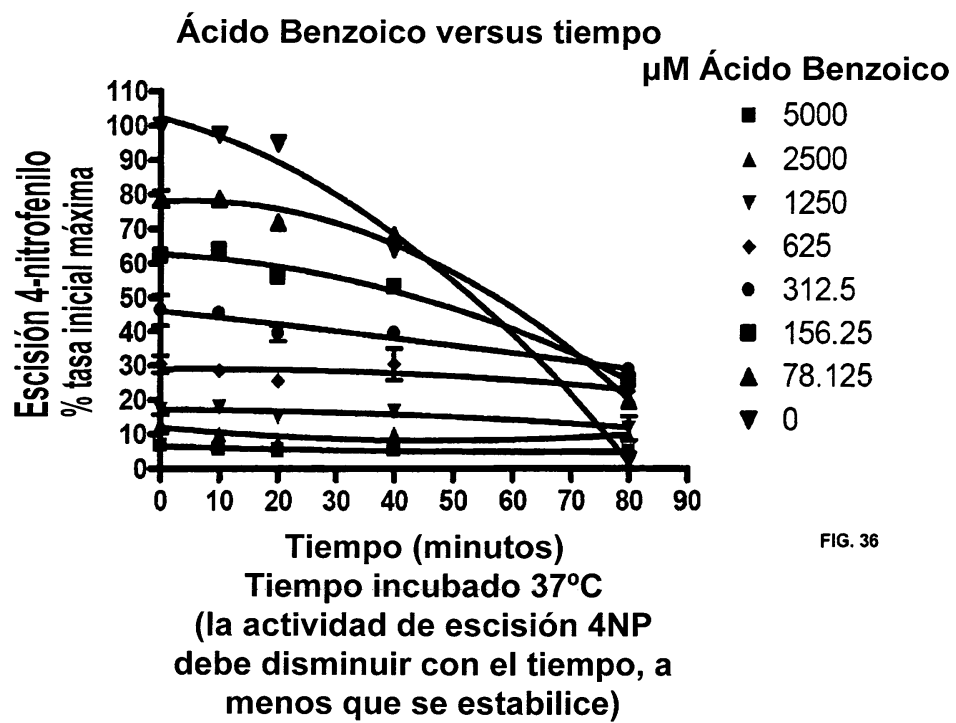


FIG. 36

194
 194

178
195

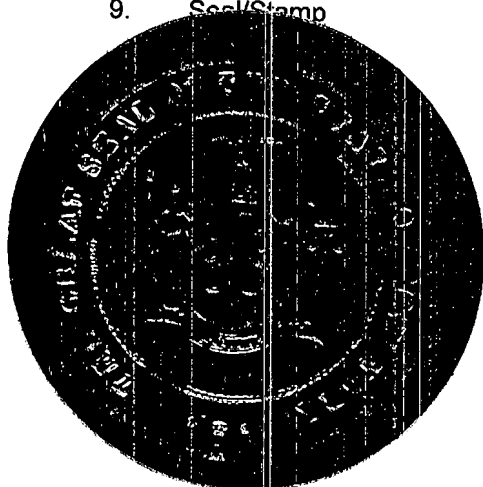
Apostille

(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-10691666A
9. Seal/Stamp
10. Signature



James Bizzarri

James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned Donald LANDRY,
Joanne MACDONALD and
Shi-Xian DENG,

acting as Inventors

of Colombian Patent Application No. 09
010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

with domicile in 29 Claremont Avenue,
Apartment 2-South, New York, NY 10027, US;
605 W. 156th Street, Apt. 40, New York, NY
10032, US; 34 Odgen Avenue, White Plains,
NY 10605, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of
ownership as well as all rights and privileges
relating thereto without exception over the
following patent application in Colombia No. 09
010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

to THE TRUSTEES OF COLUMBIA
UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

domiciled in 412 Low Memorial Library, Mail
Code 4308
535 West 116th Street New York, NY 10027,
United States of America.

The assignors and the assignee sign this
document as proof of their acceptance of the
assignment.

Given and signed on the 22 day of June
of 2009

Signature of Assignor
Donald LANDRY

Signature of Assignor
Joanne MACDONALD

Signature of Assignor
Shi-Xian DENG

Signature of Assignee

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

CESION

Los Suscritos Donald LANDRY,
Joanne MACDONALD y
Shi-Xian DENG,

en calidad de Inventores

de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAINA
Y TRATAMIENTO

con domicilio en 29 Claremont Avenue,
Apartment 2-South, New York, NY 10027,
Estados Unidos de América; 605 W. 156th
Street, Apt. 40, New York, NY 10032, Estados
Unidos de América; 34 Odgen Avenue, White
Plains, NY 10605, Estados Unidos de
América; respectivamente,

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud
de patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAINA
Y TRATAMIENTO

a THE TRUSTEES OF COLUMBIA
UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

domiciliada en 412 Low Memorial Library,
Mail Code 4308
535 West 116th Street New York, NY 10027,
Estados Unidos de América.

Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de
la cesión.

Dado y firmado a los días del mes de
de 2009

Firma del Cedente
Donald LANDRY

Firma del Cedente
Joanne MACDONALD

Firma del Cedente
Shi-Xian DENG

Firma del Cesionario

179
196

State of New York }
County of New York, } ss.:

718643



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

Vilma C. Luciano

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 13 2009

FEE PAID \$3.00

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

TO BE USED IN Colombia

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this _____ day of _____ of _____ personally appeared before me

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

of THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Assignment document 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 _____ under date of _____

and that he (she) who grants the present Assignment document is its Representative.

VILMA C. LUCIANO
Notary Public State of New York
No. 01LU6107425
Qualified in New York County
Commission Exp. March 29, 2012

NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

On this 02 day of JUNE of 2009 personally appeared before me

Donald Landry

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.

VILMA C. LUCIANO
Notary Public State of New York
No. 01LU6107425
Qualified in New York County
Commission Exp. March 29, 2012

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED

Vilma Luciano

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy _____ 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 es

de 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 documento de Cesión, que el sello estampado por él al pie de tal Cesión, 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 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 documento de Cesión es su representante.

Notario Público (sello)

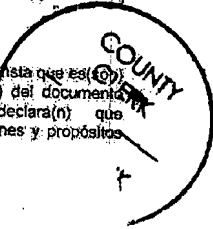
CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

Hoy _____ 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)

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED



180
197

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A THE
TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK,
firmado por los cedentes y el cesionario.

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-10691666A
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:

VILMA C. LUCIANO
Notario Público, Estado de New York
No. 01LU6107425
Titulado en el Condado de New York
Mi comisión vence el 29 de marzo de 2012

No. 718643

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,

VILMA C. LUCIANO

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,

13 de julio de 2009

(firma)

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

181
198

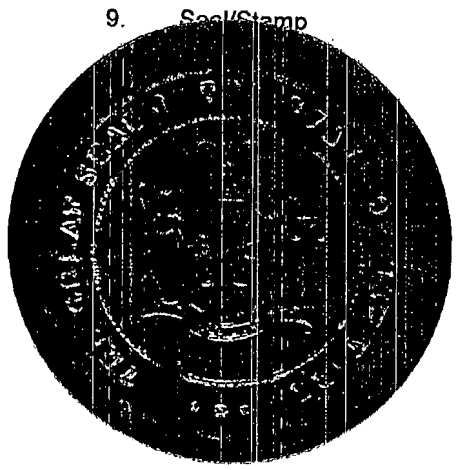
Apostille

(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-10691668A
- 9. Seal/Stamp
- 10. Signature



James Bizzarri

James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

TO BE USED IN Colombia

DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned Donald LANDRY,
Joanne MACDONALD and
Shi-Xian DENG,

acting as Inventors

of Colombian Patent Application No. 09
010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

with domicile in 29 Claremont Avenue,
Apartment 2-South, New York, NY 10027, US;
145 Seaman Avenue, Apt. 3G, New York, NY
10034, US; 34 Odgen Avenue, White Plains,
NY 10605, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of
ownership as well as all rights and privileges
relating thereto without exception over the
following patent application in Colombia No. 09
010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

to THE TRUSTEES OF COLUMBIA
UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

domiciled in 412 Low Library, Mail Code 4308
535 West 116th Street New York, NY 10027,
United States of America.

The assignors and the assignee sign this
document as proof of their acceptance of the
assignment.

Given and signed on the 8 day of July
of 2009

Signature of Assignor
Donald LANDRY

Joanne Macdonald
Signature of Assignor
Joanne MACDONALD

Signature of Assignor
Shi-Xian DENG

Shi-Xian Deng
Signature of Assignee

DOCUMENTO DE TRASPASO DE

SOLICITUD DE PATENTE

CESION

Los Suscritos Donald LANDRY,
Joanne MACDONALD y
Shi-Xian DENG,

en calidad de Inventores

de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA
Y TRATAMIENTO

con domicilio en 29 Claremont Avenue,
Apartment 2-South, New York, NY 10027,
Estados Unidos de América; 145 Seaman
Avenue, Apt. 3G, New York, NY 10034,
Estados Unidos de América; 34 Odgen
Avenue, White Plains, NY 10605, Estados
Unidos de América; respectivamente,

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud
de patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA
Y TRATAMIENTO

a THE TRUSTEES OF COLUMBIA
UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

domiciliada en 412 Low Library, Mail Code
4308
535 West 116th Street New York, NY 10027,
Estados Unidos de América.

Los cedentes y el cesionario firman esta
documento como prueba de su aceptación de
la cesión.

Dado y firmado a los días del mes de
de 200_

Firma del Cedente
Donald LANDRY

Firma del Cedente
Joanne MACDONALD

Firma del Cedente
Shi-Xian DENG

Firma del Cesionario

187
299

State of New York }
County of New York }

NEW YORK
COUNTY

719139 Form 1

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 Zraly

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

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

TO BE USED IN Colombia

On this _____ day of _____ of _____ personally appeared before me

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

of THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Assignment document; 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 _____ under date of _____

and that he (she) who grants the present Assignment document is its Representative.

Notary Public (Seal)

Hoy _____ 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 es

de THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este documento de Cesión; que el sello estampado por él al pie de tal Cesión, 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 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 documento de Cesión es su representante.

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL PERSONA NATURAL

NOTARIAL CERTIFICATE NATURAL PERSON COUNTY CLEA

On this 8th day of July of 2009 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)

Craig Zraly
CRAIG ZRALY
Notary Public State of New York
No. 01ZR6038118
Qualified in New York County
LEGALIZATION BY APOSTILLA REQUIRED March 6, 2010

Hoy _____ 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.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

183
200

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A THE
TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK,
firmado por los cedentes y el cesionario.

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-10691668A
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. 719139

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.

184
201

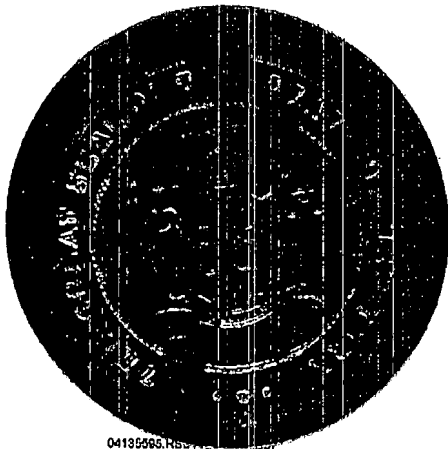
Apostille

(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-10691667A
9. Seal/Stamp
10. Signature



James Bizzarri

James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

SOLICITUD DE PATENTE

ASSIGNMENT

CESION

The Undersigned Donald LANDRY,
Joanne MACDONALD and
Shi-Xian DENG,

Los Suscritos Donald LANDRY,
Joanne MACDONALD y
Shi-Xian DENG,

acting as Inventors

en calidad de Inventores

of Colombian Patent Application No. 09
010.531

de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA
Y TRATAMIENTO

with domicile in 29 Claremont Avenue,
Apartment 2-South, New York, NY 10027, US;
145 Seaman Avenue, Apt. 3G, New York, NY
10034, US; 34 Odgen Avenue, White Plains,
NY 10605, US; respectively,

con domicilio en 29 Claremont Avenue,
Apartment 2-South, New York, NY 10027,
Estados Unidos de América; 145 Seaman
Avenue, Apt. 3G, New York, NY 10034,
Estados Unidos de América; 34 Odgen
Avenue, White Plains, NY 10605, Estados
Unidos de América; respectivamente,

hereby declare that assign all rights of
ownership as well as all rights and privileges
relating thereto without exception over the
following patent application in Colombia No. 09
010.531

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud
de patente en Colombia No. 09 010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA
Y TRATAMIENTO

to THE TRUSTEES OF COLUMBIA
UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

a THE TRUSTEES OF COLUMBIA
UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

domiciled in 412 Low Library, Mail Code 4308
535 West 116th Street New York, NY 10027,
United States of America.

domiciliada en 412 Low Library, Mail Code
4308
535 West 116th Street New York, NY 10027,
Estados Unidos de América.

The assignors and the assignee sign this
document as proof of their acceptance of the
assignment.

Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de
la cesión.

Given and signed on the 8th day of July
of 2009

Dado y firmado a los días del mes de
de 200_

Signature of Assignor
Donald LANDRY

Firma del Cedente
Donald LANDRY

Signature of Assignor
Joanne MACDONALD

Firma del Cedente
Joanne MACDONALD

Signature of Assignor
Shi-Xian DENG

Firma del Cedente
Shi-Xian DENG

Signature of Assignee

Firma del Cesionario

Jeffrey M. Sears, Ph.D.
Associate General Counsel
Columbia University

DOCUMENTO DE TRASPASO DE

185
202

State of New York
County of New York, }

NEW YORK
COUNTY

719138 Form 1

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 Zraly

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 heretunto set my hand affixed my official seal this

FEE PAID \$3.00

JUL 14 2009

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

TO BE USED IN Colombia

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 20th day of July of 2009
personally appeared before me [Signature]
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

Hoy 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 es

de THE TRUSTEES OF COLUMBIA
UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

of THE TRUSTEES OF COLUMBIA
UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

Which is legally constituted for a term not yet
expired, that deponent is authorized by said
Company to confer this Assignment document:
that the seal affixed [Signature] 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 New York
under date of July 8, 2009

and that he (she) who grants the present
Assignment document is its Representative.

Notary Public (Seal) [Signature] CRAIG ZRALY
Notary Public State of New York
No. 01ZR6038118
Qualified in New York County
Commission Expires March 6, 2010

NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

Hoy de
compareció(eron) ante mí de

On this day of
personally appeared before me of

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.

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.

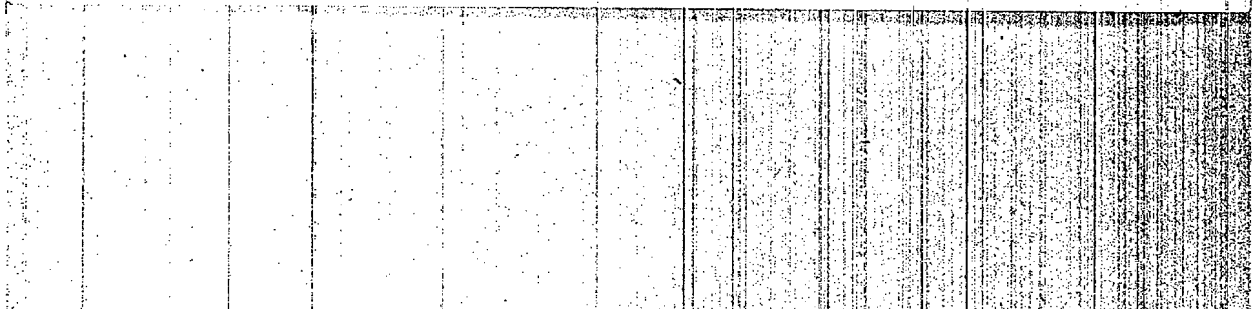
Notario Público (sello)

Notary Public (Seal)

LEGALIZACIÓN POR APOSTILLA ES REQUERIDA

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)



186
703

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A THE
TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK,
firmado por los cedentes y el cesionario.

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-10691667A
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. 719138

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.

187
204



Trey Grayson
SECRETARY OF STATE

For use in the country of: Colombia

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by Getha Helfenberger
3. acting in the capacity of Deputy County Clerk
Fayette County
Commonwealth of Kentucky
4. bears the seal/stamp of Getha Helfenberger
Deputy County Clerk
Commonwealth of Kentucky

CERTIFIED

5. at Frankfort, Kentucky 6. the 9th day of July, 2009
7. by Secretary of State, Commonwealth of Kentucky
8. No. 46357.82660.24687.67782



10. Signature:

Tn6z
Trey Grayson
Secretary of State
Commonwealth of Kentucky

**DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION
ASSIGNMENT**

The Undersigned **Chang-Guo ZHAN** and
Daquan GAO,

acting as Inventors

of Colombian Patent Application No. 09
010.531

Titled: **ANTI-COCAINE COMPOSITIONS
AND TREATMENT**

with domicile in 2193 Allegheny Way,
Lexington, KY 40523, US; 3929 Stonyrun Drive,
Louisville, KY 40220, US respectively,

hereby declare that assign all rights of
ownership as well as all rights and privileges
relating thereto without exception over the
following patent application in Colombia No. 09
010.531

Titled: **ANTI-COCAINE COMPOSITIONS
AND TREATMENT**

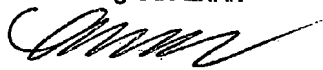
to **UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION**

domiciled in 144 ASTeCC Building
Lexington, KY 40506, United States of
America.

The assignors and the assignee sign this
document as proof of their acceptance of the
assignment.

Given and signed on the 18th day of June
of 2009

Signature of Assignor
Chang-Guo ZHAN



Signature of Assignor
Daquan GAO

**DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE**

CESION

Los Suscritos **Chang-Guo ZHAN** y
Daquan GAO,

en calidad de Inventores

de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531

Titulada: **COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA
Y TRATAMIENTO**

con domicilio en 2193 Allegheny Way,
Lexington, KY 40523, Estados Unidos de
América; 3929 Stonyrun Drive, Louisville, KY
40220, Estados Unidos de América;
respectivamente,

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud
de patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: **COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA
Y TRATAMIENTO**

a **UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION**

domiciliada 144 ASTeCC Building
Lexington, KY 40506, Estados Unidos de
América.

Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de
la cesión.

Dado y firmado a los _____ días del mes de
de 200_

Firma del Cedente
Chang-Guo ZHAN

Firma del Cedente
Daquan GAO

188
205

STATE OF KENTUCKY

COUNTY OF FAYETTE

Pursuant to KRS 423.020, I DONALD W. BLEVINS JR, Clerk of the County of Fayette for the state of Kentucky, the same being a Court of Record, DO HEREBY CERTIFY THAT:

THE NOTARY COMMISSION OF TANYA G FLOYD, RECORDED IN NOTARY BOOK 0114, PAGE 0247 WILL EXPIRE ON 04/27/2013

Whose name is subscribed to the certificate of the proof or acknowledgement of the annexed instrument and thereon written was, at the time of taking such proof or acknowledgement, a Notary Public in and for said County of Fayette, dwelling in the City of Lexington, commissioned, sworn, and duly authorized to take same. And, further, that I am well acquainted with the handwriting of such Notary and verily believe that the signature to said certificate or proof or acknowledgement is genuine.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the said Court and County, this 08 day of July, 2009.



Clerk, Fayette County Court


BY HIS LAWFUL DEPUTY PURSUANT
TO KRS 61.035

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this _____ day of _____ of _____ personally appeared before me

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

of UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Assignment document: 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 _____ under date of _____

and that he (she) who grants the present Assignment document is its Representative.

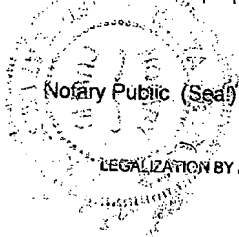
Notary Public (Seal)

NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

On this 18th day of June of _____ personally appeared before me

Chang - Guo Zhan

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.



[Signature]
My commission expires
Apr. 27, 2013

Hoy _____ 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 es

de UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este documento de Cesión; que el sello estampado por él al pie de tal Cesión, 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 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 documento de Cesión es su representante.

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

Hoy _____ 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.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

189
206

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de **CESIÓN** a
UNIVERSITY OF KENTUCKY REASEARCH FOUNDATION, firmado por el
cedente y el cesionario.

ESTADO DE KENTUCKY
TREY GRAYSON
SECRETARIO DE ESTADO

Para uso en: Colombia

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 GETHA HELFENBERGER
3. actuando en capacidad de SECRETARIO DELEGADO DEL
CONDADO, CONDADO DE FAYETTE, ESTADO DE KENTUCKY
4. lleva el sello/timbre de GETHA HELFENBERGER, SECRETARIO
DELEGADO DEL CONDADO, ESTADO DE KENTUCKY

CERTIFICADO

5. en Frankfort, Kentucky
6. a los 9 días del mes de julio de 2009
7. por el Secretario de Estado, Estado Kentucky
8. No. 46357.82660.24687.67782
9. Sello/timbre

10. Firma

(firma)

Trey Grayson
Secretario de Estado
Estado de Kentucky

Lleva un sello que dice:
ESTADO DE KENTUCKY

Estado de Kentucky
Condado de Fayette

De conformidad con KRS 423.020, yo DONALD W. BLEVINS JR, Secretario del Condado de Fayette para el Estado de Kentucky, siendo el mismo un Tribunal de Registro,

POR LA PRESENTE CERTIFICO QUE,

La comisión notarial de TANYA G. FLOYD, registrada en el libro notario 0114, página 0247, expira el 27 de abril de 2013,

cuyo nombre se suscribe al certificado de prueba o reconocimiento del instrumento anexo y escrita al respecto, era un Notario Público al momento de tomar dicha prueba o reconocimiento en y para dicho Condado de Fayette, residente en la ciudad de Lexington, comisionado, había tomado juramento y estaba debidamente autorizado para tomar el mismo. Y, además, tengo pleno conocimiento de la letra de dicho Notario y creo verdaderamente que la firma de dicho certificado o prueba o reconocimiento es genuina.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he puesto en el presente mi firma y sello de dicho Tribunal y Condado este 8 de julio de 2009.

(firma)

Secretario, Tribunal del Condado de Fayette

(firma)

Por su Delegado Legal de conformidad con KRS 61.035

Hay un sello seco que dice:

SECRETARIO DEL CONDADO DE FAYETTE
KENTUCKY

190
207

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello seco que dice:
TANYA G. FLOYD
NOTARIO PÚBLICO GENERAL DEL ESTADO

Hay un sello seco que dice:
SECRETARIO DEL CONDADO DE FAYETTE
KENTUCKY



Trey Grayson
SECRETARY OF STATE

For use in the country of: Colombia

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by Getha Helfenberger
3. acting in the capacity of Deputy County Clerk
Fayette County
Commonwealth of Kentucky
4. bears the seal/stamp of Getha Helfenberger
Deputy County Clerk
Commonwealth of Kentucky

CERTIFIED

5. at Frankfort, Kentucky 6. the 9th day of July, 2009
7. by Secretary of State, Commonwealth of Kentucky
8. No. 46357.82660.24687.67781



10. Signature:

Trey Grayson
Trey Grayson
Secretary of State
Commonwealth of Kentucky

111
208

**DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION**

ASSIGNMENT

The Undersigned **Chang-Guo ZHAN** and
Daquan GAO,

acting as Inventors

of Colombian Patent Application No. 09
010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

with domicile in 2193 Allegheny Way,
Lexington, KY 40523, US; 3929 Stonyrun Drive,
Louisville, KY 40220, US respectively,

hereby declare that assign all rights of
ownership as well as all rights and privileges
relating thereto without exception over the
following patent application in Colombia No. 09
010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

to **UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION**

domiciled in 144 ASTeCC Building
Lexington, KY 40506, United States of
America.

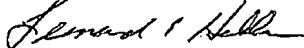
The assignors and the assignee sign this
document as proof of their acceptance of the
assignment.

Given and signed on the day of
of 200_

Signature of Assignor
Chang-Guo ZHAN

Signature of Assignor
Daquan GAO

Signature of Assignee



**DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE**

CESION

Los Suscritos **Chang-Guo ZHAN** y
Daquan GAO,

en calidad de Inventores

de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA
Y TRATAMIENTO

con domicilio en 2193 Allegheny Way,
Lexington, KY 40523, Estados Unidos de
América; 3929 Stonyrun Drive, Louisville, KY
40220, Estados Unidos de América;
respectivamente,

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud
de patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA
Y TRATAMIENTO

a **UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION**

domiciliada 144 ASTeCC Building
Lexington, KY 40506, Estados Unidos de
América.

Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de
la cesión.

Dado y firmado a los días del mes de
de 200_

Firma del Cedente
Chang-Guo ZHAN

Firma del Cedente
Daquan GAO

Firma del Cesionario

STATE OF KENTUCKY

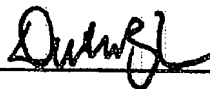
COUNTY OF FAYETTE

Pursuant to KRS 423.020, I DONALD W. BLEVINS JR, Clerk of the County of Fayette for the state of Kentucky, the same being a Court of Record, DO HEREBY CERTIFY THAT:

THE NOTARY COMMISSION OF TANYA G FLOYD, RECORDED IN NOTARY BOOK 0114, PAGE 0247 WILL EXPIRE ON 04/27/2013

Whose name is subscribed to the certificate of the proof or acknowledgement of the annexed instrument and thereon written was, at the time of taking such proof or acknowledgement, a Notary Public in and for said County of Fayette, dwelling in the City of Lexington, commissioned, sworn, and duly authorized to take same. And, further, that I am well acquainted with the handwriting of such Notary and verily believe that the signature to said certificate or proof or acknowledgement is genuine.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the said Court and County, this 08 day of July, 2009.



Clerk, Fayette County Court



BY HIS LAWFUL DEPUTY PURSUANT
TO KRS 61.035

192
209

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 25th day of June of
personally appeared before me
Leonard E. Heller
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 Vice President of
Commercialization and Economic Development
of UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION

Which is legally constituted for a term not yet
expired, that deponent is authorized by said
Company to confer this Assignment document;
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 Kentucky
under date of 6/25/09

and that he (she) who grants the present
Assignment document is its Representative.

Notary Public (Seal)

NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

On this _____ day of _____ 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.

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 es

de UNIVERSITY OF KENTUCKY
RESEARCH FOUNDATION

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

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

Hoy _____ de _____ de _____
compareció(eron) ante mí

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

Notario Público (sello)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de **CESIÓN** a
UNIVERSITY OF KENTUCKY REASEARCH FOUNDATION, firmado por el
cedente y el cesionario.

ESTADO DE KENTUCKY
TREY GRAYSON
SECRETARIO DE ESTADO

Para uso en: Colombia

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 GETHA HELFENBERGER
3. actuando en capacidad de SECRETARIO DELEGADO DEL
CONDADO, CONDADO DE FAYETTE, ESTADO DE KENTUCKY
4. lleva el sello/timbre de GETHA HELFENBERGER, SECRETARIO
DELEGADO DEL CONDADO, ESTADO DE KENTUCKY

CERTIFICADO

5. en Frankfort, Kentucky
6. a los 9 días del mes de julio de 2009
7. por el Secretario de Estado, Estado Kentucky
8. No. 46357.82660.24687.67781
9. Sello/timbre

10. Firma

(firma)
Trey Grayson
Secretario de Estado
Estado de Kentucky

Lleva un sello que dice:
ESTADO DE KENTUCKY

193
210

Estado de Kentucky
Condado de Fayette

De conformidad con KRS 423.020, yo DONALD W. BLEVINS JR, Secretario del Condado de Fayette para el Estado de Kentucky, siendo el mismo un Tribunal de Registro,

POR LA PRESENTE CERTIFICO QUE,

La comisión notarial de TANYA G. FLOYD, registrada en el libro notario 0114, página 0247, expira el 27 de abril de 2013,

cuyo nombre se suscribe al certificado de prueba o reconocimiento del instrumento anexo y escrita al respecto, era un Notario Público al momento de tomar dicha prueba o reconocimiento en y para dicho Condado de Fayette; residente en la ciudad de Lexington, comisionado, había tomado juramento y estaba debidamente autorizado para tomar el mismo. Y, además, tengo pleno conocimiento de la letra de dicho Notario y creo verdaderamente que la firma de dicho certificado o prueba o reconocimiento es genuina.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he puesto en el presente mi firma y sello de dicho Tribunal y Condado este 8 de julio de 2009.

(firma)
Secretario, Tribunal del Condado de Fayette

(firma)
Por su Delegado Legal de conformidad con KRS 61.035

Hay un sello seco que dice:

SECRETARIO DEL CONDADO DE FAYETTE
KENTUCKY

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello seco que dice:

TANYA G. FLOYD

NOTARIO PÚBLICO GENERAL DEL ESTADO

Hay otro sello seco que dice:

SECRETARIO DEL CONDADO DE FAYETTE
KENTUCKY

194
211



Trey Grayson
SECRETARY OF STATE

For use in the country of: Colombia

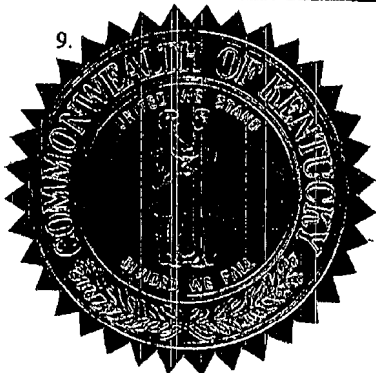
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by Denise Sullivan
3. acting in the capacity of Deputy County Clerk
Jefferson County
Commonwealth of Kentucky
4. bears the seal/stamp of Denise Sullivan
Deputy County Clerk
Commonwealth of Kentucky

CERTIFIED

5. at Frankfort, Kentucky 6. the 9th day of July, 2009
7. by Secretary of State, Commonwealth of Kentucky
8. No. 46357.82660.24686.67780



10. Signature:

Trey Grayson
Trey Grayson
Secretary of State
Commonwealth of Kentucky

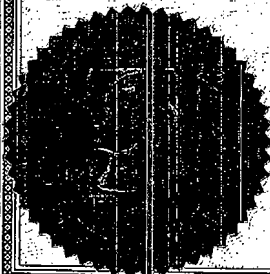
50100 10/10/09

Commonwealth of Kentucky

County of Jefferson

I, Bobbie Holsclaw, Clerk of County of Commonwealth aforesaid, the same being an office or record, do hereby certify that CARLA A JACOBS by whom the foregoing acknowledgement was taken and whose name is subscribed thereto, was at the time of taking the same, a Notary Public of said Commonwealth County, duly commissioned, qualified and sworn, and authorized by laws of said Commonwealth to take proof or acknowledgement of deeds and other instruments in writing, and administer oaths of affirmations in said Commonwealth County, and that I have compared said Notary's signature with that on file in this office and believe that the signature to the foregoing documents is the genuine signature of said Notary whose commission expires on the 24TH day of August, 2010.

In Witness Whereof, I have hereunto set my hand
and affixed the official seal of Jefferson County, Kentucky.
This 8TH day of July, 2009.



Bobbie Holsclaw
Clerk, Jefferson County, Kentucky.
By Aimee Sullivan

LITHO IN U.S.A.

195
212

DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned **Chang-Guo ZHAN** and
Daquan GAO,

acting as Inventors

of Colombian Patent Application No. 09
010.531

Titled: **ANTI-COCAINE COMPOSITIONS
AND TREATMENT**

with domicile in 2193 Allegheny Way,
Lexington, KY 40513, US; 3929 Stonyrun Drive,
Louisville, KY 40220, US respectively,

hereby declare that assign all rights of
ownership as well as all rights and privileges
relating thereto without exception over the
following patent application in Colombia No. 09
010.531

Titled: **ANTI-COCAINE COMPOSITIONS
AND TREATMENT**

to **UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION**

domiciled in 144 ASTeCC Building
Lexington, KY 40506, United States of
America.

The assignors and the assignee sign this
document as proof of their acceptance of the
assignment.

Given and signed on the day of
of 200_

Signature of Assignor
Chang-Guo ZHAN

Signature of Assignor
Daquan GAO

Daquan Gao
Signature of Assignee

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

CESION

Los Suscritos **Chang-Guo ZHAN** y
Daquan GAO,

en calidad de Inventores

de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531

Titulada: **COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA
Y TRATAMIENTO**

con domicilio en 2193 Allegheny Way,
Lexington, KY 40513, Estados Unidos de
América; 3929 Stonyrun Drive, Louisville, KY
40220, Estados Unidos de América;
respectivamente,

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud
de patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: **COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA
Y TRATAMIENTO**

a **UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION**

domiciliada 144 ASTeCC Building
Lexington, KY 40506, Estados Unidos de
América.

Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de
la cesión.

Dado y firmado a los días del mes de
de 200_

Firma del Cedente
Chang-Guo ZHAN

Firma del Cedente
Daquan GAO

Firma del Cesionario

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 19th day of June of
personally appeared before me
Daquan Gao
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

of UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION

Which is legally constituted for a term not yet
expired, that deponent is authorized by said
Company to confer this Assignment document:
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 Kentucky
under date of June 19, 2009

and that he (she) who grants the present
Assignment document is its Representative.

Notary Public (Seal)

NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

On this 19th day of June of
personally appeared before me

Daquan Gao
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.

Carla A. Jacobs

Notary Public (Seal)
Notary Public, State at Large, KY
My commission expires Aug 24, 2010
LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
personalmente compareció ante mi

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

de UNIVERSITY OF KENTUCKY
RESEARCH FOUNDATION

Sociedad legalmente constituida para un
período de duración que aún no ha terminado;
que el declarante está autorizado por dicha
compañía para conferir este documento de
Cesión; que el sello estampado por él al pie
de tal Cesión, 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
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 documento
de Cesión es su representante.

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

Hoy de de
compareció(eron) ante mi

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.

19/12
213

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de **CESIÓN** a **UNIVERSITY OF KENTUCKY REASEARCH FOUNDATION**, firmado por el cedente y el cesionario.

ESTADO DE KENTUCKY
TREY GRAYSON
SECRETARIO DE ESTADO

Para uso en: Colombia

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 DENISE SULLIVAN
3. actuando en capacidad de SECRETARIO DELEGADO DEL CONDADO, CONDADO DE JEFFERSON, ESTADO DE KENTUCKY
4. lleva el sello/timbre de DENISE SULLIVAN, SECRETARIO DELEGADO DEL CONDADO, ESTADO DE KENTUCKY

CERTIFICADO

5. en Frankfort, Kentucky
6. a los 9 días del mes de julio de 2009
7. por el Secretario de Estado, Estado Kentucky
8. No. 46357.82660.24687.67780
9. Sello/timbre

10. Firma

(firma)

Trey Grayson
Secretario de Estado
Estado de Kentucky

Lleva un sello que dice:
ESTADO DE KENTUCKY

ESTADO DE KENTUCKY

Condado de Jefferson

Yo, BOBBIE HOLSCLOW, Secretario del Condado del mencionado Estado, el mismo siendo una oficina o registro, por la presente certifico que CARLA A. JACOBS, quien tomó el anterior reconocimiento y cuyo nombre se suscribe en este, era al momento de tomar el mismo un Notario Público de dicho Condado del Estado, debidamente comisionada, titulada, habiendo tomado juramento y autorizada por las leyes de dicho Estado para tomar prueba o reconocimiento de escrituras y otros instrumentos escritos y administrar juramentos de afirmaciones en dicho Condado del Estado, y que he comparado dicha firma del Notario con la que reposa en el archivo en esta oficina y creo que la firma para los anteriores documentos es la firma auténtica de dicho Notario cuya comisión vence el 24 de agosto de 2010.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he puesto en el presente mi firma y sello oficial del condado de Jefferson, Kentucky.

Este 8 de julio de 2009.

(firma)

Secretario, Condado de Jefferson, Kentucky

Por: _____
(firma)

197
214

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:

NOTARIO PÚBLICO GENERAL DEL ESTADO, KY

Mi comisión vence el 24 de agosto de 2010.

Hay uno sello seco que dice:

CARLA A. JACOBS

NOTARIO PÚBLICO GENERAL DEL ESTADO, KY



DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-Yi LEE and Young-Min KWON;

acting as inventors
of Colombian Patent Application No. 09 010.531
Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

with domicile in Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, US; 1130 Olivia
Avenue, Ann Arbor, MI 48104, US; 1507 Pine Valley
Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, US;
3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, US;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, US; 2450 Adare Road, Ann
Arbor, MI 48104, US; 2222 Fuller Court, #204A,
Ann Arbor, MI 48105, US; 3680 Ranchero Dr.,
#203, Ann Arbor, MI 48108, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of ownership as
well as all rights and privileges relating thereto
without exception over the following patent
application in Colombia No. 09 010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

to THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

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

The assignors and the assignee sign this document
as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the 7th day of July
of 2009

Signature of Assignor
James H. WOODS
Signature of Assignor
Roger SUNAHARA
Signature of Assignor
Diwahar L. NARASIMHAN
Signature of Assignor
Victor YANG
Signature of Assignor
Mei-Chuan Holden KO
Signature of Assignor
John J. TESMER
Signature of Assignor
Tien-Yi LEE
Signature of Assignor
Young-Min KWON

Signature of Assignee
DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

Ruth L. Rasor
Director of Licensing
UM Technology Transfer

CESSION

Los Suscritos James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-Yi LEE y Young-Min KWON,
en calidad de Inventores
de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531
Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO

con domicilio en Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, Estados Unidos de
América; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 1507 Pine Valley
Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, Estados
Unidos de América; 3629 Tanglewood Drive, Ann
Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, Estados Unidos de
América; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 2222 Fuller Court,
#204A, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de
América; 3680 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI
48108, Estados Unidos de América;
respectivamente,

declaran por el presente documento que, cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de
patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO

a THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
domiciliada 1214 S. University Avenue, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de
América.

Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de la
cesión.

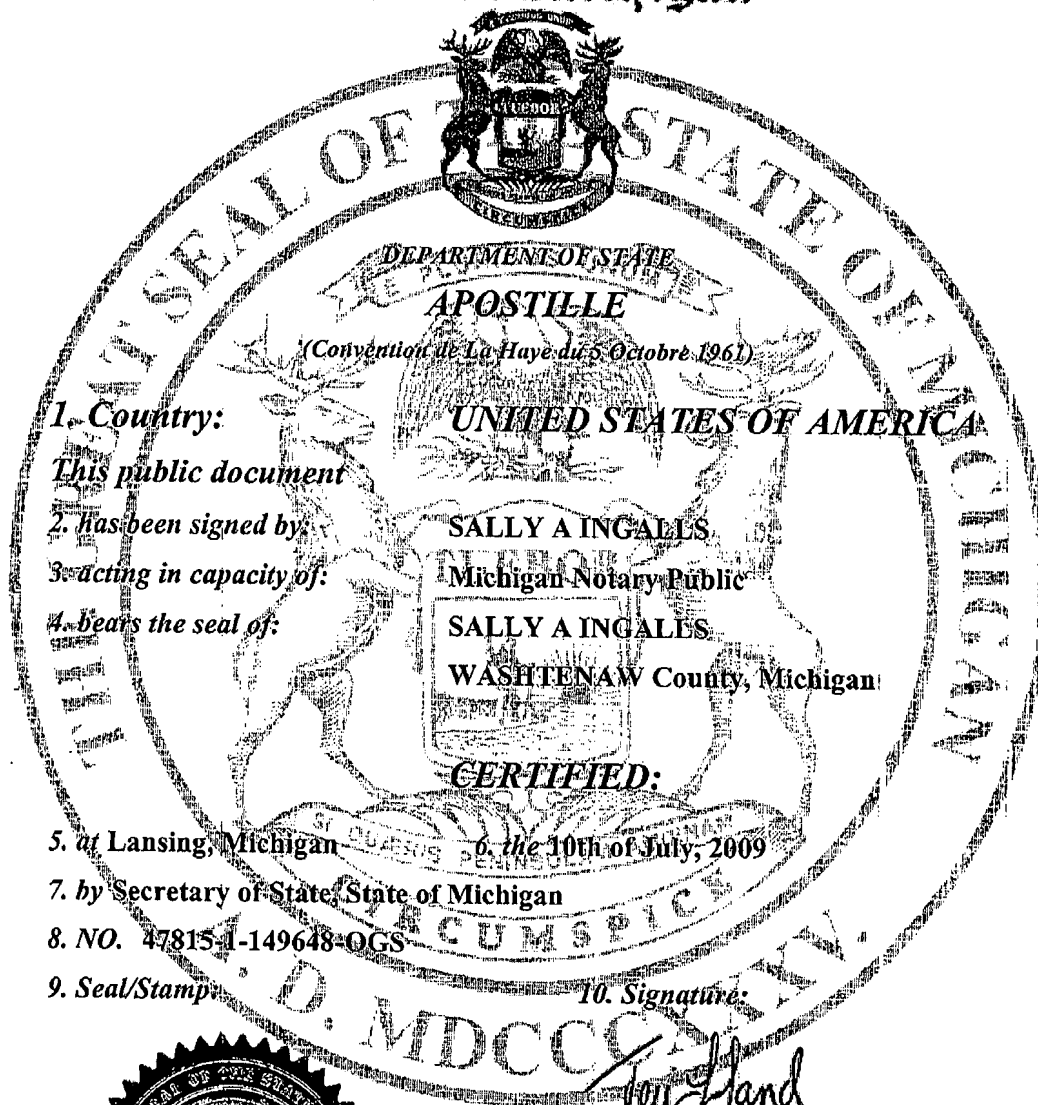
Dado y firmado a los _____ días del mes de
de 200_

Firma del Cedente
James H. WOODS
Firma del Cedente
Roger SUNAHARA
Firma del Cedente
Diwahar L. NARASIMHAN
Firma del Cedente
Victor YANG
Firma del Cedente
Mei-Chuan Holden KO
Firma del Cedente
John J. TESMER
Firma del Cedente
Tien-Yi LEE
Firma del Cedente
Young-Min KWON

Firma del Cesionario

198
215

State of Michigan



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. 47815-1-149648-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.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

On this 7th 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

Hoy de de
 personalmente compareció ante mí
 a quién conozco, y de quien me consta que firmó
 el anterior documento, debidamente juramentado
 declaró y dijo que él es
 de 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 Assignment document: 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.

Sociedad legalmente constituida para un periodo
 de duración que aún no ha terminado; que el
 declarante está autorizado por dicha compañía
 para conferir este documento de Cesión; que el
 sello estampado por él al pie de tal Cesión, 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 de la sociedad.

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

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

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

Estado de
 con fecha

and that he (she) who grants the present
 Assignment document is its Representative.

y que quien confiere el presente documento de
 Cesión es su representante.

Sally A. Ingalls
 Notary Public (Seal) SALLY A. INGALLS
July 2, 2009 NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
 NOTARIAL CERTIFICATE
 My Commission expires January 3, 2015
 Acting in the County of _____

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL
 PERSONA NATURAL

On this 7th day of July of 2009
 personally appeared before me
Yolung Min Kwon
 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.

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.

Sally A. Ingalls
 Notary Public (Seal) SALLY A. INGALLS
July 2, 2009 NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
 COUNTY OF WASHTENAW
 My Commission expires January 3, 2015
 Acting in the County of _____
 LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

Notario Público (sello)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.



11/4
26

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de **CESIÓN** a **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN – THE UNIVERSITY OF MICHIGAN**, firmado por el cedente y el cesionario.

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. 47815-1-149648-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

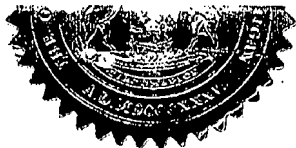
CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público, Estado de Michigan
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____

Hay un sello seco que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____
ESTADO DE MICHIGAN



DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned: James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mel-Chuan Holden KO; John J. TESMER;
Tien-Yi LEE and Young-Min KWON;

acting as Inventors
of Colombian Patent Application No. 09 010.531
Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

with domicile in Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB
III, Ann Arbor, MI 48109, US; 1130 Olivia Avenue,
Ann Arbor, MI 48104, US; 1507 Pine Valley
Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, US; 3629
Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, US;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, US; 2450 Adare Road, Ann
Arbor, MI 48104, US; 2222 Fuller Court, #204A, Ann
Arbor, MI 48105, US; 3650 Ranchero Dr., #203, Ann
Arbor, MI 48108, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of ownership as
well as all rights and privileges relating thereto
without exception over the following patent
application in Colombia No. 09 010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

to THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

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

The assignors and the assignee sign this document
as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the 24 day of July
of 2009

Signature of Assignor
James H. WOODS
Signature of Assignor
Roger SUNAHARA
Signature of Assignor
Diwahar L. NARASIMHAN
Signature of Assignor
Victor YANG
Signature of Assignor
Mel-Chuan Holden KO
Signature of Assignor
John J. TESMER
Signature of Assignor
Tien-Yi LEE
Signature of Assignor
Young-Min KWON

Signature

Signature of Assignee

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

CESION

Ruth L. Rasor
Director of Licensing
UM Technology Transfer

Los Suscritos James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mel-Chuan Holden KO; John J. TESMER;
Tien-Yi LEE y Young-Min KWON,
en calidad de Inventores
de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531
Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAINA Y
TRATAMIENTO

con domicilio en Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB
III, Ann Arbor, MI 48109, Estados Unidos de
América; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 1507 Pine Valley
Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos
de América; 3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI
48105, Estados Unidos de América; Department Of
Pharmacology, University Of Michigan, Medical
School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109-0632,
Estados Unidos de América; 2450 Adare Road, Ann
Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América; 2222
Fuller Court, #204A, Ann Arbor, MI 48105, Estados
Unidos de América; 3650 Ranchero Dr., #203, Ann
Arbor, MI 48108, Estados Unidos de América;
respectivamente,

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de
patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAINA Y
TRATAMIENTO

a THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
domiciliada 1214 S. University Avenue, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de
América.

Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de la
cesión.

Dado y firmado a los _____ días del mes de
de 2009

Firma del Cedente
James H. WOODS
Firma del Cedente
Roger SUNAHARA
Firma del Cedente
Diwahar L. NARASIMHAN
Firma del Cedente
Victor YANG
Firma del Cedente
Mel-Chuan Holden KO
Firma del Cedente
John J. TESMER
Firma del Cedente
Tien-Yi LEE
Firma del Cedente
Young-Min KWON

Firma del Cesionario

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

On this day of of
personally appeared before me

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

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 es

of THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

de 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 Assignment document; 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.

Sociedad legalmente constituida para un período
de duración que aún no ha terminado; que el
declarante está autorizado por dicha compañía
para conferir este documento de Cesión; que el
sello estampado por él al pie de tal Cesión, 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 de la sociedad.

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

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

State of:
under date of

Estado de
con fecha:

and that he (she) who grants the present
Assignment document is its Representative.

y que quien confiere el presente documento de
Cesión es su representante.

Notario Público (sello):

Notary Public (Seal)

NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

On this day of of
personally appeared before me

Hoy de de
compareció(eron) ante mí

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.

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.

Notary Public (Seal)

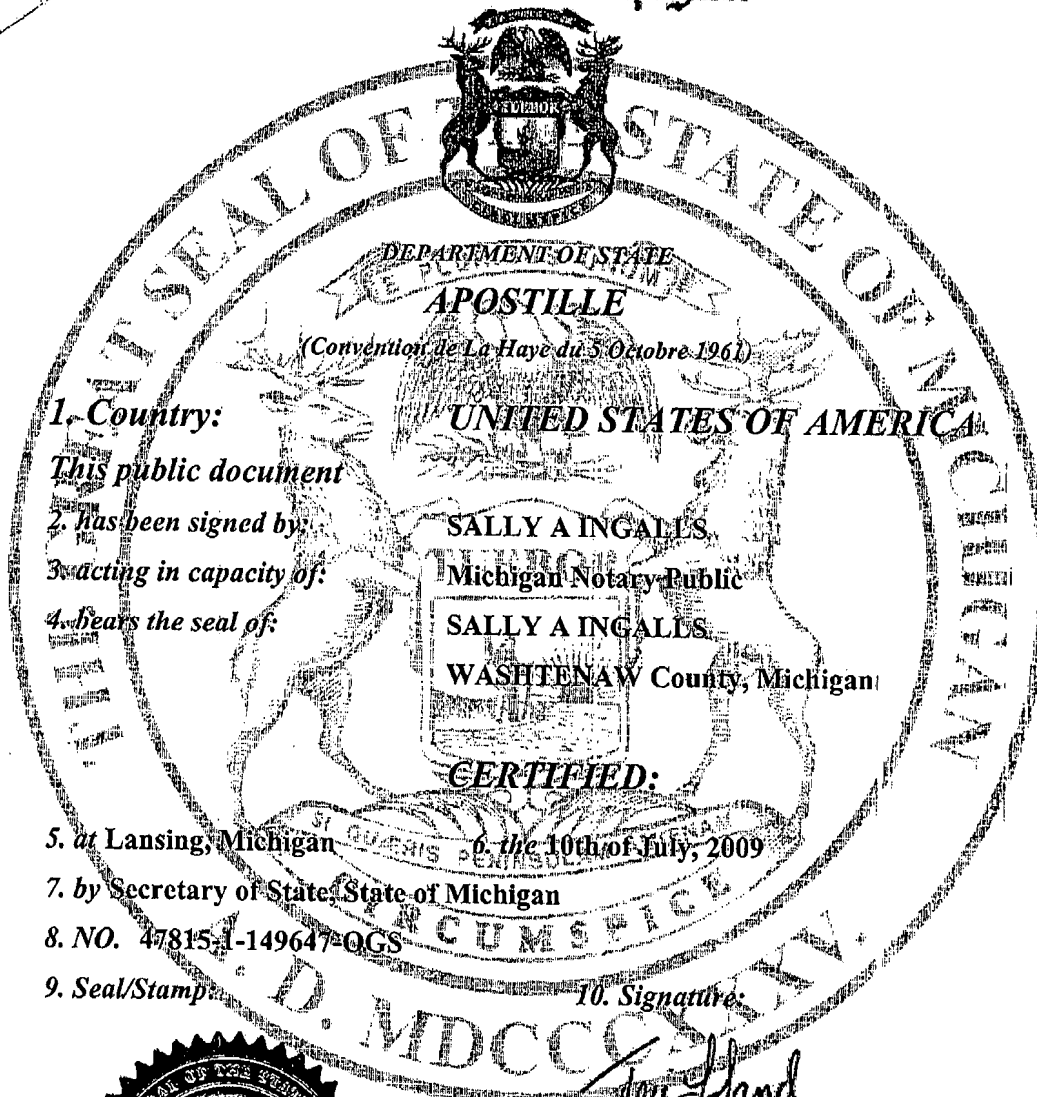
Notario Público (sello):

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

201
218

State of Michigan



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

on the 10th of July, 2009

7. by Secretary of State, State of Michigan

8. NO. 47815-1-149647-QGS

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.

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 Assignment document: 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
Assignment document is its Representative.

Sally A. Ingalls
Notary Public (Seal)

July 2, 2009
SALLY A. INGALLS

NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN

COUNTY OF WASHTENAW
NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON
My Commission expires January 3, 2015
Acting in the County of _____

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

Tien-Yi Lee

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.

Sally A. Ingalls
SALLY A. INGALLS

NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
COUNTY OF WASHTENAW
My Commission expires January 3, 2015
Acting in the County of _____

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 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 documento de Cesión; que el
sello estampado por él al pie de tal Cesión, 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 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 documento de
Cesión 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)

207-
219

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de CESIÓN a THE REGENTS
OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN – THE UNIVERSITY OF MICHIGAN,
firmado por el cedente y el cesionario.

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. 47815-1-149647-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

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de **CESIÓN** a **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN – THE UNIVERSITY OF MICHIGAN**, firmado por el cedente y el cesionario.

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. 47815-1-149647-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

2013
220

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público, Estado de Michigan
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____

Hay un sello seco que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____
ESTADO DE MICHIGAN



DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned **James H. WOODS; Roger SUNAHARA; Diwaha L. NARASIMHAN; Victor YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J. TESMER; Tien-Yi LEE and Young-Min KWON;**

acting as Inventors;

of Colombian Patent Application No. 09 010.531

Titled: **ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND TREATMENT**

with domicile in Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, US; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104, US; 1507 Pine Valley Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, US; 3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, US; Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109-0632, US; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104, US; 2222 Fuller Court, #204A, Ann Arbor, MI 48105, US; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI 48108, US; respectively,

hereby, declare that assign all rights of ownership as well as all rights and privileges relating thereto without exception over the following patent application in Colombia No. 09 010.531

Titled: **ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND TREATMENT**

to **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN**

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

The assignors and the assignee sign this document as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the *2nd* day of *July* of 200*9*

Signature of Assignor
James H. WOODS
Signature of Assignor
Roger SUNAHARA
Signature of Assignor
Diwaha L. NARASIMHAN
Signature of Assignor
Victor YANG
Signature of Assignor
Mei-Chuan Holden KO
Signature of Assignor
John J. TESMER
Signature of Assignor
Tien-Yi LEE
Signature of Assignor
Young-Min KWON

Signature of Assignee

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

Ruth L. Rasor
Director of Licensing
UM Technology Transfer

CESION

Los Suscritos **James H. WOODS; Roger SUNAHARA; Diwaha L. NARASIMHAN; Victor YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J. TESMER; Tien-Yi LEE y Young-Min KWON,** en calidad de Inventores de la solicitud de patente en Colombia No. 09 010.531
Titulada: **COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y TRATAMIENTO**

con domicilio en Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, Estados Unidos de América; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América; 1507 Pine Valley Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América; 3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América; Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109-0632, Estados Unidos de América; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América; 2222 Fuller Court, #204A, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI 48108, Estados Unidos de América; respectivamente,

declaran por el presente documento que cede todos los derechos de propiedad que les correspondan, así como las prerrogativas, sin excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: **COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y TRATAMIENTO**

a **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN** domiciliada 1214 S. University Avenue, 2nd Floor Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América.

Los cedentes y el cesionario firman este documento como prueba de su aceptación de la cesión.

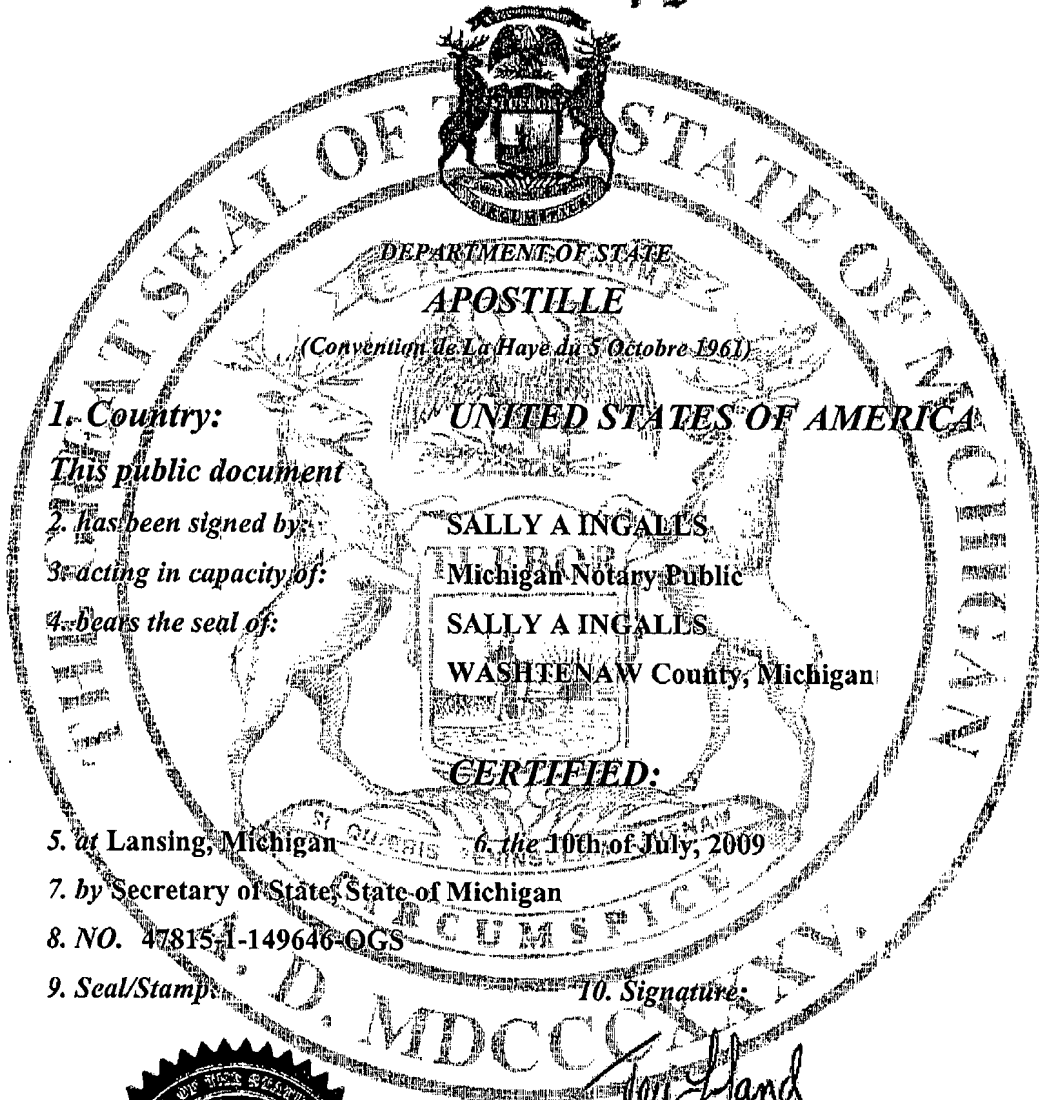
Dado y firmado a los _____ días del mes de _____ de 200_

Firma del Cedente
James H. WOODS
Firma del Cedente
Roger SUNAHARA
Firma del Cedente
Diwaha L. NARASIMHAN
Firma del Cedente
Victor YANG
Firma del Cedente
Mei-Chuan Holden KO
Firma del Cedente
John J. TESMER
Firma del Cedente
Tien-Yi LEE
Firma del Cedente
Young-Min KWON

Firma del Cesionario

207
221

State of Michigan



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. 47815-1-149646-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 with 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.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

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

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 es
 de 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 Assignment document: 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.

Sociedad legalmente constituida para un período
 de duración que aún no ha terminado; que el
 declarante está autorizado por dicha compañía
 para conferir este documento de Cesión; que el
 sello estampado por él al pie de tal Cesión, 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 de la sociedad.

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

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

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

Estado de
 con fecha

Jan. 1963
 and that he (she) who grants the present
 Assignment document is its Representative.

y que quien confiere el presente documento de
 Cesión es su representante.

Sally A. Ingalls
 Notary Public (Seal) July 2, 2009
 SALLY A. INGALLS
 NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
 COUNTY OF WASHTENAW
 My Commission expires January 3, 2015
 Acting in the County of _____

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL
 PERSONA NATURAL

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

Hoy de de
 compareció(eron) ante mí

John J. Tesmer
 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.

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.

Sally A. Ingalls
 NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
 COUNTY OF WASHTENAW
 My Commission expires January 3, 2015
 Acting in the County of _____

Notario Público (sello)

205
222

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de **CESIÓN** a **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN – THE UNIVERSITY OF MICHIGAN**, firmado por el cedente y el cesionario.

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. 47815-1-149646-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

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público, Estado de Michigan
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____

Hay un sello seco que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____
ESTADO DE MICHIGAN



MENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J. TESMER;
Tien-Yi LEE and Young-Min KWON;

acting as Inventors
of Colombian Patent Application No. 09 010.531
Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

with domicile in Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB
III, Ann Arbor, MI 48109, US; 1130 Olivia Avenue,
Ann Arbor, MI 48104, US; 1507 Pine Valley
Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, US; 3629
Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, US;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, US; 2450 Adare Road, Ann
Arbor, MI 48104, US; 2222 Fuller Court, #204A, Ann
Arbor, MI 48105, US; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann
Arbor, MI 48108, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of ownership as
well as all rights and privileges relating thereto
without exception over the following patent
application in Colombia No. 09 010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

to THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

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

The assignors and the assignee sign this document
as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the *And* day of *July*
of 200*9*

Signature of Assignor
James H. WOODS
Signature of Assignor
Roger SUNAHARA
Signature of Assignor
Diwahar L. NARASIMHAN
Signature of Assignor
Victor YANG
Signature of Assignor
Mei-Chuan Holden KO
Signature of Assignor
John J. TESMER
Signature of Assignor
Tien-Yi LEE
Signature of Assignor
Young-Min KWON

Am 16

Ruth L. Rasor
Signature of Assignee

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

CESION
Ruth L. Rasor
Director of Licensing
UM Technology Transfer

Los Suscritos James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J. TESMER;
Tien-Yi LEE y Young-Min KWON,
en calidad de Inventores
de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531
Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO

con domicilio en Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB
III, Ann Arbor, MI 48109, Estados Unidos de
América; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 1507 Pine Valley
Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos
de América; 3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI
48105, Estados Unidos de América; Department Of
Pharmacology, University Of Michigan, Medical
School; 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109-0632,
Estados Unidos de América; 2450 Adare Road, Ann
Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América; 2222
Fuller Court, #204A, Ann Arbor, MI 48105, Estados
Unidos de América; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann
Arbor, MI 48108, Estados Unidos de América;
respectivamente,

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de
patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO

a THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
domiciliada 1214 S. University Avenue, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de
América.

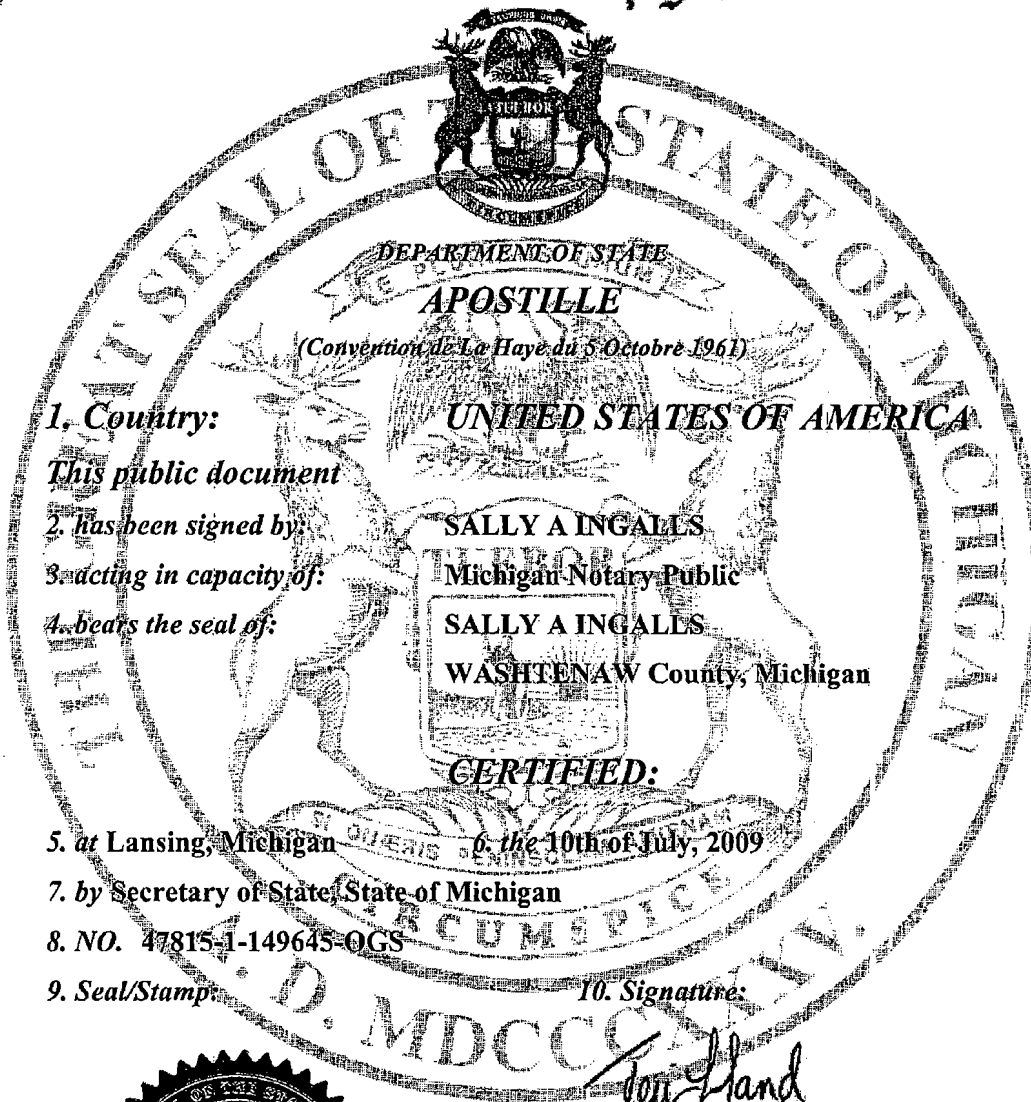
Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de la
cesión.

Dado y firmado a los días del mes de
de 200*9*

Firma del Cedente
James H. WOODS
Firma del Cedente
Roger SUNAHARA
Firma del Cedente
Diwahar L. NARASIMHAN
Firma del Cedente
Victor YANG
Firma del Cedente
Mei-Chuan Holden KO
Firma del Cedente
John J. TESMER
Firma del Cedente
Tien-Yi LEE
Firma del Cedente
Young-Min KWON

Firma del Cesionario

State of Michigan



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. 47815-1-149645-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.

207
224

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 Assignment document: 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
Assignment document is its Representative.

Notary Public (Seal)

Sally A. Ingalls
JULY 2, 2009
SALLY A. INGALLS
NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
COUNTY OF WASHTENAW
NATURAL PERSON
My Commission Expires January 3, 2015
Acting in the County of _____

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

Mei-Chuan Holden KO
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

Sally A. Ingalls
JULY 2, 2009
SALLY A. INGALLS
NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
COUNTY OF WASHTENAW
My Commission Expires January 3, 2015
Acting in the County of _____

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 es

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

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

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de **CESIÓN** a **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN – THE UNIVERSITY OF MICHIGAN**, firmado por el cedente y el cesionario.

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. 47815-1-149645-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

208
225

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público, Estado de Michigan
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____

Hay un sello seco que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____
ESTADO DE MICHIGAN



**DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION**

ASSIGNMENT

The Undersigned: **James H. WOODS; Roger SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J. TESMER; Tien-Yi LEE and Young-Min KWON;**

acting as inventors
of Colombian Patent Application No. 09 010.531
Titled: **ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND TREATMENT**

with domicile in Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, US; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104, US; 1507 Pine Valley Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, US; 3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, US; Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109-0632, US; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104, US; 2222 Fuller Court, #204A, Ann Arbor, MI 48105, US; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI 48108, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of ownership as well as all rights and privileges relating thereto without exception over the following patent application in Colombia No. 09 010.531

Titled: **ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND TREATMENT**

to **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN**

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

The assignors and the assignee sign this document as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the *2nd* day of *July* of 200*9*

Signature of Assignor
James H. WOODS
Signature of Assignor
Roger SUNAHARA
Signature of Assignor
Diwahar L. NARASIMHAN
Signature of Assignor
Victor **Victor YANG**
Signature of Assignor
Mei-Chuan Holden KO
Signature of Assignor
John J. TESMER
Signature of Assignor

Los Suscritos **James H. WOODS; Roger SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J. TESMER; Tien-Yi LEE y Young-Min KWON,**

en calidad de Inventores
de la solicitud de patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: **COMPOSICIONES ANTI-COCAINA Y TRATAMIENTO**

con domicilio en: Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, Estados Unidos de América; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América; 1507 Pine Valley Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América; 3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América; Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109-0632, Estados Unidos de América; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América; 2222 Fuller Court, #204A, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI 48108, Estados Unidos de América; respectivamente,

declaran por el presente documento que cede todos los derechos de propiedad que les correspondan, así como las prerrogativas, sin excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: **COMPOSICIONES ANTI-COCAINA Y TRATAMIENTO**

a **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN**

domiciliada 1214 S. University Avenue, 2nd Floor Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América.

Los cedentes y el cesionario firman este documento como prueba de su aceptación de la cesión.

Dado y firmado a los _____ días del mes de _____ de 200_

Firma del Cedente
James H. WOODS
Firma del Cedente
Roger SUNAHARA
Firma del Cedente
Diwahar L. NARASIMHAN
Firma del Cedente
Victor YANG
Firma del Cedente
Mei-Chuan Holden KO
Firma del Cedente
John J. TESMER
Firma del Cedente

207
226

DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG; Mel-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-Yi LEE and Young-Min KWON;

acting as Inventors
of Colombian Patent Application No. 09 010.531
Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

with domicile in Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, US; 1130 Olivia
Avenue, Ann Arbor, MI 48104, US; 1507 Pine
Valley Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, US;
3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, US;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, US; 2450 Adare Road, Ann
Arbor, MI 48104, US; 2222 Fuller Court, #204A,
Ann Arbor, MI 48105, US; 3660 Ranchero Dr.,
#203, Ann Arbor, MI 48108, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of ownership as
well as all rights and privileges relating thereto
without exception over the following patent
application in Colombia No. 09 010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

to THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

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

The assignors and the assignee sign this document
as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the 2 day of July
of 2009

Signature of Assignor
James H. WOODS
Signature of Assignor
Roger SUNAHARA
Signature of Assignor
Diwahar L. NARASIMHAN
Signature of Assignor
Victor YANG
Signature of Assignor
Mel-Chuan Holden KO
Signature of Assignor
John J. TESMER
Signature of Assignor
Tien-Yi LEE
Signature of Assignor
Young-Min KWON


Signature of Assignee

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

Ruth L. Rasor
Director of Licensing
UM Technology Transfer

CESION

Los Suscritos James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG; Mel-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-Yi LEE y Young-Min KWON,
en calidad de Inventores
de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531
Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO

con domicilio en Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, Estados Unidos de
América; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 1507 Pine Valley
Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, Estados
Unidos de América; 3629 Tanglewood Drive, Ann
Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, Estados Unidos de
América; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 2222 Fuller Court,
#204A, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de
América; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI
48108, Estados Unidos de América;
respectivamente,

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de
patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO
a THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
domiciliada 1214 S. University Avenue, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de
América.

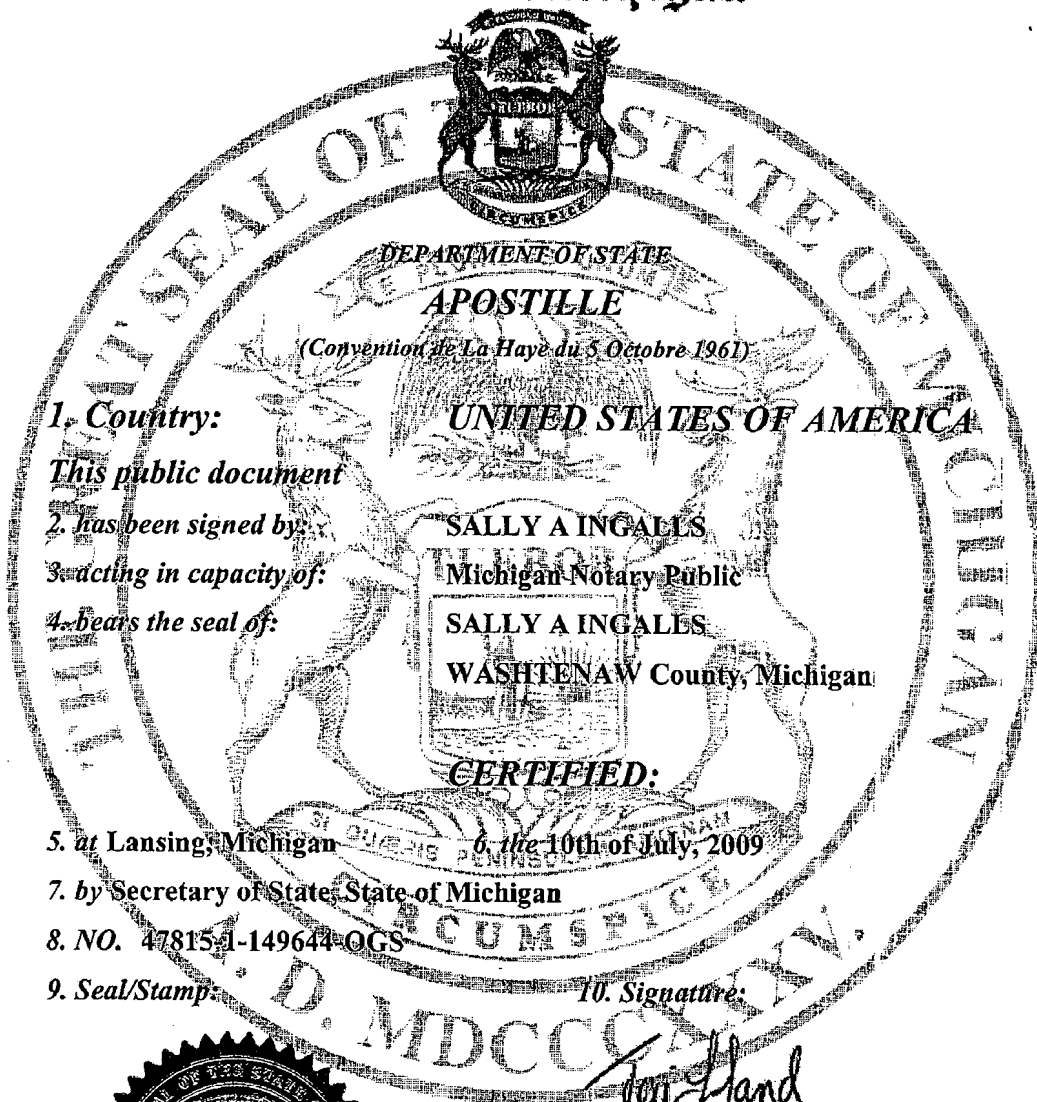
Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de la
cesión.

Dado y firmado a los _____ días del mes de
de 2009

Firma del Cedente
James H. WOODS
Firma del Cedente
Roger SUNAHARA
Firma del Cedente
Diwahar L. NARASIMHAN
Firma del Cedente
Victor YANG
Firma del Cedente
Mel-Chuan Holden KO
Firma del Cedente
John J. TESMER
Firma del Cedente
Tien-Yi LEE
Firma del Cedente
Young-Min KWON

Firma del Cesionario

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. 47815-1-149644 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.

210
227

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

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

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 es

de 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 Assignment document; 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.

Sociedad legalmente constituida para un período
de duración que aún no ha terminado; que el
declarante está autorizado por dicha compañía
para conferir este documento de Cesión; que el
sello estampado por él al pie de la Cesión, 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 de la sociedad.

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

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

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

Estado de
con fecha

and that he (she) who grants the present
Assignment document is its Representative.

y que quien confiere el presente documento de
Cesión es su representante.

Notary Public (Seal) Sally A. Ingalls
SALLY A. INGALLS July 2, 2009
NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
NOTARIAL CERTIFICATE
COUNTY OF WASHTENAW
NATURAL PERSON
My Commission expires January 3, 2015
Acting in the County of _____

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

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

Hoy de de
compareció(eron) ante mí

Victor Yano
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.

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.

Sally A. Ingalls
SALLY A. INGALLS July 2, 2009
NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
COUNTY OF WASHTENAW
My Commission expires January 3, 2015
Acting in the County of _____

Notario Público (sello)

2/11/15
228

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público, Estado de Michigan
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____

Hay un sello seco que dice:

SALLY A. INGALLS
Estado de Michigan



**DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION**

ASSIGNMENT

The Undersigned: James H. WOODS; Roger SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor YANG; Mei-Chuan Holden KO; John J. TESMER; Tien-Yi LEE and Young-Min KWON;

acting as Inventors
of Colombian Patent Application No. 09 010.531
Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND TREATMENT

with domicile in Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, US; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104, US; 1507 Pine Valley Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, US; 3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, US; Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109-0632, US; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104, US; 2222 Fuller Court, #204A, Ann Arbor, MI 48105, US; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI 48108, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of ownership as well as all rights and privileges relating thereto without exception over the following patent application in Colombia No. 09 010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND TREATMENT

to THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

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

The assignors and the assignee sign this document as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the 2nd day of July of 2009

Signature of Assignor
James H. WOODS
Signature of Assignor
Roger SUNAHARA
Signature of Assignor
Diwahar L. NARASIMHAN
Signature of Assignor
Victor YANG
Signature of Assignor
Mei-Chuan Holden KO
Signature of Assignor
John J. TESMER
Signature of Assignor

L. Diwahar

CESSION

Los Suscritos James H. WOODS; Roger SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor YANG; Mei-Chuan Holden KO; John J. TESMER; Tien-Yi LEE y Young-Min KWON, en calidad de Inventores de la solicitud de patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y TRATAMIENTO

con domicilio en Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, Estados Unidos de América; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América; 1507 Pine Valley Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América; 3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América; Department Of Pharmacology, University Of Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann Arbor, MI 48109-0632, Estados Unidos de América; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América; 2222 Fuller Court, #204A, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI 48108, Estados Unidos de América; respectivamente,

declaran por el presente documento que cede todos los derechos de propiedad que les correspondan, así como las prerrogativas, sin excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y TRATAMIENTO

a THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN domiciliada 1214 S. University Avenue, 2nd Floor Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de América.

Los cedentes y el cesionario firman este documento como prueba de su aceptación de la cesión.

Dado y firmado a los _____ días del mes de _____ de 2009

Firma del Cedente:
James H. WOODS
Firma del Cedente:
Roger SUNAHARA
Firma del Cedente:
Diwahar L. NARASIMHAN
Firma del Cedente:
Victor YANG
Firma del Cedente:
Mei-Chuan Holden KO
Firma del Cedente:

L. Diwahar

219
229

DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-Yi LEE and Young-Min KWON;

acting as Inventors
of Colombian Patent Application No. 09 010.531
Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

with domicile in Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, US; 1130 Olivia
Avenue, Ann Arbor, MI 48104, US; 1507 Pine
Valley Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, US;
3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, US;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, US; 2450 Adare Road, Ann
Arbor, MI 48104, US; 2222 Fuller Court, #204A,
Ann Arbor, MI 48105, US; 3660 Ranchero Dr.,
#203, Ann Arbor, MI 48108, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of ownership as
well as all rights and privileges relating thereto
without exception over the following patent
application in Colombia No. 09 010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

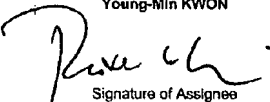
to THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

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

The assignors and the assignee sign this document
as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the 2 day of July
of 200_9

Signature of Assignor
James H. WOODS
Signature of Assignor
Roger SUNAHARA
Signature of Assignor
Diwahar L. NARASIMHAN
Signature of Assignor
Victor YANG
Signature of Assignor
Mei-Chuan Holden KO
Signature of Assignor
John J. TESMER
Signature of Assignor
Tien-Yi LEE
Signature of Assignor
Young-Min KWON


Signature of Assignee

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

Ruth L. Razor
Director of Licensing
UM Technology Transfer

CESION

Los Suscritos James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-Yi LEE y Young-Min KWON,
en calidad de Inventores
de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531
Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO

con domicilio en Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, Estados Unidos de
América; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 1507 Pine Valley
Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, Estados
Unidos de América; 3629 Tanglewood Drive, Ann
Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, Estados Unidos de
América; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 2222 Fuller Court,
#204A, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de
América; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI
48108, Estados Unidos de América;
respectivamente,

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de
patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO
a THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
domiciliada 1214 S. University Avenue, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de
América.

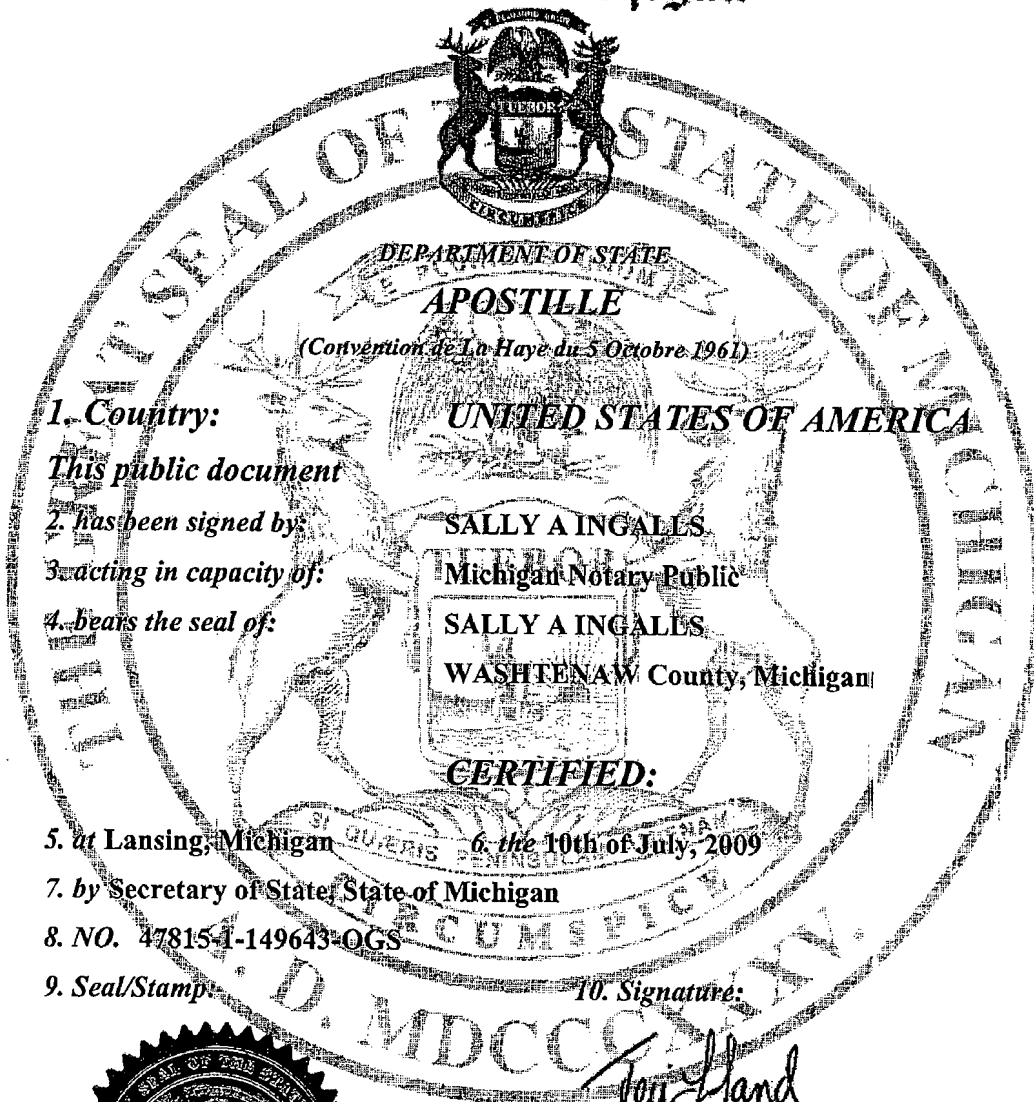
Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de la
cesión.

Dado y firmado a los días del mes de
de 200_

Firma del Cedente
James H. WOODS
Firma del Cedente
Roger SUNAHARA
Firma del Cedente
Diwahar L. NARASIMHAN
Firma del Cedente
Victor YANG
Firma del Cedente
Mei-Chuan Holden KO
Firma del Cedente
John J. TESMER
Firma del Cedente
Tien-Yi LEE
Firma del Cedente
Young-Min KWON

Firma del Cesionario

State of Michigan



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. 478154-149643 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.

213
230

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

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

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 es

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

de 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 Assignment document: 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.

Sociedad legalmente constituida para un período
de duración que aún no ha terminado; que el
declarante está autorizado por dicha compañía
para conferir este documento de Cesión; que el
sello estampado por él al pie de tal Cesión, 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 de la sociedad.

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

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

State of Michigan Constitution Art. 8 Sect. 5
under date of 0

Estado de
con fecha

Jan, 1963

and that he (she) who grants the present
Assignment document is its Representative.

y que quien confiere el presente documento de
Cesión es su representante.

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

Notario Público (sello)

SALLY A. INGALLS
NOTARY PUBLIC, STATE OF MICHIGAN
COUNTY OF WASHTENAW
NATURAL PERSON
My Commission expires January 3, 2015
Acting in the County of _____

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

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

Hoy de de
compareció(eron) ante mí

Diwahar L. Narasimhan
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

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

Sally A. Ingalls
Notary Public (Seal) July 2, 2009
SALLY A. INGALLS
NOTARY PUBLIC, STATE OF MICHIGAN
COUNTY OF WASHTENAW
My Commission expires January 3, 2015
Acting in the County of _____

Notario Público (sello)

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de CESIÓN a THE REGENTS
OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN – THE UNIVERSITY OF MICHIGAN,
firmado por el cedente y el cesionario.

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. 47815-1-149643-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

231 ~~214~~

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público, Estado de Michigan
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015:
Actuando en el Condado de _____

Hay un sello seco que dice:

SALLY A. INGALLS
Estado de Michigan



DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-Yi LEE and Young-Min KWON;

acting as Inventors
of Colombian Patent Application No. 09 010.531
Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

with domicile in Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, US; 1130 Olivia
Avenue, Ann Arbor, MI 48104, US; 1507 Pine
Valley Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, US;
3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, US;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, US; 2450 Adare Road, Ann
Arbor, MI 48104, US; 2222 Fuller Court, #204A,
Ann Arbor, MI 48105, US; 3660 Ranchero Dr.,
#203, Ann Arbor, MI 48108, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of ownership as
well as all rights and privileges relating thereto
without exception over the following patent
application in Colombia No. 09 010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

to THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

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

The assignors and the assignee sign this document
as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the 2nd day of July
of 2009

Signature of Assignor
James H. WOODS
Signature of Assignor
Roger SUNAHARA
Signature of Assignor
Diwahar L. NARASIMHAN
Signature of Assignor
Victor YANG
Signature of Assignor
Mei-Chuan Holden KO
Signature of Assignor
John J. TESMER
Signature of Assignor
Tien-Yi LEE

CESSION

Los Suscritos James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-Yi LEE y Young-Min KWON,
en calidad de Inventores
de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO

con domicilio en Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, Estados Unidos de
América; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 1507 Pine Valley
Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, Estados
Unidos de América; 3629 Tanglewood Drive, Ann
Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, Estados Unidos de
América; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 2222 Fuller Court,
#204A, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de
América; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI
48108, Estados Unidos de América;
respectivamente,

declararán por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de
patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO

a THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
domiciliada 1214 S. University Avenue, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de
América.

Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de la
cesión.

Dado y firmado a los días del mes de
de 2009

Firma del Cedente
James H. WOODS
Firma del Cedente
Roger SUNAHARA
Firma del Cedente
Diwahar L. NARASIMHAN
Firma del Cedente
Victor YANG
Firma del Cedente
Mei-Chuan Holden KO
Firma del Cedente
John J. TESMER

215
232

DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG; Mei-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-Yi LEE and Young-Min KWON;

acting as Inventors
of Colombian Patent Application No. 09 010.531
Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

with domicile in Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, US; 1130 Olivia
Avenue, Ann Arbor, MI 48104, US; 1507 Pine
Valley Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, US;
3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, US;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, US; 2450 Adare Road, Ann
Arbor, MI 48104, US; 2222 Fuller Court, #204A,
Ann Arbor, MI 48105, US; 3660 Ranchero Dr.,
#203, Ann Arbor, MI 48109, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of ownership as
well as all rights and privileges relating thereto
without exception over the following patent
application in Colombia No. 09 010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

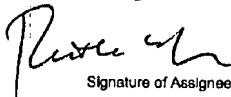
to THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

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

The assignors and the assignee sign this document
as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the 2 day of July
of 2009.

Signature of Assignor
James H. WOODS
Signature of Assignor
Roger SUNAHARA
Signature of Assignor
Diwahar L. NARASIMHAN
Signature of Assignor
Victor YANG
Signature of Assignor
Mei-Chuan Holden KO
Signature of Assignor
John J. TESMER
Signature of Assignor
Tien-Yi LEE
Signature of Assignor
Young-Min KWON


Signature of Assignee

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

Ruth L. Rasor
Director of Licensing
UM Technology Transfer

CESION

Los Suscritos James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG; Mei-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-Yi LEE y Young-Min KWON,
en calidad de Inventores
de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531
Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO

con domicilio en Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48109, Estados Unidos de
América; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 1507 Pine Valley
Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, Estados
Unidos de América; 3629 Tanglewood Drive, Ann
Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, Estados Unidos de
América; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 2222 Fuller Court,
#204A, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de
América; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI
48109, Estados Unidos de América;
respectivamente,

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de
patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO
a THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
domiciliada 1214 S. University Avenue, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de
América.

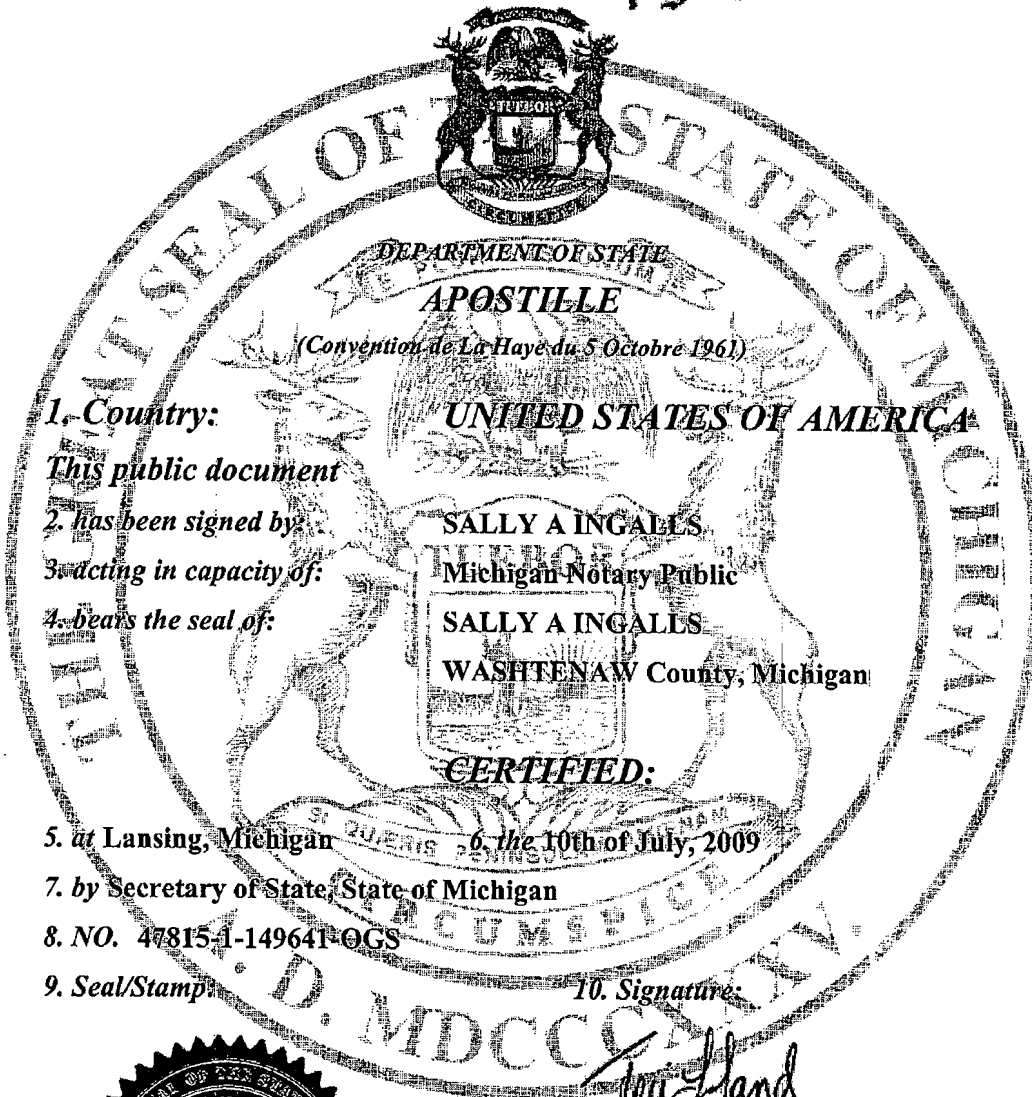
Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de la
cesión.

Dado y firmado a los días del mes de
de 2009.

Firma del Cedente
James H. WOODS
Firma del Cedente
Roger SUNAHARA
Firma del Cedente
Diwahar L. NARASIMHAN
Firma del Cedente
Victor YANG
Firma del Cedente
Mei-Chuan Holden KO
Firma del Cedente
John J. TESMER
Firma del Cedente
Tien-Yi LEE
Firma del Cedente
Young-Min KWON

Firma del Cesionario

State of Michigan



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. 47815-1-149641-OCS

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.

216
233

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

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

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 es
de 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 Assignment document: 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.

Sociedad legalmente constituida para un período
de duración que aún no ha terminado; que el
declarante está autorizado por dicha compañía
para conferir este documento de Cesión; que el
sello estampado por él al pie de tal Cesión, 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 de la sociedad.

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

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

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

Estado de
con fecha

Jan. 1963

and that he (she) who grants the present
Assignment document is its Representative.

y que quien confiere el presente documento de
Cesión es su representante.

Sally A. Ingalls
Notary Public (Seal)
SALLY A. INGALLS
NOTARY PUBLIC
STATE OF MICHIGAN
COUNTY OF WASHTENAW
My Commission expires January 3, 2015
Acting in the County of _____
NATURAL PERSON

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

James H. Woods
On this 2nd day of July of 2009
personally appeared before me

Hoy _____ de _____ de _____
compareció(eron) ante mí

James H. Woods
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.

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.

Sally A. Ingalls
SALLY A. INGALLS
NOTARY PUBLIC
STATE OF MICHIGAN
COUNTY OF WASHTENAW
My Commission expires January 3, 2015
Acting in the County of _____

Notario Público (sello)

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de CESIÓN a THE REGENTS
OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN – THE UNIVERSITY OF MICHIGAN,
firmado por el cedente y el cesionario.

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. 47815-1-149641-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

217
234

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público, Estado de Michigan
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____

Hay un sello seco que dice:

SALLY A. INGALLS
Estado de Michigan



DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-YI LEE and Young-Min KWON;

acting as Inventors
of Colombian Patent Application No. 09 010.531
Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

with domicile in Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48106, US; 1130 Olivia
Avenue, Ann Arbor, MI 48104, US; 1507 Pine
Valley Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, US;
3629 Tanglewood Drive, Ann Arbor, MI 48105, US;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, US; 2450 Adare Road, Ann
Arbor, MI 48104, US; 2222 Fuller Court, #204A,
Ann Arbor, MI 48105, US; 3660 Ranchero Dr.,
#203, Ann Arbor, MI 48106, US; respectively,

hereby declare that assign all rights of ownership as
well as all rights and privileges relating thereto
without exception over the following patent
application in Colombia No. 09 010.531

Titled: ANTI-COCAINE COMPOSITIONS AND
TREATMENT

to THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

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

The assignors and the assignee sign this document
as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the 2nd day of July
of 2009

Signature of Assignor
James H. WOODS
Signature of Assignor
Roger SUNAHARA
Signature of Assignor
Diwahar L. NARASIMHAN
Signature of Assignor
Victor YANG
Signature of Assignor
Mei-Chuan Holden KO
Signature of Assignor
John J. TESMER
Signature of Assignor
Tien-YI LEE
Signature of Assignor
Young-Min KWON

Signature of Assignee

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

Ruth L. Rasor
Director of Licensing
UM Technology Transfer

CESSION

Los Suscritos James H. WOODS; Roger
SUNAHARA; Diwahar L. NARASIMHAN; Victor
YANG, Mei-Chuan Holden KO; John J.
TESMER; Tien-YI LEE y Young-Min KWON,
en calidad de Inventores
de la solicitud de patente en Colombia No. 09
010.531
Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO

con domicilio en Department Of Pharmacology,
University Of Michigan, Medical School, 1301
MSRB III, Ann Arbor, MI 48106, Estados Unidos de
América; 1130 Olivia Avenue, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 1507 Pine Valley
Boulevard #7, Ann Arbor, MI 48104, Estados
Unidos de América; 3629 Tanglewood Drive, Ann
Arbor, MI 48105, Estados Unidos de América;
Department Of Pharmacology, University Of
Michigan, Medical School, 1301 MSRB III, Ann
Arbor, MI 48109-0632, Estados Unidos de
América; 2450 Adare Road, Ann Arbor, MI 48104,
Estados Unidos de América; 2222 Fuller Court,
#204A, Ann Arbor, MI 48105, Estados Unidos de
América; 3660 Ranchero Dr., #203, Ann Arbor, MI
48106, Estados Unidos de América;
respectivamente,

declaran por el presente documento que cede
todos los derechos de propiedad que les
correspondan, así como las prerrogativas, sin
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de
patente en Colombia No. 09 010.531

Titulada: COMPOSICIONES ANTI-COCAÍNA Y
TRATAMIENTO
a THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN - THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
domiciliada 1214 S. University Avenue, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48104, Estados Unidos de
América.

Los cedentes y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de la
cesión.

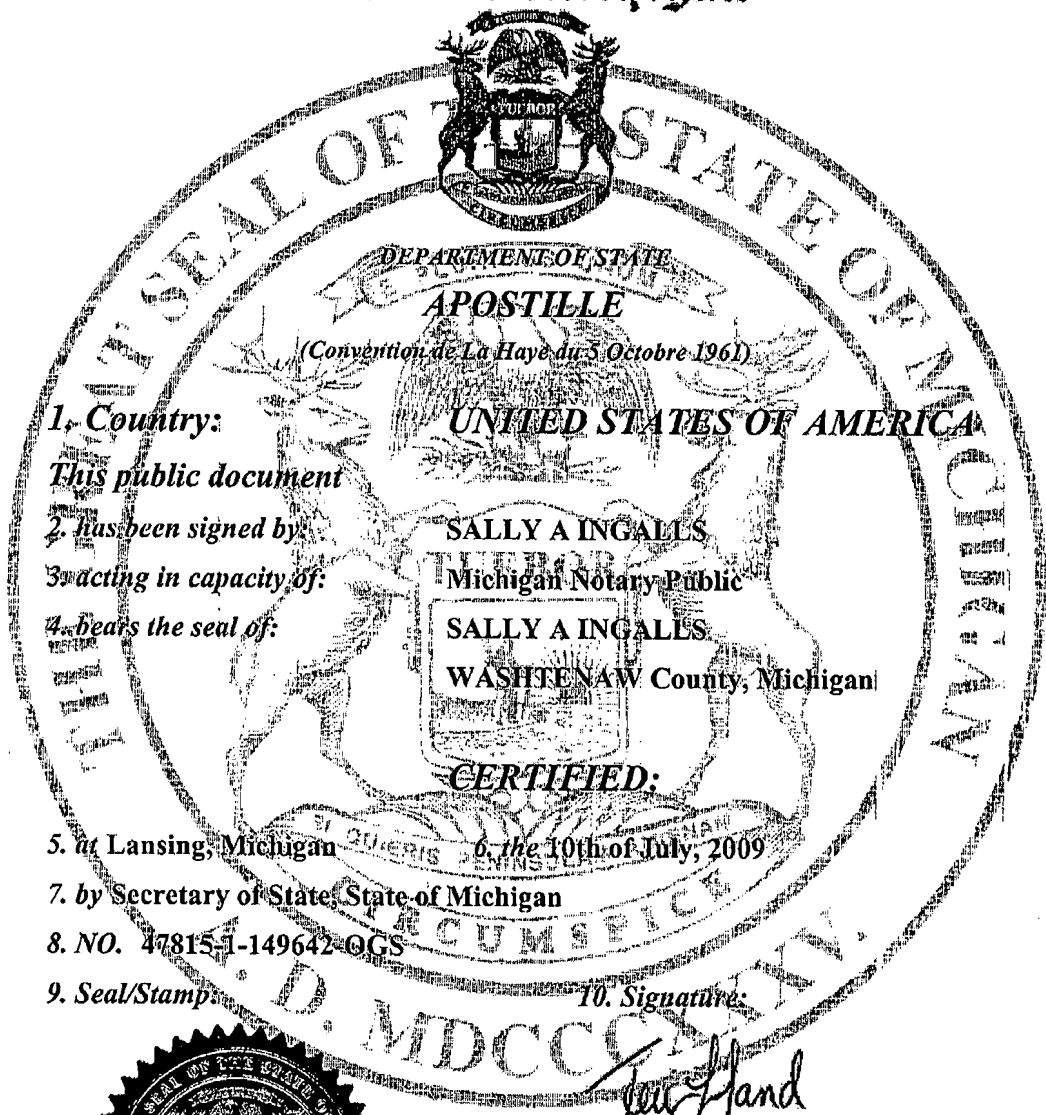
Dado y firmado a los _____ días del mes de
de 2009

Firma del Cedente
James H. WOODS
Firma del Cedente
Roger SUNAHARA
Firma del Cedente
Diwahar L. NARASIMHAN
Firma del Cedente
Victor YANG
Firma del Cedente
Mei-Chuan Holden KO
Firma del Cedente
John J. TESMER
Firma del Cedente
Tien-YI LEE
Firma del Cedente
Young-Min KWON

Firma del Cesionario

218
235

State of Michigan



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. 47815-1-149642-OCS

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 with 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.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 2nd day of July of 2009
personally appeared before me
Ruth H. 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 Assignment document: 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
Assignment document is its Representative.

Sally A. Ingalls July 2, 2009
Notary Public (Seal)
SALLY A. INGALLS
NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
COUNTY OF WASHTENAW
NOTARIAL CERTIFICATE
My Commission expires January 3, 2015
Acting in the County of NATURAL PERSON

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

Roger Sunahara
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.

Sally A. Ingalls July 2, 2009
Notary Public (Seal)
SALLY A. INGALLS
NOTARY PUBLIC - STATE OF MICHIGAN
COUNTY OF WASHTENAW
My Commission expires January 3, 2015
Acting in the County of _____

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 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 documento de Cesión; que el
sello estampado por él al pie de tal Cesión, 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 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 documento de
Cesión 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)

219
236

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de **CESIÓN** a **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN – THE UNIVERSITY OF MICHIGAN**, firmado por el cedente y el cesionario.

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. 47815-1-149642-OGS
9. Sello/timbre

10. Firma

(firma)
Terri Lynn Land

Esta certificación acredita únicamente la autenticidad de la firma del funcionario que 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

CERTIFICADO NOTARIAL

Hay un sello que dice:

SALLY A. INGALLS
Notario Público, Estado de Michigan
Condado de Washtenaw
Mi comisión vence el 3 de enero de 2015
Actuando en el Condado de _____

Hay un sello seco que dice:

SALLY A. INGALLS
Estado de Michigan