

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



02 102350 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 02102350 00000000

Folios: 127

Fecha (AMB): 2002-11-12 15:45:19

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: F.HOFFMANN-LA ROCHE AG

Dirección: Grenzacherstrasse 124,
CH-4070

Nacionalidad o Domicilio: Basle, Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: 3284270 Fax: 8069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: JOSE ANTONIO LLOREDA

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5o.

Teléfono: 3284270 Fax: 8069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 17.159.681 TP 10.784

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: Apollon, Papadimitriou

Dirección: Bachstrasse 38a, 83673 Bichl, (Alemania)

Nacionalidad o Domicilio: Alemania

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP01/05187

Fecha: 08/05/01

Publicación Internacional No. WO 01/87329 A1

Fecha: 22/11/01

⑥

Título (54)

"COMPOSICION FARMACEUTICA LIQUIDA "

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 38/18

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

EP

15-05-00

00110355.5

SI ☒ NO ☐

⑨

Comprobante de Pago No. 02-65,999

Fecha: Octubre 3/02

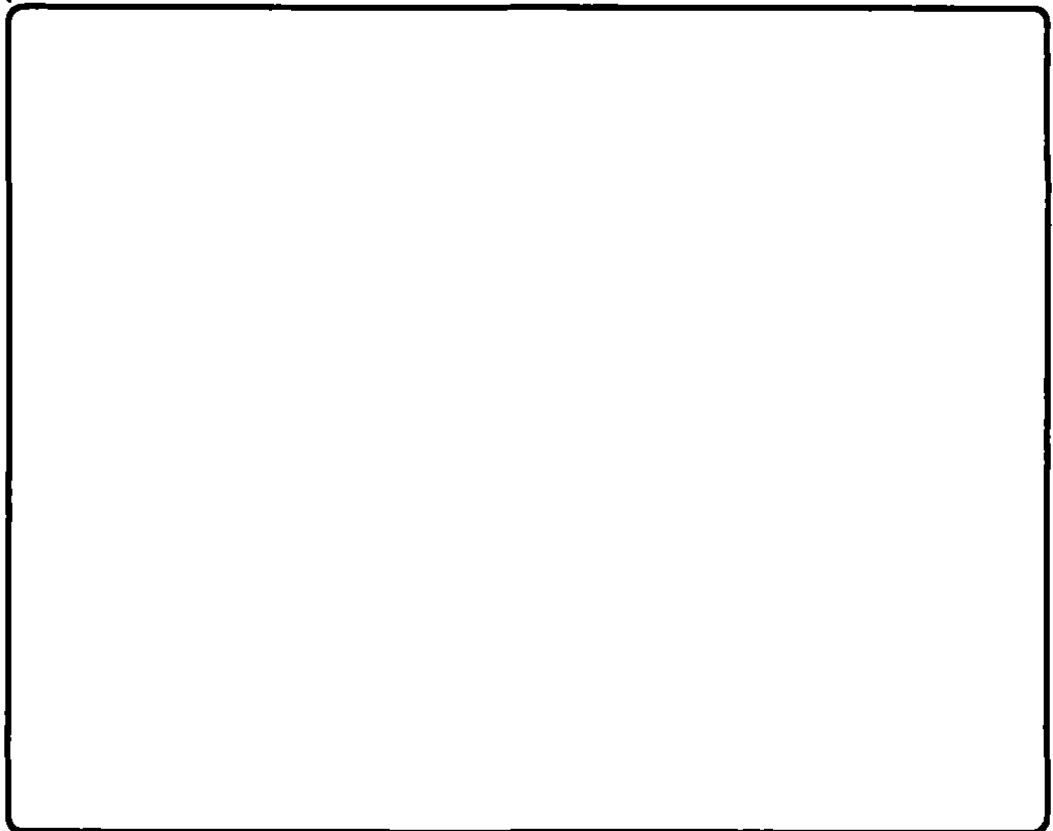
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional y su traducción; publicación con su traducción; y anexo explicativo de las modificaciones.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JOSE ANTONIO LOREDA

FIRMA:

C.C. 17.159.661 Bta. T.P. 10.784



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 02102350 00000000 Folios: 127
Fecha (AMD): 2002-11-12 15:45:19
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Remisionaria: 0000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 63,999
FECHA : OCTUBRE 3 DE 2002

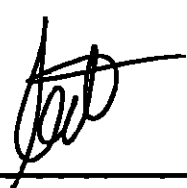
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLORERA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3036804	03/10/2002	7,196,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
	TOTAL :	378,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

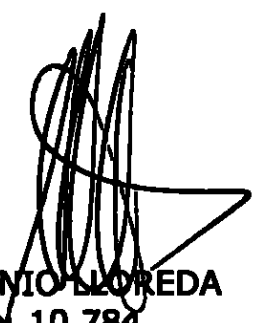
RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **JOSE ANTONIO LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANGELA MARIA RESTREPO y/o ALICIA LLOREDA RICAURTE** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar Individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



JOSE ANTONIO LLOREDA
T.P. No. 10.784
Código 231

4

TRADUCCION OFICIAL NO. 075-2001
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Legalizaciones de un poder otorgado por T Hoffmann-La Roche AG con Certificación
Notarial escritos simultaneamente en ingles y en español

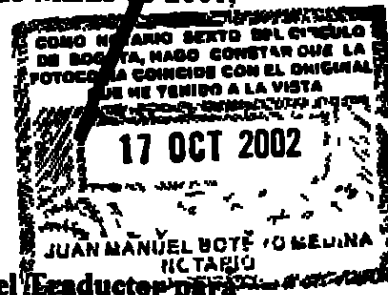
El poder se encuentra firmado por Dr H -F Czekay y Dr W Spoden como
Administrador Asistente y Mandatario, respectivamente, de dicha Compañia

El Certificado notarial se encuentra firmado por Beat Burgin y tiene el siguiente sello

BEAT BURGIN * NOTARIUS BASILIENSIS

No Prot Nota 50/2001

A continuacion Apostilla de la Convención de la Haya de 5 de Octubre de 1961 expedida
en Aleman en relación con la firma del señor Beat Burgin, de fecha 7 de Marzo de 2001,
firmado por Heidi Fischer



Es traduccion fiel y completa, de la cual queda copia en el archivo del Traductor para
su confrontacion, a la cual me remito

Bogotá, D C 17 de Abril de 2001

Angela A. P. ...
ANGELA A. P. ...
Traductor e
Resol No 0177 del 2001 Ministerio de Justicia

TRADUCCION OFICIAL No 8307

de un documento escrito en Alemán, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente -

Traducción de las legalizaciones en alemán que se encuentran a continuación de un documento escrito en inglés, por el cual la firma F Hoffmann-La Roche AG, domiciliada en Basilea, Suiza, otorga poder a los Drs JOSE ANTONIO LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANGELA MARIA RESTREPO y/o ALICIA LLOREDA y/o JOSE LLOREDA CAMACHO, domiciliados en Bogota, Colombia Dado y firmado por los Drs H F Czekay y W Spoden, el 28 de febrero 2001 Sigue autenticación en inglés de dichas firmas por el notario de Basilea, B Bürgin, el 2 de marzo 2001

APOSTILLA

(Convención de La Haya)

1 País Suiza

Este documento público

2 Ha sido firmado por el Lic iur B Bürgin

3 Actuando en calidad de notario público

4 Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5 en Basel (Basilea)

6 el 7 de marzo 2001

7 por la Cancillería de Estado del Cantón de Basilea

8 bajo el No 2 129/ 3 585

9 Sello

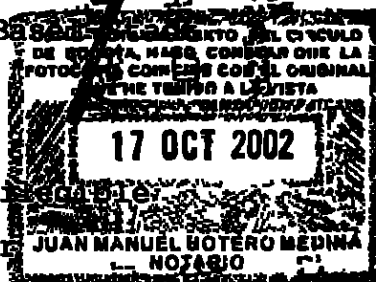
10 Firma

Cancillería de Estado

Fdo firma

de la ciudad de Basel (Basilea)

Heidi Fischer



ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación
Bogotá, 24 de abril 2001

LUZ ARRILAGA DE HERBER
TRADUCCION E INTERPRETE OFICIAL
Luz Arrilaga de Herber
República de Colombia

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
423808
COPIA PARA APASER EN LA
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INICIADAS

REPRESENTACION DEL TEXTO
2002 APT 26
REPRESENTACIONES
SABIA DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEITO DEL CANTON
DE MOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
77 OCT 2002
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

Los abajo firmados.

F.Hoffmann-La Roche AG, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza,

con domicilio en 4070 Basilea, Suiza

The undersigned,

F.Hoffmann-La Roche AG, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland,

of 4070 Basel, Switzerland

nombramos por el presente a JOSE ANTONIO LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANGELA MARIA RESTREPO y/o ALICIA LLOREDA y/o JOSE LLOREDA CAMACHO, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6º, nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores JOSE ANTONIO LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANGELA MARIA RESTREPO y/o ALICIA LLOREDA y/o JOSE LLOREDA CAMACHO, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos y recursos; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores JOSE ANTONIO LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANGELA MARIA RESTREPO y/o ALICIA LLOREDA y/o JOSE LLOREDA CAMACHO, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

February 28, 2001

Dado y firmado

Dr. H.-F. Czokay
Assistant Manager

Dr. W. Spoden
Holder of
Procuration

Given and signed this



SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

[Handwritten signature]



hereby appoint, JOSE ANTONIO LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANGELA MARIA RESTREPO and/or ALICIA LLOREDA and/or JOSE LLOREDA CAMACHO, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors JOSE ANTONIO LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANGELA MARIA RESTREPO and/or ALICIA LLOREDA and/or JOSE LLOREDA CAMACHO, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses, cancellations and administrative injunction proceedings; to draw up specifications; to file amendments, oppositions and appeals, to pay all instalments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal, and to transact, and we hereby declare from now on that the agents by any one of them appointed may do so for benefit.

We also authorize JOSE ANTONIO LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANGELA MARIA RESTREPO and/or ALICIA LLOREDA and/or JOSE LLOREDA CAMACHO, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

Estados Unidos de América
Estado de (ss)
Condado de

A los días del mes de de 20
compareció personalmente ante mí, Notario
Público en y por el condado antes citado,

a quien doy fe de conocer y me consta
que es/son la persona descrita y firmante del
documento que precede, declarando ante mí que
otorga el mismo para los fines y propósitos que en él
se expresan.

Notary Public (Notario Público).

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

Estados Unidos de América
Estado de (ss)
Condado de

A los días del mes de de 20
compareció personalmente ante
mí, Notario Público en y por el condado antes citado,

a quien doy fe de conocer y me consta
que es/son la persona descrita y firmante del
documento que precede, declarando ante mí que
otorga el mismo para los fines y propósitos que en él
se expresan.

Notary Public (Notario Público).

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Suiza
~~Estados Unidos de América~~
Ciudad Basilea (ss)
Condado de

Hoy 2 de Marzo de 2001 comparecieron
Dr. H.-F. Czekay y Dr. W. Spoden a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que

son Asistentes de Gerencia de F.Hoffmann-La
Roche AG la compañía nombrada en
el documento, que antecede, una sociedad
debidamente organizada y existente conforme a las
leyes del Estado de Suiza, domiciliada en la ciudad de
Basilea, Suiza, y legalmente constituida para un período de
duración que aún no ha terminado; que el declarante
está autorizado para dicha Compañía para conferir
este poder; que el sello estampado por él al pie de tal
poder, en nombre y en 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 ha visto los Estatutos de
incorporación firmados en Suiza, Ciudad de .
Estados de Basilea, fecha Jun. 15/89,
y certifica que de conformidad con la legislación de
dicho Estado la suscrita declaración juramentada es
prueba suficiente de que la persona sobre que ella
versa son ciertos y veraces.



Not. Rot. Nr. 50/2001

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

United States of America
State of (ss)
County of

On this day of , 20 , personally
appeared before me, a Notary Public, in and for the
above mentioned county,

to me known to be the person described in and
who executed the foregoing document, and who duly
acknowledged to me that executed same for the
uses and purposes therein expressed.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

United States of America
State of (ss)
County of

On this day of , 20 , personally
appeared before me, a Notary Public, in and for the
above mentioned county,

to me known to be the person described in and who
executed the foregoing document, and who duly
acknowledged to me that executed same for the
uses and purposes therein expressed.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

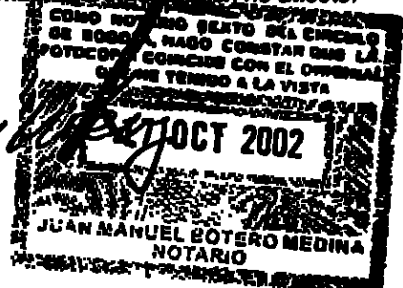
United States of America Switzerland
State of Basle- (ss)
County of City

On this 2nd day of March , 2001 ,
personally Dr. H.-F. Czekay and Dr. W. Spoden
came

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 they are the
Manager and Holder of they are Assistant
Production of F.Hoffmann-La
Roche AG

, the company named
within, a Corporation organized and existing under
the laws of the State of Switzerland, United States
of America, domiciled at the City of Basle, Switzerland
and legally constituted for a
period of tenure not yet expired; that the 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 purposes of the
Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at Switzer-
land, City, State of Basle, under date of
15th day of June 1989, and hereby
certifies that under the laws of said State the
foregoing acknowledgment is sufficient proof that the
facts therein contained are true, which he attests.



APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Schweiz (Suisse)

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Lic. in

B. Bünig

3. in seiner Eigenschaft als Ch. Re.

4. sie ist versehen mit dem Stempel des (des)

Basel-Stadt

Res. d'ist - 7. Mär.

5. in Basel (Bâle)

n. n. n.

7. durch die Staat.kanzlei des Kantons Basel-Stadt

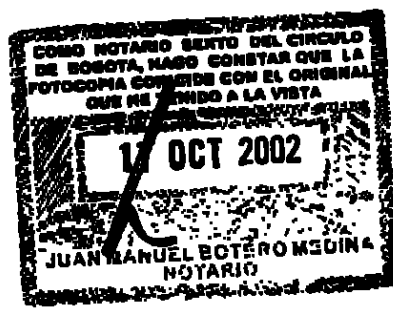
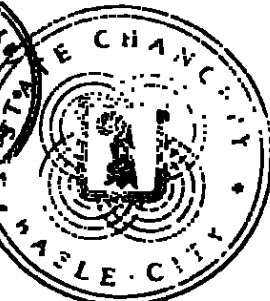
8. unter Nr. 272513

9. Siegel/Stempel:

10. Unterschrift:

Lisch

Heidi Fischer



folios 8-10 Extracto y tarjetas
04-07-2003

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.

PCT/EP 01/05187

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC7 A61K38/18 A61K9/08 A61K47/02 A61K47/18

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC7 A61K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

Datos WPI, PAJ, Datos CHEM ABS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 96 40073 A (ALKERMES) 19 Diciembre 1996 (1996-12-19) reivindicaciones 19-25 página 4, línea 13 - línea 19 página 5, línea 33 - página 6, línea 11 página 6, línea 28 - página 7, línea 15 página 14, línea 7 - línea 14 ejemplo 1 tabla I	1-27, 41, 42, 45, 51, 52, 55, 56

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

9 de Octubre de 2001

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

19/10/2001

Nombre y dirección de correo de ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Scarponi, U

Forma PCT/ISA/310 (segunda) (Julio 1992)

12
9

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 01/05187

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	GB 2 171 304 A (CHUGAI SEIYAKU KK, JP) 28 de Agosto de 1986 (1986-08-28) Reivindicaciones 1, 3-7 ejemplos página 1, línea 8 - línea 18 página 2, línea 19 - línea 39	1-5, 8-19, 22-27, 41, 42, 45, 51, 52, 53, 56
X	EP 0 909 564 A (CHUGAI SEIYAKU KK, JP) 21 de Abril de 1999 (1999-04-21) Reivindicaciones página 3, línea 5 - línea 50	1-5, 8-19, 22, 24, 26, 27, 41, 45, 51, 52, 53, 56
X	US 4 992 419 A (H. WOOG ET AL.) 12 de Febrero de 1991 (1991-02-12) Reivindicaciones ejemplo 5 tabla 2	1-5, 8-18, 21, 22, 24, 26, 27, 41, 45, 51, 52, 55, 56
X	EP 0 178 665 A (CHUGAI SEIYAKU KK, JP) 23 de Abril de 1986 (1986-04-23) reivindicaciones página 2, línea 18 - línea 35 tablas	1-5, 8-19, 21, 26, 27, 41, 45, 51, 52, 55, 56

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 01/05187

Documentos de Patente citados en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de Patentes	Fecha de Publicación
WO 9640073 A	19-12-1996	US 5716644 A	10-02-1998
		AU 705451 B2	20-05-1999
		AU 5972496 A	30-12-1996
		AU 705968 B2	03-06-1999
		AU 6034196 A	30-12-1996
		CA 2223583 A1	19-12-1996
		CA 2223834 A1	19-12-1996
		CZ 9703908 A3	13-05-1998
		EP 0871433 A2	21-10-1998
		EP 0831786 A2	01-04-1998
		JP 11506764 T	15-06-1999
		NZ 309533 A	30-08-1999
		PL 323736 A1	14-04-1998
		WO 9640073 A2	19-12-1996
		WO 9640074 A2	19-12-1996
GB 2171304 A	28-08-1986	FR 2576792 A1	08-08-1986
		JP 2116554 C	06-12-1996
		JP 6072103 B	14-09-1994
		JP 62000032 A	06-01-1987
		US 4732889 A	22-03-1988
EP 909564 A	21-04-1999	AU 722300 B2	27-07-2000
		AU 2407497 A	19-11-1997
		EP 0909564 A1	21-04-1999
		US 6120761 A	19-09-2000
		US 6063734 A	16-05-2000
		WO 9740850 A1	06-11-1997
		JP 3068033 B2	24-07-2000
		JP 10182481 A	07-07-1998
		JP 2000302689 A	31-10-2000
		US 6277367 B1	21-08-2001
US 4992419 A	12-02-1991	DE 3729863 A1	16-03-1989
		AT 77556 T	15-07-1992
		AU 2173988 A	27-04-1989
		CA 1330301 A1	21-06-1994
		CN 1031801 A, B	22-03-1989
		CS 8805901 A2	13-12-1990
		DD 273004 A5	01-11-1989
		DE 3872334 D1	30-07-1992
		DK 483188 A	06-03-1989
		EP 0306824 A2	15-03-1989
		ES 2051806 T3	01-07-1994
		FI 884051 A, B	06-03-1989
		GR 3005454 T3	24-05-1993
		HK 89495 A	16-06-1995
		HU 47863 A2	28-04-1989
		IE 60310 B	29-06-1994
		IL 87628 A	08-07-1993
		JP 1071818 A	16-03-1989
		JP 2057196 C	23-05-1996
		JP 7080782 B	30-08-1995
		KR 9609929 B1	25-07-1996
		LV 10178 A, B	20-10-1994
		LV 10393 A, B	20-02-1995
		MX 12880 A	01-12-1993
		NO 178687 B	05-02-1996

Forma PCT/ISA/210 (anexo familia de patentes) (Julio 1992)

14

11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/EP 01/05187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/18 A61K9/08 A61K47/02 A61K47/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 40073 A (ALKERMES) 19 December 1996 (1996-12-19) claims 19-25 page 4, line 13 - line 19 page 5, line 33 - page 6, line 11 page 6, line 28 - page 7, line 15 page 14, line 7 - line 14 example 1 table I -- -/--	1-27, 41, 42, 45, 51, 52, 55, 56
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 October 2001		Date of mailing of the international search report 19/10/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Scarponi, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/EP 01/05187

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	6B 2 171 304 A (CHUGAI SEIYAKU KK,JP) 28 August 1986 (1986-08-28) claims 1,3-7 examples page 1, line 8 - line 18 page 2, line 19 - line 39	1-5, 8-19, 22-27, 41,42, 45,51, 52,55,56
X	EP 0 909 564 A (CHUGAI SEIYAKU KK,JP) 21 April 1999 (1999-04-21) claims page 3, line 5 - line 50	1-5, 8-19,22, 24,26, 27,41, 45,51, 52,55,56
X	US 4 992 419 A (H.WOOG ET AL.) 12 February 1991 (1991-02-12) claims example 5 table 2	1-5, 8-18,21, 22,24, 26,27, 41,45, 51,52, 55,56
X	EP 0 178 665 A (CHUGAI SEIYAKU KK,JP) 23 April 1986 (1986-04-23) claims page 2, line 18 - line 35 tables	1-5, 8-19,21, 26,27, 41,45, 51,52, 55,56

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PC17EP 01/05187

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9640073	A	19-12-1996	US 5716644 A	10-02-1998
			AU 705451 B2	20-05-1999
			AU 5972496 A	30-12-1996
			AU 705968 B2	03-06-1999
			AU 6034196 A	30-12-1996
			CA 2223583 A1	19-12-1996
			CA 2223834 A1	19-12-1996
			CZ 9703908 A3	13-05-1998
			EP 0871433 A2	21-10-1998
			EP 0831786 A2	01-04-1998
			JP 11506764 T	15-06-1999
			NZ 309533 A	30-08-1999
			PL 323736 A1	14-04-1998
			WO 9640073 A2	19-12-1996
			WO 9640074 A2	19-12-1996
GB 2171304	A	28-08-1986	FR 2576792 A1	08-08-1986
			JP 2116554 C	06-12-1996
			JP 6072103 B	14-09-1994
			JP 62000032 A	06-01-1987
			US 4732889 A	22-03-1988
EP 909564	A	21-04-1999	AU 722300 B2	27-07-2000
			AU 2407497 A	19-11-1997
			EP 0909564 A1	21-04-1999
			US 6120761 A	19-09-2000
			US 6063734 A	16-05-2000
			WO 9740850 A1	06-11-1997
			JP 3068033 B2	24-07-2000
			JP 10182481 A	07-07-1998
			JP 2000302689 A	31-10-2000
			US 6277367 B1	21-08-2001
US 4992419	A	12-02-1991	DE 3729863 A1	16-03-1989
			AT 77556 T	15-07-1992
			AU 2173988 A	27-04-1989
			CA 1330301 A1	21-06-1994
			CN 1031801 A ,B	22-03-1989
			CS 8805901 A2	13-12-1990
			DD 273004 A5	01-11-1989
			DE 3872334 D1	30-07-1992
			DK 483188 A	06-03-1989
			EP 0306824 A2	15-03-1989
			ES 2051806 T3	01-07-1994
			FI 884051 A ,B,	06-03-1989
			GR 3005454 T3	24-05-1993
			HK 89495 A	16-06-1995
			HU 47863 A2	28-04-1989
			IE 60310 B	29-06-1994
			IL 87628 A	08-07-1993
			JP 1071818 A	16-03-1989
			JP 2057196 C	23-05-1996
			JP 7080782 B	30-08-1995
			KR 9609929 B1	25-07-1996
			LV 10178 A ,B	20-10-1994
			LV 10393 A ,B	20-02-1995
			MX 12880 A	01-12-1993
			NO 178687 B	05-02-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 01/05187

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4992419 A		NZ 225975 A	26-07-1991
		PH 25618 A	08-08-1991
		PL 274485 A1	17-04-1989
		PT 88417 A , B	31-07-1989
		RU 2043118 C1	10-09-1995
		RU 2100032 C1	27-12-1997
		ZA 8806528 A	30-05-1989
EP 178665 A	23-04-1986	JP 61097229 A	15-05-1986
		CA 1258629 A1	22-08-1989
		EP 0178665 A2	23-04-1986
		US 4806524 A	21-02-1989

19
16

**(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE
PATENTES (PCT)**

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Bureau International



(43) Fecha de Publicación
22 de Noviembre de 2001 (22.11.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/87329 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 38/18,
9/08, 47/02, 47/18

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP01/05187

(22) Fecha de Registro Internacional: 8 Mayo 2001 (08.05.2001)

(81) Estados Designados (nacionales): AE, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CO, CU, CZ, DE, DK,
EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA,
UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
00110355.5 15 Mayo 2000 (15.05.2000) EP

(84) Estados Designados (regionales): Patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Patente de
Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente
Europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar
las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de
recibo de modificaciones

(71) Solicitante: F.HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH];
Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basle (SUIZA).

(72) Inventor: PAPADIMITRIOU, Apollon; Bachstrasse 38a,
83673 Bichl (DE).

*Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a
"Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen
al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.*

(74) Agente: WITTE, Hubert; Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basle (Suiza)

(54) Título:

"COMPOSICION FARMACEUTICA LIQUIDA "

(57) Resumen:

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que contiene una proteína eritropoyetina, una anión orgánico multicarga en un tampón farmacéuticamente aceptable para mantener el pH de la solución en un intervalo comprendido entre 5,5 y 7,0 y eventualmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables. Esta composición es especialmente indicada para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades relacionados con la eritropoyesis.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 November 2001 (22.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/87329 A1

(51) International Patent Classification: A61K 38/18.
9/08, 47/02, 47/18

(21) International Application Number: PCT/EP01/05187

(22) International Filing Date: 8 May 2001 (08.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00110355.5 15 May 2000 (15.05.2000) EP

(71) Applicant: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]:
Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basle (CH).

(72) Inventor: PAPADIMITRIOU, Apollon; Bachstrasse 38a,
83673 Bichl (DE).

(74) Agent: WITTE, Hubert; Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basle (CH).

(81) Designated States (*national*): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CO, CU, CZ, DE, DK, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NEW PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(57) Abstract: The present invention relates to a liquid pharmaceutical composition comprising an erythropoietin protein, a multiple charged inorganic anion in a pharmaceutically acceptable buffer suitable to keep the solution pH in the range from about 5.5 to about 7.0, and optionally one or more pharmaceutically acceptable excipients. This composition is especially useful for the prophylaxis and treatment of diseases related to erythropoiesis.

WO 01/87329 A1

21
18

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente Caso 20619	PARA FUTURAS ACCIONES	Ver Notificación o Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA/416)
Solicitud Internacional No. PCT/EP01/05187	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 08/05/2001	Fecha de prioridad (día/mes/año) 15/05/2000
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC A61K 38/18		
Solicitante F.HOFFMANN-LA ROCHE AG		

1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>2</u> páginas, incluyendo la carátula. ☐ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total de <u> </u> páginas.	
3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: I ☒ Bases del Reporte II ☐ Prioridad III ☐ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial IV ☐ Falta de unidad de invención V ☒ Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional	
Fecha de presentación de la demanda 16/11/2001	Fecha de terminación de este reporte 11/04/2002
Nombre y dirección de correo de IPEA European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 eprmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Funcionario autorizado FLETCHER A S Tel. (+49-89) 2399 2828

I. Base del Reporte

La base de este examen preliminar internacional es la solicitud como fue originalmente presentada.

V. Declaración razonada según la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial

A la luz de los documentos citados en el reporte de búsqueda internacional, se considera que la invención como está definida en por lo menos algunas de las reivindicaciones, no parece cumplir el criterio mencionado en el Artículo 33(1) PCT, esto es, no parece ser novedoso y/o envolver nivel inventivo (ver reporte de búsqueda internacional, en particular los documentos citados X y/o Y y las referencias correspondientes a las reivindicaciones).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference Case 20619	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP 01/ 05187	International filing date (day/month/year) 08/05/2001	Priority date (day/month/year) 15/05/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K38/18		
Applicant F. HOFFMANN-LA ROCHE AG		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 2 sheets, including this cover sheet.
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consists of a total of _____ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:
 - ☒ Basis of the report
 - ☐ Priority
 - ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - ☐ Lack of unity of invention
 - ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - ☐ Certain documents cited
 - ☐ Certain defects in the international application
 - ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16/11/2001	Date of completion of this report 11/04/2002
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer FLETCHER A S Tel. (+49-89) 2399 2828



Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (July 1998)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No PCT/EP 01/05187

I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Artículo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capítulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

COMPOSICION FARMACEUTICA LIQUIDA

RESUMEN - OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que contiene una proteína eritropoyetina, un anión orgánico multicarga en un tampón farmacéuticamente aceptable para mantener el pH de la solución en un intervalo comprendido entre 5,5 y 7,0 y eventualmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables. Esta composición es especialmente indicada para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades relacionados con la eritropoyesis.

COMPOSICION FARMACEUTICA LIQUIDA

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que contiene una proteína eritropoyetina, un anión orgánico multicarga en un tampón farmacéuticamente aceptable para mantener el pH de la solución en un intervalo comprendido entre 5,5 y 7,0 y eventualmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables. Esta composición es especialmente indicada para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades relacionados con la eritropoyesis.

La eritropoyesis es la producción de glóbulos rojos que tiene lugar para compensar la destrucción celular. La eritropoyesis es un mecanismo fisiológico controlado que aporta un número suficiente de glóbulos rojos capaces de oxigenar debidamente los tejidos. La eritropoyetina natural humana (hEPO) se produce en los riñones y es el factor de plasma humoral que estimula la producción de glóbulos rojos (Carnot, P. y Deflandre, C. (1906), C.R. Acad. Sci. 143:432; Erslev, A.J. (1953), Blood 8:349; Reissmann, K.R. (1950) Blood 5:372; Jacobson, LO, Goldwasser, E., Freid, W. y Plzak, L.F. (1957) Nature 179:6331-4). La EPO de origen natural estimula la división y la diferenciación de precursores de eritroides en el tuétano y despliega su actividad biológica ligando los receptores a los precursores de eritroide (Krantz, B.S. (1991) Blood 77:419).

La eritropoyetina se obtiene por biosíntesis empleando la tecnología de DNA recombinante (Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. y col. (1986) Immunobiol.

72:213-224) y es el producto de los genes de EPO humana clonada, insertados y expresados en tejidos celulares de ovario de hámster chino (células CHO). La estructura primaria de la forma predominante, totalmente procesada, de la hEPO se ilustra en la SEQ ID NO:1. Hay dos puentes sulfuro entre Cys⁷-Cys¹⁶¹ y Cys²⁹-Cys³³. El peso molecular de la cadena de polipéptido de la EPO sin las porciones azúcar es de 18.236 Da. En la molécula intacta de EPO, aproximadamente el 40 % del peso molecular se debe a los grupos hidrato de carbono que glicosilan la proteína en sus sitios de glicosilación (Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A. y Fukuda, M. (1987), J. Biol. Chem. 262:12059).

La eritropoyetina humana es esencial en la formación de glóbulos rojos, por ello esta hormona es útil para el tratamiento de trastornos sanguíneos caracterizados por una producción baja o insuficiente de glóbulos rojos. Clínicamente se utiliza la EPO para tratar la anemia en pacientes con deficiencia renal crónica (CRF) (Eschbach, J.W., Egri, J.C., Downing, M.R. y col. (1987), NEJM 316:73-78; Eschbach, J.W., Abdulhadi, M.H., Browne, J.K. y col. (1989), Ann. Intern. Med. 111:992; Egrie, J.C., Eschbach, J.W., McGuire, T., Adamson, J.W. (1988), Kidney Intl. 33:262; Lim, V.S., Degowin, R.L., Zavala, D. y col. (1989), Ann. Intern. Med. 110:108-114) y en paciente de sida y cáncer que se someten a quimioterapia (Danna, R.P., Rudnick, S.A., Abels, R.I. en: M. B. Garnick, coordinador, Erythropoietin in Clinical Ap-

plications - An International Perspective, Nueva York, NY: Marcel Dekker, 1990, pp. 301-324).

Las composiciones farmacéuticas conocidas tienen por lo menos uno de los inconvenientes siguientes:

5 - son liofilizados. Aparte del complicado procedimiento de fabricación, los liofilizados tienen el inconveniente de que tienen que reconstituirse antes de inyectarse a los pacientes. Esto obliga a una manipulación adicional a cargo del personal médico, que resulta molesto y conlleva el riesgo de que se manipule incorrectamente el producto farmacéutico;

10

 - llevan como aditivo albúmina de suero humano. La albúmina de suero humano es un producto derivado de un líquido corporal humano, con consiguiente existe el riesgo de una infección vírica debida a los contaminantes de la preparación de albúmina. Son posibles además reacciones alérgicas;

15

 - todas las composiciones de eritropoyetina comerciales, actualmente disponibles, son inestables a temperaturas elevadas, es decir, a una temperatura superior a la del frigorífico, que se sitúa normalmente entre 2 y 8°C. Por esta razón tienen que guardarse en un frigorífico (2-8°C) y no pueden almacenarse a temperatura ambiente (en torno a 20°C). Esto implica un incremento de los costes, debido al almacenaje y transporte a baja temperatura y además complica el manejo del producto farmacéutico. En este contexto "inestable" significa que el almacenaje a temperaturas elevadas, p.ej. 25°C duran-

20

25

te un período de tiempo prolongado (p.ej. varios meses o más de 6 meses) conduce a la degradación de la proteína. Degradación en este contexto significa cambios físicos (p.ej. agregación o desnaturalización) o cambios químicos (p.ej. oxidación o modificación de los enlaces químicos en general) de la molécula de proteína que es sabido tienen lugar con preferencia a temperaturas elevadas (superiores a 8°C). La incubación de una proteína cerca o por encima de su temperatura de transición (también llamada temperatura de fusión) conduce a un desplegamiento ("unfolding") de la proteína, es decir, se pierden la estructura nativa y la actividad biológica del polipéptido. La temperatura de transición guarda una estrecha relación con la estabilidad térmica de la proteína y depende del entorno de la proteína (p.ej. el pH, las sales, la fuerza iónica, la sustancia tampón, etc.). Por ejemplo, la desnaturalización puede conducir a la agregación de las moléculas de eritropoyetina, es decir, a la formación de dímeros (covalentes o no covalentes), a agregados de orden superior o incluso a macropartículas. Esto se traduce en una reducción de la potencia del fármaco y puede inducir a efectos secundarios molestos después de la inyección a pacientes humanos.

El objetivo perseguido por la presente invención es, pues, el proporcionar una composición que sea capaz de minimizar o evitar los inconvenientes recién mencionados.

Este objetivo se alcanza según la presente inven-

ción presentando una composición farmacéutica que tenga una proteína eritropoyetina, un anión inorgánico tipo multicarga en una solución tampón de pH entre 5,5 y 7,0 y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

Ahora se ha encontrado de forma sorprendente que formulando una eritropoyetina en esta composición mejora su estabilidad a temperaturas superiores a la temperatura del frigorífico (2-8°C), en especial a temperatura ambiente (es decir, por debajo de 25°C) e incluso a temperaturas elevadas, p.ej. a 40°C. Esto significa que la composición puede almacenarse sin enfriar durante un tiempo prolongado sin perder una parte importante de su actividad y sin degradarse de forma significativa.

A menos que se indique lo contrario, las definiciones siguientes ilustran y explican el significado y alcance de varios términos empleados en la descripción.

El término "anión inorgánico del tipo multicarga" significa un anión inorgánico que tiene dos o más cargas negativas en cada molécula, por ejemplo el anión sulfato SO_4^{2-} o el fosfato, p.ej. el hidrogenofosfato HPO_4^{2-} . El anión inorgánico de carga múltiple puede añadirse en forma de la sal correspondiente, p.ej. la sal sódica, la sal potásica y las mezclas de las mismas, y/o en forma de una sustancia tampón, p.ej. tampón fosfato.

El término "isoosmótico o isotónico" significa una solución que puede mezclarse con líquidos corporales sin que afecte a sus constituyentes. Las soluciones que son

isotónicas con la sangre, por ejemplo el cloruro sódico del 0,9 %, tienen la misma presión osmótica que el suero y no afectan a las membranas de los glóbulos rojos. En general, las soluciones que son isotónicas con la sangre

5 tienen una concentración en torno a 290 mosm/kg de H₂O.

El término "ácido inorgánico fuerte" significa un ácido inorgánico que en una solución 1 N presenta una disociación comprendida entre el 20 y el 100 %, por ejemplo el H₂SO₄.

10 El término "farmacéuticamente aceptable" significa que el tampón o las sales son aceptables desde el punto de vista toxicológico.

El término "diluyente" significa un ingrediente de una preparación medicinal que no posee actividad farmacológica pero que es necesario o deseable desde el punto

15 de vista farmacéutico. Un diluyente puede ser por ejemplo un líquido para disolver el (los) fármaco(s) a inyectar, p.ej. el agua.

El término "disolventes" significa un líquido que

20 mantiene otra sustancia en solución, es decir, la disuelve, p.ej. el agua.

El término "conservantes" significa una sustancia que se añade a una composición farmacéutica para prevenir el crecimiento bacteriano, p.ej. el cloruro de benzalconio o el alcohol bencílico.

25

El término "poliol" se refiere a cualquier sustancia que posea varios grupos hidroxilo, incluyendo a los alcoholes polihídricos y a los hidratos de carbono. Los

hidratos de carbono son moléculas cíclicas que tiene un grupo ceto o aldehído, p.ej. la sucrosa y la trehalosa.

El término "eritropoyetina" o proteína eritropoyetina" significa una proteína que posee la actividad biológica "in vivo" de incrementar la producción de reticulocitos y glóbulos rojos en el tuétano y que se elige entre el grupo de la eritropoyetina humana y los análogos de la misma que se definen posteriormente.

El término "eritropoyetina pegilada (Peg-EPO o PEG-EPO)" se refiere a la proteína eritropoyetina unida mediante enlaces covalentes a uno, dos o tres derivados de polietilenglicol que se describen posteriormente.

El término "dispositivo" significa un artefacto para un propósito específico. En la presente invención, el propósito perseguido es permitir, apoyar o facilitar la administración de la composición farmacéutica líquida.

Descripción de las figuras:

Figura 1: Estructura primaria de la EPO humana (165 aminoácidos) (SEQ ID NO:1).

20 Figura 2: Estructura primaria de la EPO humana (166 aminoácidos) (SEQ ID NO:2).

Figura 3: Estabilidad térmica en función del pH. Presenta la temperatura de transición frente al pH.

Figura 4: Influencia de la fuerza iónica en la estabilidad térmica. Se representa la temperatura de transición frente a la concentración de fosfato.

Figura 5: Dependencia de la estabilidad térmica de la sustancia tampón.

La figura 6 muestra que el sulfato es también un tampón/aditivo idóneo en un pH bajo (p.ej. pH 6,2), mientras que el fosfato es menos indicado a pH 6,2 que a pH 7,5. Esto demuestra que el sulfato da una gran estabilidad térmica, incluso a pH bajo.

Figura 7: Agregación de la peg-EPO en función del pH. Se analizan con SDS-PAGE las muestras de peg-EPO que se han sometido al calor (tal como se describe antes). Las proteínas se tiñen con plata. Calle 1: peso molecular estándar. Calle 2: pH 5. Calle 3: pH 5, reducido. Calle 4: pH 6. Calle 5: pH 6, reducido. Calle 6: pH 6,5. Calle 7: pH 6,5, reducido. Calle 8: pH 7. Calle 9: pH 7, reducido. Calle 10: peg-EPO no sometido al calor.

La figura 8 muestra que el uso de 1 mg/ml de acetilcisteína como antioxidante evita la formación de agregados por acción del calor. Agregación de pegEPO sometida al calor (20 min. a 80°C): calle 1: pegEPO a pH 7,5 no sometida al calor; calle 2: pegEPO a 7,5 sometida al calor; calle 3: pegEPO a pH 6,2, sometida al calor; calle 4: pegEPO a pH 6,2, sometida al calor, reducida; calle 5: pegEPO a pH 7,5 + 1 mg/ml de N-acetil-cisteína, sometida al calor; calle 6: pegEPO a pH 7,5 + 1 mg/ml de N-acetilcisteína, sometida al calor, reducida.

Figura 9: Contenido de ácido siálico (NANA) en muestras de peg-EPO de nuevas formulaciones, almacenado durante seis meses a diversas temperaturas.

Figura 10: Ensayo de bioactividad en ratón de muestras de peg-EPO después de almacenarse en fosfato sódico

10 mM, sulfato sódico 40 mM, manita del 3 % (p/v), pH 6,2, durante 6 meses a diversas temperaturas.

Figura 11: Superposición de cromatogramas de exclusión de tamaño de muestras de peg-EPO almacenadas durante 6 meses en fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manita del 3 % (p/v), pH 6,2 (de abajo hacia arriba: tampón, material de partida, 4°C, 25°C, 30°C y 40°C).

Con mayor detalle, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que contiene una proteína eritropoyetina, un anión inorgánico de varias cargas en un tampón farmacéuticamente aceptable, idóneo para mantener el pH de la solución en el margen comprendido entre 5,5 y 7,0 y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una forma preferida de ejecución, la composición es una solución líquida, p.ej. una solución acuosa. En una forma preferida de ejecución de la invención, las composiciones farmacéuticas anteriores son soluciones isotónicas.

El anión se selecciona con preferencia entre los aniones de ácidos inorgánicos fuertes, por ejemplo el H_2SO_4 , H_3PO_4 o el ácido cítrico. Por consiguiente, los aniones preferidos se seleccionan entre el grupo formado por sulfato, fosfato y citrato, con preferencia sulfato o fosfato y con mayor preferencia sulfato. La concentración del anión inorgánico de varias cargas puede variar entre 10 y 200 mmoles/l, p.ej. entre 10 y 200 mmoles/l en el caso del anión sulfato.

Los tampones a utilizar en la presente invención para mantener el pH en el intervalo comprendido entre 5,5 y 7,0, con preferencia en el intervalo de 5,8 a 6,7, con mayor preferencia todavía en el intervalo de 6,0 a 6,5 y con preferencia especial en un pH en torno a 6,2, pueden ser tampones convencionales de ácidos orgánicos o inorgánicos (p.ej. tampón fosfato, tampón arginina/H₂SO₄/Na₂SO₄ o cualquier otro sistema tampón farmacéuticamente aceptable). En una forma preferida de ejecución, la composición contiene un tampón fosfato o arginina/H₂SO₄/Na₂SO₄, con mayor preferencia de 10 a 50 mmoles/l de tampón fosfato. Obviamente, las combinaciones de estos sistemas tampón forman también parte de la presente invención. El pH puede ajustarse con una base apropiada, p.ej. NaOH en el sistema tampón fosfato y un ácido adecuado, p.ej. ácido sulfúrico en el sistema tampón arginina, respectivamente.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse entre sales, diluyentes y/o disolventes y/o conservantes farmacéuticamente aceptables, etc. p.ej. agentes tonificadores (agentes isotónicos), polioles, antioxidantes y detergentes no iónicos. Son ejemplos de estas sustancias el cloruro sódico, el cloruro cálcico, la sorbita, la manita, la glicerina, la sacarosa, la trehalosa, la acetilcisteína, el polisorbato 20, el polisorbato 80 o el Pluronic F68.

En una forma preferida de ejecución de la presente invención, las composiciones farmacéuticas contienen un poliol seleccionado entre el grupo de la manita, sorbita, glicerina, trehalosa y sacarosa, con preferencia la manita. La concentración del poliol puede variar entre el 1 y el 10 % (p/v).

Son ejemplos de antioxidantes la cisteína, la metionina, la acetilcisteína y el ácido ascórbico, con preferencia la metionina. Los antioxidantes se añaden normalmente en una concentración comprendida entre el 0,01 y el 0,5 % (p/v) o, p.ej. en el caso de la metionina, en una concentración de 1 a 20 mM.

Además, las composiciones antes descritas pueden contener opcionalmente un agente isotonificador en una cantidad del 0,01 al 0,9 % en peso. Estos compuestos son conocidos por el técnico en la materia; son ejemplos de tales agentes el cloruro sódico y el sulfato sódico. En una forma preferida de ejecución, la composición puede contener además un detergente no iónico, por ejemplo un polisorbato 20, polisorbato 80 o Pluronic F 68, con preferencia el Pluronic F 68, p.ej. en una cantidad de hasta el 1 % (p/v), con mayor preferencia de hasta el 0,1 % (p/v), p.ej. del 0,001 al 0,01 % (p/v).

La composición anterior puede contener además sales adicionales, p.ej. hasta 1 mmol/l de CaCl_2 .

La presente invención es especialmente útil para la preparación de composiciones farmacéuticas que, como ingrediente activo farmacéutico, contienen eritropoyetina.

El término "eritropoyetina" o "proteína eritropoyetina" o "EPO" indica lo siguiente: estos términos se refieren en concreto a una glicoproteína, a saber la eritropoyetina humana que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la (SEQ ID NO:1) o (SEQ ID NO:2) o una secuencia de aminoácidos fundamentalmente homóloga de las anteriores, cuyas propiedades biológicas estimulan la producción de glóbulos rojos y la división y diferenciación de los precursores de eritroide en la médula ósea.

5 Tal como se utilizan en el presente escrito, estos términos abarcan también a las proteínas modificadas de forma deliberada, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida a un sitio, o de forma accidental por mutaciones. Esto términos abarcan también a los análogos que tienen de 1 a 6 sitios adicionales para la glicosilación, a los análogos que tienen por lo menos un aminoácido adicional en el extremo terminal carboxi de la glicoproteína, en la que el aminoácido adicional incluye por lo menos un sitio de glicosilación, y a los análogos que tienen una

15 secuencia de aminoácido que incluye un reordenamiento de por lo menos un sitio para la glicosilación. Estos términos incluyen tanto la eritropoyetina natural humana como la obtenida por recombinación.

20

Tal como se describe seguidamente con detalle, la obtención y purificación de la EPO son bien conocidas en la técnica. Se entiende por eritropoyetina la proteína natural o recombinante, preferentemente humana, obtenida a partir de una fuente convencional, por ejemplo teji-

25

dos, síntesis proteica, cultivo celular de células naturales o recombinantes. Abarca también a las proteínas que tienen la actividad de la eritropoyetina, por ejemplo las muteínas y las proteínas modificadas de otro modo. La EPO recombinante puede sintetizarse por expresión en líneas celulares CHO, BHK o HeLa, por tecnología de DNA recombinante o por activación genética endógena. La expresión de proteínas, incluida la resultante de activación genética endógena, es bien conocida en la técnica y se ha publicado por ejemplo en las patentes US n° 5,733,761, 5,641,670 y 5,733,746 y en la publicación de patente internacional n° WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 y WO 91/09955, cuyos contenidos se incorporan a la presente en calidad de referencias. Las especies preferidas de EPO para la obtención de productos de glicoproteína eritropoyetina son las especies de EPO humana. Con mayor preferencia, la especie EPO es la EPO humana que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:1 y en la SEQ ID NO:2, con mayor preferencia la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO:1.

La eritropoyetina puede ser además un análogo de glicoproteína que tenga de 1 a 6 sitios adicionales para glicosilar. La glicosilación de una proteína con uno o varios grupos oligosacáridos tiene lugar en puntos o ubicaciones específicas a lo largo de la cadena de polipéptido y afecta en gran manera a las propiedades físicas de la proteína, por ejemplo la estabilidad, la se-

creción, la localización subcelular y la actividad biológica. La glicosilación es normalmente de dos tipos. Los oligosacáridos con enlaces O están unidos a restos serina o treonina y los oligosacáridos con enlaces N están unidos a restos asparagina. Un tipo de oligosacárido que se halla tanto entre los oligosacáridos de enlaces N y los de enlaces O es el ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), que es un grupo de aminoazúcares que contienen 9 átomos de carbono o más. El ácido siálico es normalmente el resto terminal tanto de oligosacáridos de enlaces N como de enlaces O y, debido a que lleva una carga negativa, confiere propiedades ácidas a la glicoproteína. La eritropoyetina humana que tiene 165 aminoácidos consta de tres cadenas de oligosacárido con enlaces N y una cadena con enlace O, cadenas que forman aproximadamente el 40 % del peso molecular total de la glicoproteína. La glicosilación con enlace N tiene lugar en restos asparagina situados en las posiciones 24, 38 y 83 y la glicosilación con enlace O tiene lugar en un resto serina situado en la posición 126. Las cadenas de oligosacárido se modifican con restos ácido siálico terminales. La eliminación enzimática de todos los restos ácido siálico que tiene la eritropoyetina glicosilada se traduce en una pérdida de actividad "in vivo" pero no "in vitro", porque la sialización de la eritropoyetina impide su fijación y posterior eliminación por acción de la proteína de fijación hepática.

El término "eritropoyetina" de la presente composi-

ción farmacéutica incluye a los análogos de eritropoyetina humana que presentan uno o varios cambios en la secuencia de aminoácidos propia de la eritropoyetina humana, resultando de ello un aumento del número de sitio
5 para el anclaje del ácido siálico. Estos análogos de glicoproteína pueden generarse por mutagénesis dirigida a un sitio que comporte adiciones, eliminaciones o sustituciones de restos aminoácido que aumenten o alteren los sitios disponibles para la glicosilación. Los análogos
10 gos de glicoproteína que poseen niveles de ácido siálico superiores a los que se encuentran en la eritropoyetina humana se generan añadiendo sitios de glicosilación que no perturban la conformación secundaria o terciaria exigida para la actividad biológica. Las glicoproteínas de
15 la presente invención incluyen además a los análogos de mayores niveles de uniones de carbohidratos en el sitio de glicosilación, lo cual normalmente supone la sustitución de uno o varios aminoácidos muy próximos a un sitio con enlace N o con enlace O. Las glicoproteínas de la
20 presente invención abarcan además a los análogos que tienen uno o varios aminoácidos que salen del extremo carboxi de la eritropoyetina y que proporcionan por lo menos un sitio carbohidrato adicional. Las proteínas de eritropoyetina de la presente invención incluyen además
25 a los análogos que tienen una secuencia de aminoácidos en la que ha tenido lugar un reordenamiento de por lo menos un sitio de glicosilación. Tal reordenamiento de sitios de glicosilación incluye la supresión de uno o

varios sitios de glicosilación de la eritropoyetina humana y la adición de uno o varios sitios de glicosilación de origen no natural. El aumento del número de cadenas carbohidrato en la eritropoyetina y, por tanto, del número de ácidos siálicos por molécula de eritropoyetina puede conferir propiedades ventajosas, por ejemplo una mayor solubilidad, mayor resistencia a la proteólisis, menos inmunogenicidad, mayor vida media del suero y mayor actividad biológica. Los análogos de eritropoyetina con sitios adicionales de glicosilación se describen con mayor detalle en la solicitud de patente europea 640619, presentada por Elliot, publicada el 1 de marzo de 1995.

En una forma preferida de ejecución, la composición farmacéutica de la presente invención contiene proteínas eritropoyetina con una secuencia de aminoácidos que incluye por lo menos un sitio adicional para la glicosilación, por ejemplo y sin limitarlas a él las eritropoyetinas que contienen la secuencia de la eritropoyetina humana modificadas con una de las modificaciones elegidas del grupo siguiente:

Asn³⁰Thr³²;
Asn⁵¹Thr⁵³;
Asn⁵⁷Thr⁵⁹;
25 Asn⁶⁹;
Asn⁶⁹Thr⁷¹;
Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;
Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
 5 Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 Asn¹³⁶Thr¹³⁸;
 10 Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
 Thr¹²⁵; y
 Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

La notación utilizada en este escrito para la modificación de la secuencia de aminoácidos significa que la
 15 posición de la proteína no modificada correspondiente (p.ej. hEPO de la SEQ ID NO:1 o de la SEQ ID NO:2) indicada con el superíndice se ha convertido en el aminoácido que precede inmediatamente al superíndice en cuestión.

20 La proteína eritropoyetina puede ser además un análogo que tenga por lo menos un aminoácido adicional en el extremo carboxi de la glicoproteína, en cuyo caso el aminoácido adicional contiene por lo menos un sitio de glicosilación. El aminoácido adicional puede contener un
 25 fragmento péptido derivado del extremo carboxi de la gonadotropina coriónica humana. La glicoproteína es con preferencia un análogo elegido entre el grupo formado por (a) la eritropoyetina humana que posee la secuencia

de aminoácidos Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro
Ile Leu Pro Gln (SEQ ID NO:3), como prolongación del ex-
tremo carboxi; (b) el análogo de (a) que comprende ade-
5 más la EPO del tipo Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰; y (c) el análogo de
(a) que comprende además la EPO del tipo Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷
Asn⁸⁸Thr⁹⁰.

La proteína eritropoyetina puede ser además un aná-
logo que tenga una secuencia de aminoácidos que tenga
10 por lo menos un sitio de glicosilación. El reordenamien-
to puede suponer la eliminación de los sitios de car-
bohidrato unidos con enlace N de la eritropoyetina huma-
na y además la adición de un sitio carbohidrato unido
con enlace N a la posición 88 de la secuencia de aminoá-
15 cidos de la eritropoyetina humana. La glicoproteína es
con preferencia un análogo elegido del grupo formado por
la EPO del tipo Gln²⁴Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰; la EPO del tipo
Gln³⁸Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰; y la EPO del tipo Gln⁸³Ser⁸⁷Asn⁸⁸
Thr⁹⁰.

20 Más en particular, la proteína eritropoyetina de la
presente composición farmacéutica antes descrita puede
contener derivados pegilados de la misma. Los derivados
pegilados de la eritropoyetina y su obtención se conocen
en la técnica y se describen por ejemplo en los documen-
25 tos siguientes: EP-A-539,167, EP-A-605,963, WO 93/25212,
WO 94/20069, WO 95/11924, patente US n° 5,56, EP-A-
584,876, WO 92/16555, WO 94/28024, WO 97/04796, patentes
US n° 5,359,030 y 5,681,811, patente US n° 4,179,337,

patente japonesa, WO 98/32466, patente US n° 5,324,650. Una forma preferida de ejecución de las especies de eritropoyetina pegilada es la constituida por los derivados que se describen posteriormente.

5 La presente invención se refiere, pues, también a un conjugado de eritropoyetina, dicho conjugado comprende una proteína eritropoyetina tal como se ha descrito antes, provista de por lo menos un grupo amino libre y provista de una actividad biológica "in vivo" que aumenta la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos en la médula ósea y se elige entre el grupo formado por la eritropoyetina humana y los análogos de la misma que tengan la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación o
10 un reordenamiento de por lo menos un sitio de glicosilación; dicha eritropoyetina está unida con enlace covalente a "n" grupos polietilenglicol de la fórmula $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$, formando el grupo $-CO$ (es decir, carbonilo) de cada grupo polietilenglicol un enlace amídico con uno de dichos grupos amino; en ella, R es alquilo de bajo peso molecular; x es el número 2 ó 3; m es un número entre aprox. 450 y aprox. 900; n es un número de 1 a 3; y n y m se eligen de tal manera que el peso molecular del conjugado menos la glicoproteína eritropoyetina se sitúe entre 20 y 100 kilodaltones. Esta invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen los conjugados descritos, en ellas el porcentaje de conjugados en los que n es 1 se sitúa por lo menos en el
15
20
25

noventa por ciento, con preferencia por lo menos en el noventa y dos por ciento, o con mayor preferencia en el noventa y seis por ciento de todos los conjugados de la composición.

- 5 Los conjugados anteriores pueden representarse más específicamente por la fórmula (I)



- en la que P es el resto de una proteína eritropoyetina tal como se describe en este documento (es decir, sin el
10 grupo amino o los grupos amino que forman un enlace amida con el carbonilo que aparece en la fórmula I), y tienen una actividad biológica "in vivo" que consiste en incrementar la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos en la médula ósea; y en ella, R es alquilo de bajo
15 peso molecular; x es el número 2 ó 3; m es un número de 450 a 900; n es un número de 1 a 3; y n y m se eligen de tal manera que el peso molecular del conjugado menos la glicoproteína eritropoyetina se sitúe entre 20 y 100 kilodaltones.

- 20 Tal como se emplea en este escrito, "alquilo de bajo peso molecular" indica un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono. Son ejemplos de grupos alquilo de bajo peso molecular el metilo, etilo e isopropilo. Con arreglo a esta invención,
25 R es cualquier alquilo de bajo peso molecular. Son preferidos los conjugados en los que R es metilo.

El símbolo "m" significa el número de restos óxido de etileno (OCH₂CH₂) dentro del grupo poli(óxido de eti-

leno). Una subunidad PEG (polietilenglicol) del óxido de etileno tiene un peso molecular de 44 daltones. De este modo, el peso molecular del conjugado (excluyendo el peso molecular de la EPO) dependerá del número "m". En los

5 conjugados de esta invención, "m" es un número entre aprox. 450 y aprox. 900 (equivalente a un peso molecular entre 20 y 40 kDa), con preferencia entre 650 y 750 (equivalente a un peso molecular de aprox. 30 kDa). El número "m" se elige de tal manera que el conjugado re-

10 sultante de esta invención tenga una actividad fisiológica similar a la de la EPO no modificada, dicha actividad puede suponer el mismo valor, un valor superior o una fracción del valor de la actividad que despliega la EPO no modificada. Un peso molecular de "aprox." un

15 cierto número significa un margen razonable en torno a este número, tal como se determina con las técnicas analíticas convencionales. El número "m" se elige de tal manera que el peso molecular de cada grupo polietilenglicol unido con enlace covalente a la glicoproteína

20 eritropoyetina se sitúe entre 20 y 40 kDa, con mayor preferencia en torno a 30 kDa.

En los conjugados de esta invención, el número "n" es el número de grupos polietilenglicol unidos con enlace covalente a los grupos amino libres (incluidos los

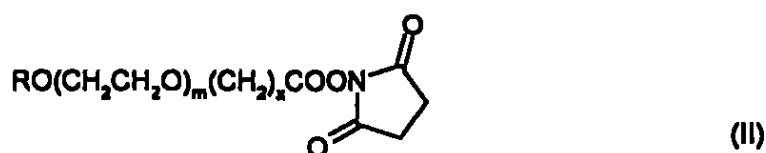
25 grupos ε-amino de un aminoácido lisina y/o el grupo amino terminal amino) de una proteína eritropoyetina mediante enlace(s) amida. El conjugado de esta invención puede tener uno, dos o tres grupos PEG por cada molécula

34
45

de EPO. "n" es un número entero situado entre 1 y 3, "n" es con preferencia el número 1 ó 2, y con mayor preferencia "n" es 1. Un conjugado preferido entre los conjugados descritos antes está constituido por los compuestos en los que x es el número 2, m es un número entre 650 y 750, n es el número 1 y R es metilo.

El compuesto de la fórmula (I) puede obtenerse a partir de material polimérico conocido:

10



15

en la que R y m tienen los significados definidos antes, por condensación del compuesto de la fórmula II con glicoproteína eritropoyetina. Los compuestos de la fórmula (II) en la que x es 3 son alfa(alcoxi de bajo peso molecular)-ésteres succinimidilo del ácido butírico de polietilenglicol (alcoxi de bajo peso molecular-PEG-SBA). Los compuestos de la fórmula (II) en los que x es 2 son alfa(alcoxi de bajo peso molecular)-ésteres succinimidilo del ácido propiónico del polietilenglicol (alcoxi de bajo peso molecular-PEG-SPA). Puede utilizarse cualquier método convencional de reacción de un éster activado con una amina para formar una amida. En la reacción descrita anteriormente, el éster de succinimidilo del ejemplo es

20

25

48
48

un grupo saliente que provoca la formación de una amida. El uso de ésteres de succinimidilo tales como los compuestos de la fórmula II para obtener conjugados de proteínas se describe en la patente U.S. n° 5,672,662, publicada el 30 de setiembre de 1997 (Harris y col.).

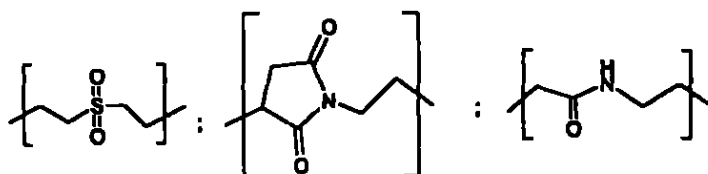
La EPO humana contiene nueve grupos amino libres, el grupo amino terminal amino y los grupos ϵ -amino de 8 restos lisina. Cuando el reactivo de pegilación se combina con un compuesto SBA de la fórmula II, se observa que a pH 7,5 se produce una proporción de proteína:PEG de 1:3 y cuando la temperatura de reacción se sitúa entre 20 y 25°C se produce una mezcla de especies mono-, di-pegilada y trazas de la especie tri-pegilada. Cuando el reactivo de pegilación es un compuesto SPA de la fórmula II, en las mismas condiciones salvo que la proporción proteína:PEG es de 1:2, se produce una especie básicamente mono-pegilada. La EPO pegilada puede administrarse en forma de mezcla o en forma de especie pegilada diferente, separada por cromatografía de intercambio catiónico. Variando las condiciones de reacción (p.ej. la proporción entre los reactivos, el pH, la temperatura, la concentración de proteína, el tiempo de reacción, etc.), pueden lograrse diferentes cantidades relativas de las distintas especies pegiladas.

Las composiciones farmacéuticas descritas antes pueden contener además una proteína eritropoyetina como la que se ha definido anteriormente, provista por lo menos de un grupo amino libre y provista de una actividad

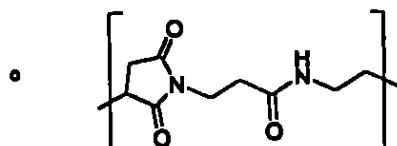
37
47

biológica "in vivo" que aumenta la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos en la médula ósea y elegida entre el grupo formado por la eritropoyetina humana y análogos de la misma que tengan la estructura primaria
5 de la eritropoyetina humana modificada por la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación; dicha glicoproteína está unida por enlace covalente con grupos (alcoxi de bajo peso molecular)-polietilenglicol en un número de uno a tres, cada grupo polietilenglicol está unido mediante
10 enlace covalente a la glicoproteína mediante un engarce de la fórmula $-C(O)-X-S-Y-$, formando el C(O) del engarce o eslabón un enlace amida con uno de dichos grupos amino, X es $-(CH_2)_k-$ o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, k es un número de 1 a 10, Y es

15



20



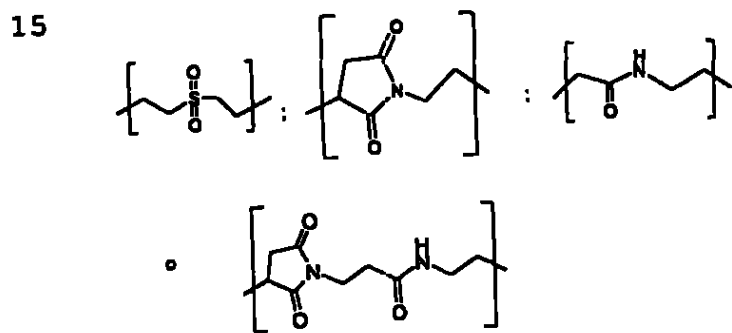
25 el peso molecular medio de cada fracción polietilenglicol se sitúa entre 20 kilodaltones y 40 kilodaltones y el peso molecular del conjugado se sitúa entre 51 kilodaltones y 175 kilodaltones.

Esta especie eritropoyetina puede representarse también con la fórmula (III)

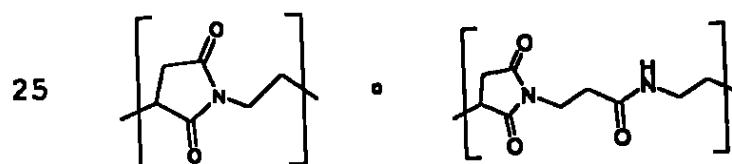


en la que R puede ser cualquier alquilo de bajo peso molecular, entendiéndose por tal un grupo alquilo lineal o ramificado que tenga de uno de seis átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, isopropilo, etc. Un alquilo preferido es el metilo. X puede ser $-(CH_2)_k-$ o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, en los que k es un número de 1 a 10. k es con preferencia un número de 1 a 4, k es con mayor preferencia todavía el número 1 ó 2. X es con mayor preferencia $-(CH_2)$.

En la fórmula 1, Y es

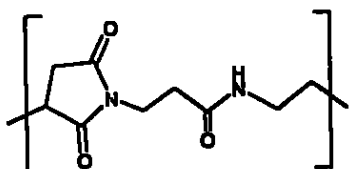


con preferencia



con mayor preferencia

5



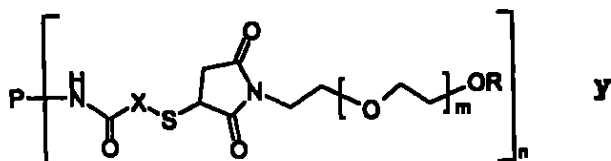
En la fórmula (III), el número m se selecciona de tal manera que el conjugado resultante de la fórmula (III) tenga una actividad fisiológica similar a la de la EPO sin modificar, dicha actividad puede suponer un valor igual, superior a, o una fracción de la actividad correspondiente de la EPO sin modificar. m significa el número de restos óxido de etileno existentes en la unidad PEG. Una subunidad PEG (polietilenglicol) de $-(OCH_2CH_2)-$ tiene un peso molecular de 44 daltones. De este modo, el peso molecular del conjugado (excluyendo el peso molecular de la EPO) dependerá del número m. Un peso molecular de "aprox." un cierto número significa que es un valor comprendido dentro de un intervalo razonable en torno a dicho número, tal valor es el resultado de aplicar técnicas analíticas convencionales. m es un número entero entre aprox. 450 y aprox. 900 (equivalente a un peso molecular entre 20 y 40 kDa), m se sitúa con preferencia entre 550 y 800 (entre 24 y 35 kDa) y con mayor preferencia m se sitúa entre 650 y 700 (entre 29 y 31 kDa).

En la fórmula (III), el número n es el número de

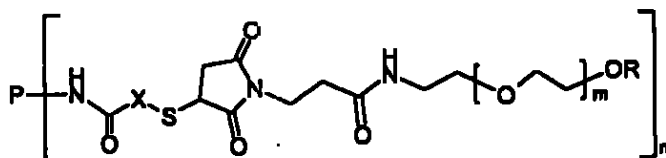
grupos s-amino existentes en un aminoácido lisina en una proteína eritropoyetina unida con enlace covalente a la unidad PEG mediante un enlace amida. Un conjugado de la presente invención puede tener una, dos o tres unidades
5 PEG por cada molécula de EPO. n es un número entero de 1 a 3, n es con preferencia el número 1 ó 2 y, con mayor preferencia, n es el número 1.

Las proteínas eritropoyetina preferidas de la fórmula (III) se representan en las fórmulas siguientes:

10



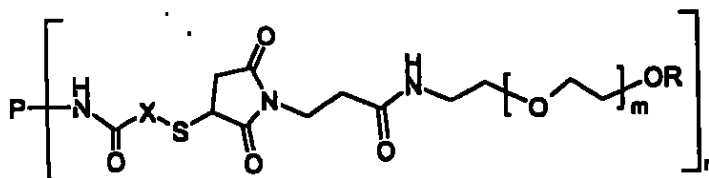
15



20

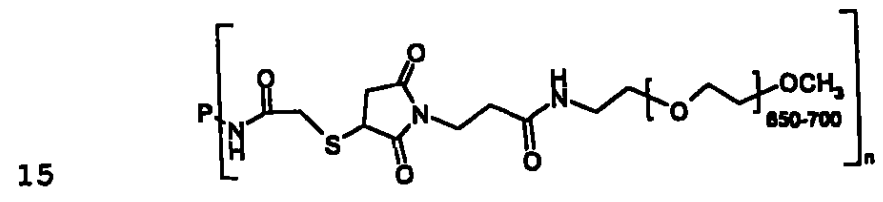
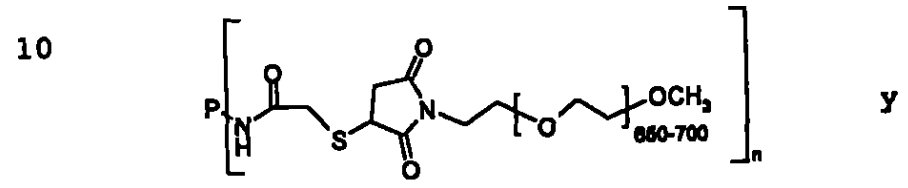
Los productos glicoproteínicos eritropoyetina más preferidos se representan mediante la fórmula:

25

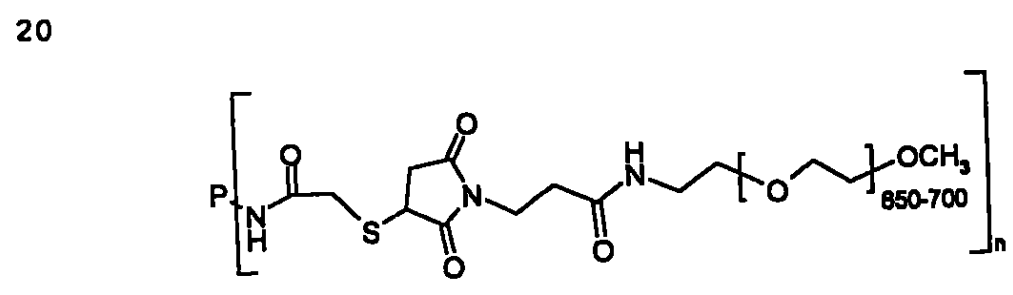


en dichas fórmulas, n es un número entero de 1 a 3; m es un entero de 450 a 900; R es alquilo de bajo peso molecular; X es $-(CH_2)_k-$ o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ y P es el resto de una glicoproteína eritropoyetina sin el grupo amino o grupos que con X forman un enlace amida.

Otros productos glicoproteína eritroproteína se representan mediante las fórmulas:



Los productos glicoproteína eritropoyetina más preferidos se representan en la fórmula:



25

Estas proteínas eritropoyetina pueden obtenerse por

(a) reacción covalente de un grupo α -amino de un aminoácido lisina existente en una proteína eritropoye-

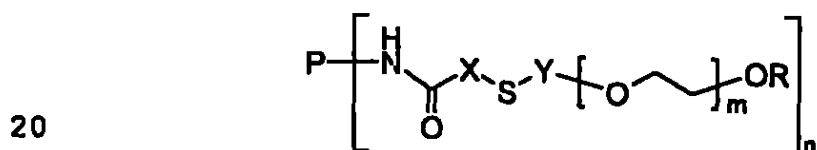
tina representada por la fórmula $P-[NH_2]_n$, con un reactivo bifuncional representado por la fórmula $Z-CO-X-S-Q$, formando un intermedio provisto de un enlace amida y representado por la fórmula:



en la que P es un proteína eritropoyetina menos el grupo amino que forma un enlace amida; n es un número entero de 1 a 3; Z es un grupo reactivo, p.ej. un éster NHS de ácido carboxílico; X es $-(CH_2)_k-$ o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, en el que k es un número de 1 a 10; y Q es un grupo protector, por ejemplo alcanoilo, p.ej. acetilo.

(b) reacción covalente del producto intermedio provisto de un enlace amida de la etapa (a) con un derivado activado de polietilenglicol, representado por la fórmula

15 la $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$, para formar un producto glicoproteína eritropoyetina representado por la fórmula:



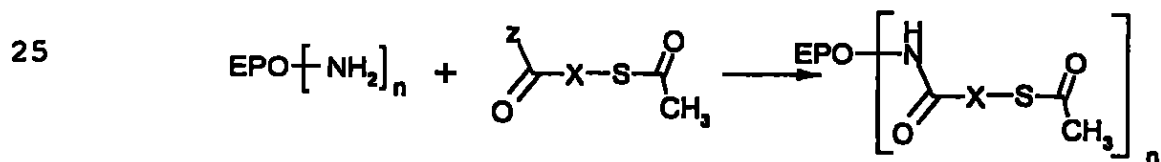
en la que W es una forma de Y reactiva con sulfhidrilo; m es un número entero entre 450 y 900; R es alquilo de bajo peso molecular; e Y tiene el significado definido anteriormente.

25

En esta forma de ejecución, el reactivo bifuncional es con preferencia el S-acetiltiliopropionato de N-succi-

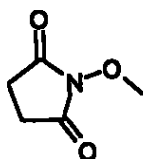
nimidilo o el S-acetiltioacetato de N-succinimidilo, Z es con preferencia la N-hidroxi-succinimida y el derivado polietilenglicol activado W-[OCH₂CH₂]_m-OR se elige con preferencia del grupo formado por yodo-acetil-metoxi-PEG, metoxi-PEG-vinilsulfona y metoxi-PEG-maleimida.

Más en concreto, las proteínas eritropoyetina de la fórmula (III) pueden obtenerse por enlace covalente de grupos tiol con EPO ("activación") y unión de la EPO activada resultante con un derivado de polietilenglicol (PEG). La primera etapa de la obtención de la EPO pegilada según la presente invención consiste en crear el enlace covalente entre los grupos tiol y los grupos NH₂ de la EPO. La activación de la EPO se efectúa con reactivos bifuncionales que llevan un grupo tiol protegido y un grupo reactivo adicional, por ejemplo los ésteres activos (p.ej. ésteres de succinimidilo), los anhídridos, los ésteres de ácidos sulfónicos, los halogenuros de ácidos carboxílicos y de ácidos sulfónicos, respectivamente. El grupo tiol se protege con grupos conocidos en la técnica, p.ej. grupos acetilo. Estos reactivos bifuncionales son capaces de reaccionar con los grupos ε-amino de los aminoácidos lisina formando un enlace amida. La primera etapa de la reacción se representa como sigue:



EPO, n y X tienen los significados definidos anteriormente y Z es un grupo reactivo conocido en la técnica, p.ej. un sustituyente N-hidroxi-succinimida (NHS) de la fórmula

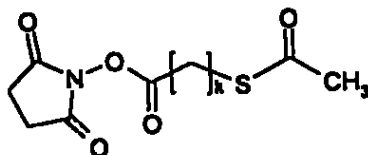
5



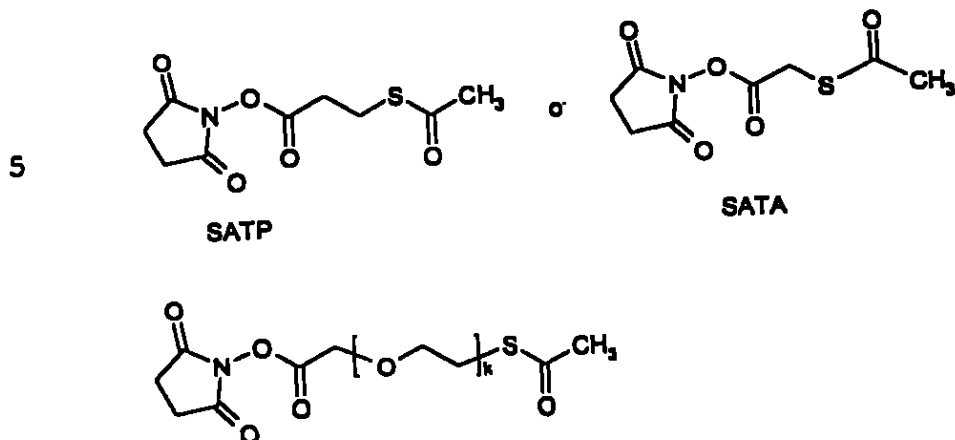
10

En una forma preferida de ejecución, la activación de los grupos ε-amino de la lisina se efectúa por reacción con reactivos bifuncionales que tengan una fracción succinimidilo. Los reactivos bifuncionales pueden llevar diferentes especies de espaciadores, p.ej. segmentos $-(CH_2)_k-$ o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, en los que k es un número de 1 a 10, con preferencia de 1 a 4 y con mayor preferencia 1 ó 2, y con preferencia especial el número 1. Son ejemplos de estos reactivos el S-acetiltiopropionato de N-succinimidilo (SATP) y el S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA).

25



éster NHS de ácido acetiltioalquilcarboxílico, p.ej.



éster NHS de ácido 2-acetiltio-(etoxi)_k-acético
teniendo k el significado definido anteriormente.

La obtención de reactivos bifuncionales ya es conocida en la técnica. En el documento DE-3924705 se describen precursores de ésteres NHS de ácido 2-acetiltio-(etoxi)_k-acético, mientras que la derivatización para obtener el compuesto acetiltio se describe en March, J., Advanced Organic Chemistry, McGraw-Hill, 1977, 375-376.

20 El SATA es un producto comercial (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos y Pierce, Rockford, IL).

El número de grupos tiol que hay que añadir a una molécula de EPO puede regularse ajustando los parámetros de la reacción, es decir, la concentración de proteína (EPO) y la proporción entre proteína y reactivo bifuncional. La EPO se activa con preferencia creando un enlace covalente a partir de 1 a 5 grupos tiol por cada molécula de EPO, con mayor preferencia de 1,5 a 3 grupos

25

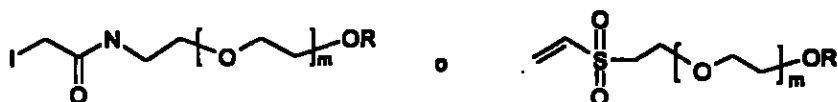
tiol por molécula de EPO. Estos márgenes se refieren a la distribución estadística del grupo tiol entre la población de proteínas EPO.

La reacción se lleva a cabo por ejemplo en una solución tampón acuosa, pH 6,5-8,0, p.ej. en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,3. El reactivo bifuncional puede añadirse en DMSO. Una vez finalizada la reacción, con preferencia después de 30 minutos, se interrumpe la reacción por adición de lisina. El exceso de reactivo bifuncional puede separarse por métodos ya conocidos en la técnica, p.ej. por diálisis o filtración en columna. El promedio de grupos tiol añadidos a la EPO puede determinarse por métodos fotométricos, descritos por ejemplo en Grasetti, D.R. y Murray, J.F., en J. Appl. Biochem. Biotechnol. 119, 41-49 (1967).

Después de la reacción anterior puede crearse un enlace covalente con un derivado de polietilenglicol (PEG) activado. Los derivados PEG idóneos son moléculas PEG activadas que tienen un peso molecular medio de 20 a 40 kDa, con mayor preferencia entre 24 y 35 kDa y con preferencia especial en torno a 30 kDa.

Los derivados PEG activados son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en Morpurgo, M. y col., J. Bioconj. Chem. (1996), 7, página 363 y sig. para el caso de la PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y de cadena ramificada son idóneas para la obtención de compuestos de la fórmula 1. Son ejemplos de compuestos PEG reactivos el yodo-acetil-metoxi-PEG y

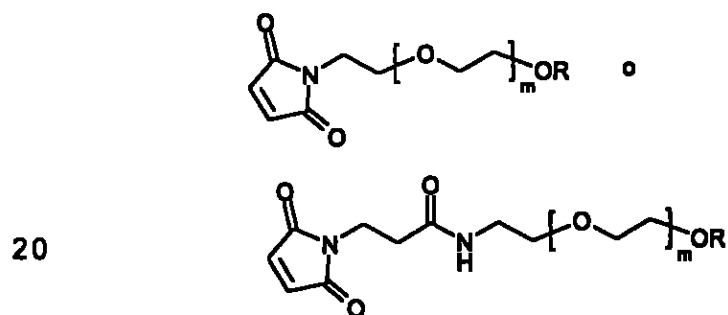
la metoxi-PEG-vinilsulfona:



5

El uso de estas sustancias activadas con yodo es conocido en la técnica y se describe p.ej. en Hermanson, G.T., en Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996), pp. 147-148.

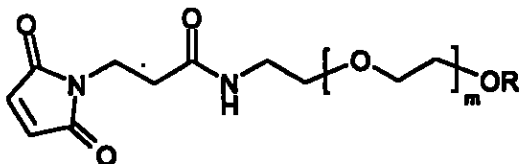
Las especies PEG se activan con preferencia especial con maleimida utilizando la (alcoxi-PEG-maleimida), por ejemplo la metoxi-PEG-maleimida (peso molecular 30.000; Shearwater Polymers, Inc.). La estructura de las alcoxi-PEG-maleimidadas es la siguiente:



20

en la que R y m tienen los significados definidos antes, con preferencia

25



La reacción de acoplamiento con alcoxi-PEG-maleimidadas tiene lugar después de haber eliminado "in situ" el grupo protector del tiol en una solución tampón acuosa, p.ej. fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,2. La eliminación del grupo protector puede efectuarse por ejemplo con hidroxilamina en DMSO a 25°C, pH 6,2, durante 90 minutos. Para la modificación con PEG, la proporción entre EPO activada y alcoxi-PEG-maleimida debería situarse entre 1:3 y 1:6, con preferencia en 1:4.

La reacción puede interrumpirse por adición de cisteína y reacción de los grupos tiol (-SH) remanentes con N-metilmaleimida o bien otro compuesto capaz de formar enlaces disulfuro. Debido a la reacción de los grupos tiol activos remanentes con un grupo protector, por ejemplo la N-metilmaleimida o cualquier otro grupo protector idóneo, las glicoproteínas EPO de los conjugados de esta invención pueden contener tales grupos protectores. En general, el procedimiento aquí descrito generará una mezcla de moléculas provistas de tioles en diferentes cantidades y protegidos por números distintos de grupos protectores, en función del número de grupos tiol activados que tenga la glicoproteína que no estén conjugados con la PEG-maleimida.

La N-metilmaleimida forma el mismo tipo de enlace covalente cuando se emplea para bloquear los grupos tiol restantes de la proteína pegilada, en cambio los compuestos disulfuro, por una reacción de intercambio intermolecular sulfuro/disulfuro, conducen a una unión de

puente disulfuro con el agente bloqueante. Los agentes bloqueantes preferidos para este tipo de reacción de bloqueo son las glutationas oxidadas (GSSG), las cisteínas y las cistaminas. En el caso de las cisteínas no se introduce carga neta adicional en la proteína pegilada, mientras que el uso de reactivos bloqueantes GSSG o cistamina implica una carga negativa o positiva adicional.

La purificación posterior de los compuestos de fórmula (III), incluida la separación de las especies EPO mono-, di- y tri-pegiladas, puede realizarse por métodos técnicos ya conocidos, p.ej. cromatografía de columna.

Una composición que contenga derivados de eritropoyetina pegilada llevará con preferencia por lo menos un noventa por ciento de conjugados mono-PEG, es decir, en ellos n es 1, esta composición puede prepararse con arreglo al ejemplo 5. Normalmente los conjugados mono-PEG de las glicoproteínas eritropoyetina son deseables porque suelen tener una actividad mayor que los conjugados di-PEG. El porcentaje de conjugados mono-PEG y la proporción entre las especies mono- y di-PEG puede controlarse cargando fracciones más abundantes en torno al pico de elución para disminuir el porcentaje de mono-PEG o bien fracciones más escasas para aumentar el porcentaje de mono-PEG en la composición. Los conjugados con un noventa por ciento de mono-PEG constituyen un buen equilibrio entre rendimiento y actividad. A veces puede ser deseable obtener composiciones en las que por ejemplo por lo menos el noventa y dos por ciento o por lo menos

el noventa y seis por ciento de los conjugados sean especies mono-PEG (n igual a 1). En una forma de ejecución de esta invención, el porcentaje de conjugados en los que n es 1 se sitúa entre el noventa y el noventa y seis por ciento.

Las composiciones según la presente invención pueden contener de 10 a 10.000 µg de una proteína eritropoyetina por ml, tal como se definido antes. Las composiciones contienen con preferencia de 10 a 1.000 µg, p.ej. 10, 50, 100 ó 400 µg por ml.

Las composiciones según la presente invención pueden contener además de 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 200 mmoles/l de sulfato, de 10 a 50 mmoles/l de fosfato, pH de 6,0 a 6,5. Esta composición puede contener metionina hasta 20 mM, del 1 al 5 % de un poliol (p/v), hasta el 0,1 % de Pluronic F68 (p/v) y opcionalmente CaCl₂ hasta 1 mM. Un ejemplo de esta composición contiene de 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmoles/l de sulfato, 10 mmoles/l de fosfato, un 3 % de manita (p/v), metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68 (p/v), pH 6,2.

En otra forma de ejecución de la presente invención, la composición puede contener de 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 100 mmoles/l de NaCl, de 10 a 50 mmoles/l de fosfato pH 6,0 - 7,0, opcionalmente del 1 al 5 % (p/v) de un poliol. Esta composición puede contener además metionina hasta 20 mM, hasta un 0,1 % de Pluronic F68 (p/v) y opcionalmente 7,5

µmoles/l de CaCl_2 . En concreto, esta composición puede contener de 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 100 mmoles/l de NaCl, metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68 (p/v) y 10 mmoles/l de fosfato, pH 7,0.

5 La presente invención se refiere además a la composición anterior que contiene de 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 50 mmoles/l de arginina, de pH 6 a pH 6,5, de 10 a 100 mmoles/l de sulfato sódico. Además, la composición puede contener metio-
10 nina hasta 20 mM, hasta un 0,1 % de Pluronic F68 (p/v), opcionalmente hasta 1 mmol/l de CaCl_2 y opcionalmente del 1 al 5 % (p/v) de un poliol. La composición puede contener en especial de 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmoles/l de arginina, pH 6,2, 30
15 mmoles/l de sulfato sódico, un 3 % de manita (p/v), metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68 (p/v) y opcionalmente 1 mmol/l de CaCl_2 .

Una forma preferida de ejecución de la presente invención se refiere a composiciones que contienen de 10 a
20 10.000 µg/ml de eritropoyetina, con preferencia de 25 a 500 µg/ml de eritropoyetina y

- a) fosfato sódico/potásico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 ó
- b) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 120 mM, pH 6,2 ó
- c) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3 % de
25 manita (p/v), pH 6,2 ó
- d) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3 % de manita (p/v), metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68 (p/v), pH 6,2 ó

e) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3 % de manita (p/v), pH 6,2 ó

f) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3 % de manita (p/v), metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68

5 (p/v), pH 6,2.

En la forma más preferida de ejecución, las composiciones contienen una cantidad de proteína eritropoyetina de 50, 100 ó 400 µg/ml. Las composiciones más preferidas contienen ya sea fosfato sódico 10 mM, sulfato
10 sódico 40 mM, un 3 % de manita (p/v), metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68 (p/v), pH 6,2, ya sea arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3 % de manita (p/v), metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68 (p/v), pH 6,2.

Las composiciones de la presente invención pueden
15 presentarse en forma de polvo secado por atomización.

La invención se refiere además a una composición que es un liofilizado o un polvo secado por atomización de las composiciones antes descritas. La composición puede reconstituirse para generar una solución líquida
20 por adición de un disolvente, p.ej. agua, o aplicarse directamente p.ej. con un dispositivo de inhalación o con un dispositivo de aplicación transdermal.

La invención se refiere además a un procedimiento de preparación de una composición tal como se ha descrito
25 to anteriormente, que consiste en mezclar una proteína eritropoyetina con una solución que contiene un anión de carga negativa múltiple y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables, como los defini-

dos anteriormente.

La presente invención se refiere además al uso de composiciones como las definidas anteriormente para fabricar medicamentos útiles para el tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con la anemia en pa-
5 cientes de deficiencia renal crónica (CRF), sida y/o para el tratamiento de pacientes de cáncer sometidos a quimioterapia. Incluye un método para el tratamiento y prevención de enfermedades que implican anemia en pa-
10 cientes con deficiencia renal crónica (CRF), sida y pacientes de cáncer que se someten a quimioterapia, tal método consiste en la etapa de administración de una composición definida anteriormente a un paciente.

Otra forma de ejecución de la presente invención se refiere a dispositivos para la liberación persistente,
15 local y sistémica, que contienen una composición definida anteriormente. Tal dispositivo puede ser cualquier tipo de implantado que proporcione una cesión controlada de eritropoyetina y que contenga la composición descrita
20 anteriormente, p.ej. micro- o nanopartículas basadas en polímeros. La composición descrita antes puede suministrarse también en forma de jeringuilla prerrellenada o en forma de cualquier otro dispositivo de aplicación, p. ej. un dispositivo de inyección sin aguja o un dispositi-
25 vo de inhalación.

La obtención de la eritropoyetina como ingrediente para composiciones como las descritas anteriormente o como material de partida para la obtención de derivados

64

de eritropoyetina descritos antes se describe con detalle por ejemplo en las patentes US nº 5,547,933 y 5,621,080, EP-B-0 148 605, Huang, S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984), 2708-2712, EP-B-0 205 564, EP-B-0 5 209 539 y EP-B-0 411 678 así como en Lai, P.H. y col., J. Biol. Chem. 261 (1986), 3116-3121, y Sasaki, H. y col., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076. La eritropoyetina para fines terapéuticos puede obtenerse por medios recombinantes (EP-B-0 148 605, EP-B-0 209 539 y 10 Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. y col. (1986), Immunobiol. 72: 213-224).

Los métodos de expresión y obtención de la eritropoyetina en medio sin suero se describen por ejemplo en WO 96/35718, de Burg, publicada el 14 de noviembre de 15 1996 y en la publicación de patente europea nº 513 738, de Koch, publicada el 12 de junio de 1992. Además de las publicaciones recién mencionadas, se conoce que puede efectuarse una fermentación sin suero de células CHO recombinantes que contiene un gen EPO. Tales métodos se 20 describen por ejemplo en EP-A-0 513 738, EP-A-0 267 678 y en forma general en Kawamoto, T. y col., Analytical Biochem. 130 (1983), 445-453, EP-A-0 248 656, Kowar, J. y Franek, F., Methods in Enzymology 421 (1986), 277-292, Bavister, B., Enzymology 271 (1981), 45-51, EP-A-0 481 25 791, EP-A-0 307 247, EP-A-0 343 635, WO 88/00967.

En el documento EP-A-0 267 678 se describen la cromatografía de intercambio iónico en S-Sepharose, una cromatografía HPLC preparativa de fase inversa en una

64
65

columna C₈ y la cromatografía de filtración a través de gel para utilizarlas en la purificación de la EPO producida en cultivo sin suero después de diálisis. En este contexto se puede sustituir la cromatografía de filtración a través de gel por la cromatografía de intercambio iónico a través de S-Sepharose con flujo rápido. Se ha propuesto también realizar una cromatografía de colorante a través de una columna de Blue Trisacryl antes de proceder a la cromatografía de intercambio iónico.

10 Nobuo, I. y col., J. Biochem. 107 (1990), 352-359, describen un proceso de purificación de la EPO recombinante. En este proceso se trata la EPO con una solución de Tween® 20, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, etilmaleimida, pepstatina A, sulfato de cobre y ácido oxámico
15 antes de realizar las etapas de purificación. Existen publicaciones, incluida la WO 96/35718, de Burg, publicada el 14 de noviembre de 1996, que describen un procedimiento de obtención de eritropoyetina en un proceso de fermentación sin suero (EPOsf).

20 La actividad específica de la EPO o de conjugados de EPO con arreglo a esta invención puede determinarse mediante varios ensayos ya conocidos en la técnica. La actividad biológica de proteínas EPO purificadas de esta invención es tal que la administración de la proteína
25 EPo por inyección a pacientes humanos se traduce en un aumento de la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos en la médula ósea con respecto a grupos de sujetos de control no inyectados. La actividad biológica de las

proteínas EPO o de fragmentos de las mismas, obtenidas y purificadas con arreglo a esta invención, puede comprobarse mediante métodos propuestos por Annable y col., Bull. Wld. Hlth. Org. (1972), 47:99-112 y Pharm. Europa edición especial Erythropoietin BRP Bio 1997(2). En el ejemplo 6 se describe otro ensayo biológico para determinar la actividad de la proteína EPO, el ensayo del ratón normocitémico.

Esta invención se comprenderá mejor con los ejemplos siguientes que ilustran pero no limitan la invención aquí descrita.

Ejemplos

Ejemplo 1: Fermentación y purificación de la EPO humana

15 a) Preparación y fermentación del inóculo

De la fase gaseosa del tanque de almacenaje en nitrógeno líquido se toma un vial del Banco de Trabajo Celular (Working Cell Bank), que se abastece de una línea celular CHO productora de EPO (puede utilizarse un ATCC 20 CRL8695, publicado en EP-411 678 (Genetics Institute)). Se trasladan las células a frascos rotativos de vidrio y se cultivan en un medio tamponado con hidrogenocarbonato en un incubador humidificado de CO₂. Los medios típicos sin suero utilizados para la obtención y fermentación 25 del inóculo se publican en la solicitud de patente europea 513 738, de Koch, publicada el 12 de junio de 1992, o en WO 96/35718, de Burg, publicada el 14 de noviembre de 1996 y contienen por ejemplo como medio el DMEM/F12

(p.ej. JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, US, producto n° 57-736) y además hidrogenocarbonato sódico, L+glutamina, D+glucosa, insulina recombinante, selenita sódica, diaminobutano, hidrocortisona, sulfato de hierro (II), asparagina, ácido aspártico, serina y estabilizador para células de mamíferos, p.ej. alcohol polivinílico, metilcelulosa, polidextrano, polietilenglicol, Pluronic F68, poligelina expansionadora de plasma (HEMAC-CEL®) o polivinilpirrolidona (WO 96/35718).

10 Se comprueba a nivel microscópico la ausencia de microorganismos contaminantes en los cultivos y de determinan las densidades celulares. Los ensayos se realizan en cada etapa de división.

15 Después del período de crecimiento inicial se diluye el cultivo celular en medio fresco hasta la densidad celular de partida y se somete a otro ciclo de crecimiento. Se repite el procedimiento hasta lograr un volumen de cultivo de aproximadamente 2 l por frasco rotatorio de vidrio. Después de unas 12 duplicaciones se dispone de 1 a 5 litros de este cultivo que se utiliza seguidamente como inóculo para el fermentador de 10 l.

Pasados de 3 a 5 días, el cultivo del fermentador de 10 l puede utilizarse como inóculo para el fermentador de 100 l.

25 Pasados otros 3-5 días de fermentación, el cultivo del fermentador de 100 l puede utilizarse como inóculo para el fermentador de producción de 1000 l.

b) Recolección y separación de las células

Se utiliza un procedimiento de realimentación de partidas, es decir, una vez se alcanza la densidad celular deseada se recoge aprox. el 80 % del cultivo. Se rellena el cultivo restante con medio fresco de cultivo y se cultiva hasta la recolección siguiente. Un ciclo productivo consiste en un máximo de 10 recolecciones consecutivas: 9 recolecciones parciales y 1 recolección final al término de la fermentación. La recolección tiene lugar cada 3-4 días.

Se traslada el volumen recolectado determinado a un reactor refrigerado. Se eliminan las células por centrifugación o filtración y se descartan. El líquido sobrenadante de la etapa de centrifugación que contiene la EPO se filtra en línea y se recoge un segundo reactor refrigerado. Cada cosecha se procesa por separado durante la purificación.

Un proceso típico de purificación de la proteína EPO se publica en WO 96/35718, de Burg, publicada el 14 de noviembre de 1996. El proceso de purificación se explica a continuación.

a) Cromatografía a través de Blue Sepharose

El Blue Sepharose (Pharmacia) consiste en perlas de Sepharose sobre cuya superficie se ha fijado el colorante Cibacron blue por enlace covalente. La EPO se une al Blue Sepharose con mayor fuerza que la mayoría de contaminantes no proteínaceos, algunas impurezas proteínaceas y el PVA, por consiguiente la EPO puede aumentar de concentración durante esta etapa. La elución a través de la

columna de Blue Sepharose se lleva a cabo aumentando la concentración de sal y el pH.

Se rellena la columna con 80-100 l de Blue Sepharose, regenerada con NaOH y equilibrada con tampón (cloruro sódico/cálcico y acetato sódico). Se carga el líquido sobrenadante del fermentador acidificado y filtrado. Una vez finalizada la carga se lava la columna primero con un tampón similar al tampón de equilibrado que contiene una mayor concentración de cloruro sódico y a continuación con un tampón basado en Tris. Se eluye el producto con un tampón basado en Tris y se recoge en una sola fracción con arreglo al perfil maestro de elución.

b) Cromatografía a través de Butyl Toyopearl

El Butyl Toyopearl 650 C (Toso Haas) es una estructura basada en poliestireno, sobre ella se unen con enlaces covalentes restos butilo alifáticos. La EPO se une a este gel con mayor fuerza que la mayoría de impurezas y el PVA, por lo tanto tiene que eluirse con un tampón que contenga isopropanol.

Se rellena la columna con 30-40 l de Butyl Toyopearl 650 C, regenerador con NaOH, se lava con un tampón basado en el Tris y se equilibra con un tampón basado en Tris que contenga isopropanol.

El líquido eluido a través de Blue Sepharose se ajusta a la concentración del isopropanol dentro del tampón de equilibrado de la columna y se carga en la columna. Se lava la columna con tampón de equilibrado con una mayor concentración de isopropanol. Se eluye el pro-

ducto con tampón (tampón basado en Tris con contenido alto de isopropanol) y se recoge en una sola fracción con arreglo al perfil maestro de elución.

5 c) Cromatografía a través de Ultrogel de hidroxia-
patita

El Ultrogel de hidroxapatita (Biosepra) consiste en hidroxapatita que se incorpora a una estructura (matriz) de agarosa para mejorar sus propiedades mecánicas. La EPO tiene poca afinidad con la hidroxapatita y por
10 tanto puede eluirse empleando concentraciones de fosfato menores que para el caso de impureza de proteína.

Se rellena la columna con 30-40 l de Ultrogel de hidroxapatita y se regenera con un tampón de fosfato potásico/cloruro cálcico y NaOH y después con un tampón
15 basado en Tris. A continuación se equilibra con un tampón basado en Tris que contenga una pequeña cantidad de isopropanol y cloruro sódico.

Después de la cromatografía a través de Butyl Toyo-
pearl, el líquido eluido que contiene la EPO se carga en
20 la columna. Seguidamente se lava la columna con tampón de equilibrado y tampón basado en Tris sin isopropanol ni cloruro sódico. Se eluye el producto con un tampón basado en Tris que contenga una concentración baja de fosfato potásico y se recoge una solución fracción con
25 arreglo al perfil maestro de elución.

d) Cromatografía HPLC de fase inversa con Vydac C4

El Vydac C4 (Vydac), material de la cromatografía HPLC en fase inversa, consiste en partículas de gel de

sílice cuya superficie lleva cadenas de alquilo C4. La separación de la EPO de las impurezas proteínáceas se basa en las diferencias existentes en su fuerza de interacción hidrófoba. La elución se realiza con un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoracético diluido.

La cromatografía HPLC se lleva a cabo utilizando una columna de acero inoxidable (relleno: de 2,8 a 3,2 litros de gel de sílice Vydac C4). El líquido eluido a través de Ultrogel de hidroxipatita se acidifica por adición de ácido trifluoracético y se carga en la columna de Vydac C4. Para el lavado y la elución se emplea un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoracético diluido. Se recogen las fracciones y se neutralizan inmediatamente con tampón fosfato. Se reúnen las fracciones de EPO comprendidas dentro de los límites IPC.

e) Cromatografía a través de DEAE Sepharose

El material DEAE Sepharose (Pharmacia) consiste en grupos dietilaminoetilo (DEAE) unidos a la superficie de las perlas de Sepharose mediante enlaces covalentes. La unión entre la EPO y los grupos DEAE se debe a interacciones iónicas. El acetonitrilo y el ácido trifluoracético pasan por la columna sin ser retenidos. Una vez han salido estas sustancias, se eliminan las impurezas existentes en cantidades de trazas por lavado de la columna con tampón acetato a pH bajo. A continuación se lava la columna con tampón fosfato neutro y se eluye la EPO con un tampón que tengan mayor fuerza iónica.

Se rellena la columna con DEAE Sepharose de flujo

rápido. Se ajusta el volumen de la columna para asegurar una carga de EPO dentro del margen de 3 a 10 mg de EPO por ml de gel. Se lava la columna con agua y tampón de equilibrado (fosfato sódico/potásico). Se reúnen las
5 fracciones de líquido eluido de la HPLC y se carga en la columna, lavando esta con tampón de equilibrado. A continuación se lava la columna con tampón de lavado (tampón de acetato sódico) y después con tampón de equilibrado. A continuación se eluye la EPO de la columna con
10 tampón de elución (cloruro sódico, fosfato sódico/potásico) y se recoge una sola fracción con arreglo al perfil maestro de elución.

Se ajusta el líquido eluido a través de la columna de DEAE Sepharose a la conductividad especificada. Se
15 filtra en condiciones estériles la sustancia farmacológica resultante, se envasa en frascos de Teflon y se almacena a -70°C.

Ejemplo 2: Pegilación de la EPO con mPEG-SBA

La EPO purificada con arreglo al procedimiento sin
20 suero del ejemplo 1 (EPOsf) es homogénea según se determina por métodos analíticos y presenta los patrones típicos que consisten en 8 isoformas. Tiene una actividad biológica específica de 190.000 IU/mg según se determina por el ensayo del ratón normocitémico. El reactivo de
25 pegilación empleado es el metoxi-PEG-SBA, que es un compuesto de la fórmula II en la que R es metilo; x es 3; y m es un número de 650 a 750 (promedio en torno a 680, equivalente a un peso molecular medio de unos 30 kDa).

Reacción de pegilación

A cien miligramos de EPOsf (9,71 moles de material que contiene 10,3 mg/ml de EPOsf, 5,48 μ moles) se le añaden 10 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5, 5 que contiene 506 mg de metoxi-PEG-SBA de 30 kDa (16,5 μ moles) (adquirido a la empresa Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama), y se mezclan a temperatura ambiente (20-23°C) durante 2 h. La concentración final de proteína es de 5 mg/ml y la proporción entre proteína 10 y reactivo PEG es de 1:3. Pasadas dos horas se interrumpe la reacción ajustando el pH a 4,5 con ácido acético glacial y se almacena a -20°C hasta quedar listo para la purificación.

Purificación

15 1. Mezcla de conjugado: En una columna de vidrio AMICON (2,2 x 7,5 cm) se introducen 28 ml de relleno SP-SEPHAROSE FF (resina sulfo-propilo de intercambio catiónico) y se equilibra con 20 mM de tampón acetato, pH 4,5 con un caudal de 150 ml/h. Se diluyen seis mililitros de 20 la mezcla reaccionante que contienen 30 mg de proteína 5 veces con el tampón de equilibrado y se cargan a la columna. Los materiales no adsorbidos se eliminan por lavado con el tampón y la mezcla de conjugados PEG adsorbidos se eluyen de la columna con NaCl 0,175 M en el 25 tampón de equilibrado. La EPOsf sin modificar que continúa dentro de la columna se eluye con NaCl 750 mM. Se reequilibra la columna con el tampón inicial. Se analizan las muestras por SDS-PAGE y se determina su grado de

pegilación. Se encuentra que el líquido eluido con NaCl 0,175 M contiene especies mono- y di-pegiladas así como trazas de especies tri-pegiladas, mientras que el líquido eluido con NaCl 750 mM contiene EPOsf sin modificar.

5 2. EPOsf mono-PEG y di-PEG: Se diluye 4 veces con el tampón la mezcla purificada de conjugados eluida de la columna en la etapa anterior, se vuelve a cargar en la columna y se lava del modo descrito. Se eluyen por separado la EPOsf di-PEG y la EPOsf mono-PEG empleando
10 como eluyente NaCl 0,1 M y NaCl 0,175 M, respectivamente. La elución se realiza además con NaCl 750 mM con el fin de eluir toda la EPOsf sin modificar que pudiera quedar en la columna.

 Como alternativa se diluye la mezcla reaccionante 5
15 veces con tampón acetato y se carga en la columna de SP-Sephrose (~0,5 mg de proteína/mg de gel). Se lava la columna y se eluyen la EPOsf mono-PEG, la EPOsf-di-PEG y la EPOsf sin modificar que estaban adsorbidas del modo descrito en la sección anterior.

20 Resultados

 Se sintetiza la EPOsf-PEG por conjugación química con una molécula lineal de PEG de peso molecular medio de 30 kDa. La EPOsf-PEG se deriva de la reacción entre los grupos amino primarios de la EPOsf con el derivado
25 éster succinimidilo de un ácido butírico-PEG de 30 kDa, resultando de tal reacción un enlace amida.

 Los resultados se resumen en la tabla 1. La mezcla de conjugados purificados contiene EPOsf mono- y di-PEG

74
75

y está libre de EPOsf sin modificar, según se determina por análisis SDS-PAGE. La mezcla de conjugados forma 23,4 mg o el 78 % del material de partida. La separación por cromatografía de intercambio catiónico de las EPOsf mono- y di-PEG indica que la proporción entre conjugados mono- y di-PEG dentro de la mezcla se sitúa casi en 1:1. Una vez finalizada la reacción, la proporción entre los componentes individuales mono:di:sin modificar se sitúa en 40:38:20 (%). El rendimiento global es casi cuantitativo.

Tabla 1: Resumen de resultados de pegilación de EPOsf

Muestra	Proteína (mg)	Rendimiento (%)
mezcla reaccionante	30	100
mono-	12,0	40
di-	11,4	38
sin modificar	6,0	20
mezcla conjug.	23,4	78

Ejemplo 3: Pegilación de EPO con mPEG-SPA

Una parte alícuota diferente de la EPOsf utilizada en el ejemplo 2 se hace reaccionar con 30 kDa de metoxi-PEG-SPA (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama). Se realiza la reacción con una proporción entre proteína y reactivo de 1:2 y se emplean técnicas de purificación con arreglo al ejemplo 2. Se obtiene básicamente una especie mono-pegilada.

Ejemplo 4: Unión covalente de los grupos tiol con

la EPO

Este ejemplo ilustra la determinación de las condiciones de reacción para lograr una unión covalente de los grupos tiol con la EPO. Para determinar las condiciones se añaden diferentes cantidades de un reactivo que contiene un grupo tiol bloqueado, en este caso SATA o SATP (disuelto en DMSO a razón de 10 mg/ml), a la solución de EPO, en este caso 1 ml de 5 mg/ml de EPO en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,3. Se agita la reacción durante 30 minutos (25°C) y se interrumpe por adición de una solución 1 M de lisina hasta alcanzar una concentración de 10 mM. Las cantidades en exceso de SATA o SATP se eliminan por diálisis frente a fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM y EDTA 2 mM, pH 6,2. Una vez eliminado el grupo acetilo protector con hidroxilamina se determina fotométricamente con ditiodipiridina el número de grupos tiol unidos a la EPO con enlace covalente según el método descrito por Grasetti, D.R. y Murray, J.F. en J. Appl. Biochem. Biotechnol. 119, pp. 41-49 (1967).

El número de grupos tiol unidos por enlace covalente a la molécula de EPO se muestra seguidamente.

Proporción molar EPO:SATA o EPO:SATP	Moles de grupos tiol/mol de EPO
EPO:SATA = 1:3	1,5
EPO:SATA = 1:5	2,4
EPO:SATA = 1:6	3,2
EPO:SATP = 1:3	1,3
EPO:SATP = 1:4	2,5
EPO:SATP = 1:6	3,7

79
77

Ejemplo 5: Modificación de EPO activada con metoxi-PEG-maleimida

A) Activación de la EPO

Se activan 100 mg de EPO producida según el ejemplo 1 (190.000 IU/mg, determinado por el ensayo del ratón normocitémico) con SATA (proporción molar EPO/SATA = 1/5) según el ejemplo 2. La EPO resultante ("EPO activada") lleva grupos tiol bloqueados, unidos mediante enlace covalente, se separa por diálisis de los productos secundarios del tipo N-hidroxisuccinimida y SATA no reaccionado, tal como se describe en el ejemplo 1. Se obtiene una solución de 4,5 mg/ml de EPO activada en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,2.

B) Pegilación de la EPO activada

Se disuelven 380 mg de metoxi-PEG-maleimida que tienen la estructura "más preferida" ilustrada antes (peso molecular 30.000; Shearwater Polymers, Inc., Huntsville (Alabama, Estados Unidos)) en la solución anterior que contiene 95 mg de EPO activada (4,5 mg/ml en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,2). La proporción molar resultante entre EPO activada y la metoxi-PEG-maleimida en la solución es de 1:4. Añadiendo una solución acuosa 1 M de hidroxilamina hasta alcanzar una concentración de 30 mM, pH 6,2, a la solución anterior, se desbloquean los grupos tiol bloqueados y unidos por enlace covalente con la EPO activada. La EPO activada resultante de la mezcla reaccionante en solución contiene grupos tiol (-SH) libres. Después del desbloqueo

de los grupos tiol se efectúa inmediatamente la reacción de unión de la EPO activada, provista ahora de grupos tiol (-SH) libres, con la metoxi-PEG-maleimida durante 90 minutos (agitación a 25°C). Se interrumpe la reacción
5 de unión añadiendo a la mezcla reaccionante una solución acuosa 0,2 M de cisteína hasta alcanzar una concentración de 2 mM. Pasados 30 minutos, el exceso de grupos tiol libres de la EPO activada, que no hayan reaccionado con la metoxi-PEG-maleimida, se bloquean añadiendo una
10 solución 0,5 M de N-metilmaleimida en DMSO hasta alcanzar una concentración de 5 mM. Pasados 30 minutos, la mezcla reaccionante obtenida, que ahora contiene especies EPO pegiladas, se dializa con fosfato potásico 10 mM, pH 7,5 durante $\geq$ 15 horas.

15 C) Purificación de especies EPO pegiladas

Para separar las especies EPO pegiladas de la mezcla reaccionante se efectúa el siguiente proceso de purificación: Se equilibra una columna de 50 ml de Q-Sepharose FF con fosfato potásico 10 mM, pH 7,5. Se carga
20 en la columna la mezcla reaccionante obtenida en la etapa B) (caudal: 3 volúmenes de columna (VC) por hora). Con el fin de separar el reactivo metoxi-PEG-maleimida que no haya reaccionado se lava la columna con 5 VC de fosfato potásico 10 mM, pH 7,5. Se separa la especie EPO
25 pegilada por elución con un gradiente de sal creciente que consiste en 5 VC de tampón A (fosfato potásico 10 mM, pH 7,5) y 5 VC de tampón B (fosfato potásico 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) con un caudal de 3 VC por hora. Ba-

sándose en el gradiente de NaCl se eluyen en primer lugar las especies EPO pegiladas (especies EPO tri-, di- y mono-pegiladas), después se eluyen las especies EPO no pegiladas. La fracción de líquido eluido que contiene las especies EPO pegiladas (especies EPO tri-, di- y mono-pegiladas) se reúne y se filtra (filtración estéril a través de un filtro 0,2 μ m).

El contenido y la pureza de las especies EPO tri-, di- y mono-pegiladas se evalúa con geles SDS-PAA teñidos con colorante Coomassie (Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)), mientras que las concentraciones de proteína se determinan a 280 nm según la ley de Beer-Lambert. Los peso moleculares aparentes de las especies EPO se determinan por electroforesis SDS-PAA y se sitúan en torno a 68 kDa (especie EPO mono-pegilada), en torno a 98 kDa (especie EPO di-pegilada) y en torno a 128 kDa (especie EPO tri-pegilada).

La ulterior separación de las especies EPO tri-, di- y mono-pegiladas puede llevarse a cabo por cromatografía, p.ej. por cromatografía de exclusión de tamaños (Superdex, pg 200; Pharmacia). La determinación de la actividad biológica "in vivo" de los líquidos eluidos que contienen las especies tri-, di- y mono-pegiladas se realiza por el método descrito posteriormente.

Ejemplo 6: Actividad "in vivo" de la EPO pegilada, determinada por el ensayo del ratón normocitémico

El ensayo biológico del ratón normocitémico ya es conocido en la técnica (Pharm. Europa, edición especial:

Erythropoietin BRP Bío 1997(2)) así como un método de la monografía de la eritropoyetina de la Ph. Eur. BRP. Se diluyen las muestras en BSA-PBS. A los ratones de salud normal, de 7-15 semanas de edad, se les administran por
5 vía subcutánea 0,2 ml de la fracción de EPO que contiene la EPO no pegilada o las EPO tri-, di- o mono-pegiladas del ejemplo 2 ó 3. Durante un periodo de 6 días se extrae sangre por punción de la vena caudal y se diluye de tal manera que 1 µl de sangre esté presente en 1 ml de
10 una solución colorante anaranjada de acridina 0,15 µmolar. El periodo de tintura es de 3 a 10 minutos. El recuento de reticulocitos se efectúa por microfluorimetría en un citómetro de flujo por análisis del histograma de fluorescencia roja. El número de reticulocitos se
15 expresa en forma de figuras absolutas (por cada 30.000 células sanguíneas analizadas). En cuanto a los datos presentados, cada grupo consta de 5 ratones por día y se extrae sangre de los ratones solamente una vez.

En ensayos separados se administran a los ratones
20 una dosis única de EPO sin modificar (25 ng de EPO), la mezcla PEG(SBA)-EPO del ejemplo 2 (10 ng de conjugado), las EPO mono- y di-pegiladas del ejemplo 2 (10 ng de conjugado), la EPO PEG(SPA) del ejemplo 3 (10 ng de conjugado) y la solución tampón. Los resultados se recogen
25 en la tabla 2. Los resultados confirman la actividad superior y la prolongada vida media de las especies EPO pegiladas, que se ponen de manifiesto con las cantidades significativamente mayores de reticulocitos y por el au-

mento del número máximo de reticulocitos utilizando la misma dosis por ratón (10 ng), por comparación con la dosis de 25 ng de EPO sin modificar.

Tabla 2

	EPO (no mo- dif.)	SPA PEG 30 kDa	Mono 30K SBA	Di 30K SBA	PEG-EPO SBA Mezcla de conjugados	Con- trol tampón
72 h	1000	1393	1411	994	1328	857
96 h	500	1406	1501	926	1338	697
120 h	~200	1100	1182	791	944	701
144 h	~0	535	607	665	660	708

5 Ejemplo 7: Obtención de EPO predominantemente mono-PEG

Reacción de pegilación

Partiendo de 100 mg (5,48 μ moles) de EPOsf en tam-
pón fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, obtenida con arre-
10 glo al ejemplo 1, se añaden 329 mg (10,96 μ moles) de
reactivo PEG-SBA 30 kDa disuelto en 3 ml de HCl 1 mM. Se
añade tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, suficiente
para que el volumen de la mezcla reaccionante alcance
los 20 ml. La concentración final de proteína es de 5
15 mg/ml y la proporción entre proteína y reactivo PEG se
sitúa en 1:2. Se mezcla la masa reaccionante durante 2 h
a temperatura ambiente (20-22°C). Pasadas 2 h se inte-
rrumpe la reacción ajustando el pH a 4,5 con ácido acé-
tico glacial y almacenando el material congelado a -20°C

hasta que esté listo para la purificación.

Purificación

Se diluye la mezcla reaccionante de la etapa anterior en proporción 1:5 con acetato sódico 10 mM, pH 4,5, y se carga en una columna de 4,2 x 19 cm, cuyo relleno son 300 ml de SP-Sepharose FF (resina sulfopropilo de intercambio catiónico). La columna se equilibra previamente con el mismo tampón. Los líquidos eluidos de la columna se controlan a 280 nm con un monitor Gilson UV y se traza la gráfica correspondiente en un registro Kipp & Zonen. Se lava la columna con 300 ml o con 1 volumen de columna de tampón de equilibrado para eliminar el exceso de reactivos, productos secundarios de la reacción y EPO-PEG oligomérica. Después se lava con 2 volúmenes de columna de NaCl 100 mM para eliminar la EPO di-PEG. A continuación se eluye la EPO mono-PEG con NaCl 200 mM. Durante la elución de la EPO mono-PEG se descartan los primeros 50 ml del pico de proteína, recogiénose la EPO mono-PEG en forma de fracción de 150 ml. La EPOsf sin modificar que permanece en la columna se eluye con NaCl 750 mM. Todos los tampones de elución se preparan del tampón de equilibrado. Todas las muestras eluidas se analizan por SDS-PAGE y por cromatografía de exclusión de tamaños de alta resolución (SEC). El conjunto de EPO mono-PEG obtenida de la fracción de 150 ml, que no contiene EPOsf sin modificar detectable, se concentra hasta ~4,5-7,5 mg/ml y se diafiltra en el tampón de almacenaje, fosfato potásico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. La con-

centración/diafiltración se efectúa a temperatura ambiente en un sistema Millipore Labscale™ TFF, equipado con una membrana Millipore Pellicon XL Biomax 50 de corte en 50 kDa. La EPO mono-PEG concentrada se filtra en 5 condiciones estériles y se almacena congelada a -20°C.

Aproximadamente el 75 % de la EPOsf está pegilada. Después de la purificación, el rendimiento total es de ~30 % de EPO mono-PEG con una cantidad no detectable de EPOsf sin modificar y en torno al 25 % de EPO di-PEG.

10 Los oligómeros y la EPOsf sin pegilar se cuenta como proteína restante. El conjunto de EPO mono-PEG obtenida a partir de la fracción de 150 ml contiene aproximadamente un 90 % de EPO mono-PEG y aproximadamente un 10 % de EPO di-PEG.

15 Ejemplo 8: Termoestabilidad de la EPO y de la EPO pegilada en varias formulaciones: análisis DSC (calorimetría de escaneo diferencial)

Se acepta en general que la temperatura de transición de desnaturalización térmica, medida por calorimetría de escaneo diferencial, es un indicador válido de la termoestabilidad de las proteínas. Se analizan soluciones de eritropoyetina o de eritropoyetina pegilada con concentraciones comprendidas entre 0,6 y 1,2 mg/ml en diversos tampones con o sin estabilizadores mediante

20 la nano-DSC (Calorimetric Sciences Corporation, Utah, Estados Unidos), calentando a razón de 2 K/min. Un aumento de la temperatura de transición indica un aumento de la estabilidad térmica de la proteína. Los valores de

25

temperatura medidos no deben tomarse como valores absolutos sino como diferencias de estabilidad entre las distintas formulaciones individuales entre sí.

Con el fin de definir el pH óptimo de la formulación se estudia la desnaturalización térmica de la eritropoyetina pegilada en función del pH en el intervalo comprendido entre 4 y 9. Se analizan muestras de proteína en Na_2HPO_4 30 mM, citrato sódico 30 mM, borato 30 mM. La figura 3 muestra una meseta de temperatura máxima de transición entre pH 6 y pH 9 y un fuerte descenso por debajo de pH 5,5. Esto indica que el pH óptimo para una estabilidad térmica máxima se sitúa por encima de pH 5,5 (figura 3).

Con el fin de investigar el efecto de la fuerza iónica se determina la desnaturalización térmica en función de la concentración de fosfato. La figura 4 demuestra que la estabilidad térmica aumenta cuando aumenta la fuerza iónica de la formulación.

Se investiga también con la DSC la influencia que tiene la sustancia tampón. De la figura 5 se deriva que los tampones o aditivos más idóneos para conseguir una estabilidad térmica elevada son el sulfato, el citrato o el fosfato. La glicina que se utiliza como tampón en las formulaciones convencionales (ver antes) no es muy indicada.

La figura 6 demuestra que el sulfato es también un tampón/aditivo idóneo para pH bajo (p.ej. pH 6,2), mientras que el fosfato es menos indicado para pH 6,2 que

para pH 7,5. Esto indica que el sulfato mantiene alta la estabilidad térmica, incluso a pH bajo. Estos resultados hacen viables las formulaciones a un pH comprendido entre 6,0 y 6,5, sin pérdidas graves de estabilidad térmica de la eritropoyetina.

Ejemplo 9: Agregación de EPO y peg-EPO bajo la acción del calor, análisis SDS-PAGE (electroforesis a través de gel de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico)

Con el fin de investigar el efecto de la aportación de calor a la proteína eritropoyetina, se exponen al calor (20 min a 80°C) muestras de diferentes formulaciones y se analizan por electroforesis a través de gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras (con DTT en el tampón de la muestra) y no reductoras (sin DTT en el tampón de la muestra). Este método permite la detección de la formación de agregados covalentes. Tal como se ha apuntado antes, la formación de agregados es una de las principales vías de degradación de proteínas y por tanto debería impedirse que este fenómeno ocurriera en las formulaciones farmacéuticas de proteínas. Los agregados detectables en ausencia de agente reductor (p.ej. DTT) y no detectables en presencia de agente reductor es muy probable que se formen por puentes disulfuro incorrectos, una reacción de oxidación, por acción del calor. La figura 5 representa la agregación por acción del calor en función del pH. Este ensayo demuestra claramente que la formación de agregados se evita por debajo de pH 6,5. Cuanto más alto es el

pH, tanto mayor será la cantidad de agregación. La mayoría de agregados que se forman pueden reducirse por tratamiento de las muestras con un agente reductor durante la SDS-PAGE, sugiriendo que una gran porción de los
 5 agregados formados por acción del calor son dímeros unidos mediante puente disulfuro, oligómeros u otros agregados de orden superior. En su conjunto, esto indica que la formación de agregados puede impedir en gran manera manteniendo el pH de la formulación en o por debajo de
 10 6,5.

Figura 7: Agregación de la peg-EPO en función del pH. Después de someterlas al calor (tal como se describe antes), las muestras de peg-EPO se analizan por SDS-PAGE. Las proteínas se colorean con plata. Calle 1: peso
 15 molecular estándar. Calle 2: pH 5. Calle 3: pH 5, reducido. Calle 4: pH 6. Calle 5: pH 6, reducido. Calle 6: pH 6,5. Calle 7: pH 6,5, reducido. Calle 8: pH 7. Calle 9: pH 7, reducido. Calle 10: peg-EPO no sometida al calor.

20 La formación de agregados puede impedirse también utilizando antioxidantes. La figura 8 muestra que el uso de 1 mg/ml de acetilcisteína como antioxidante impide la formación de agregados por acción del calor. Por lo tanto es útil utilizar un antioxidante, por ejemplo la acetilcisteína, a pH bajo, p.ej. pH 6,2, para impedir la
 25 formación de agregados por acción del calor.

Figura 6: La agregación de la peg-EPO puede impedirse por pH 6,2 y/o por acetilcisteína. Las muestras de

peg-EPO sometidas al calor (tal como se describe antes) se analizan por SDS-PAGE. Las proteínas se colorean con plata. Calle 1: peg-EPO no sometida al calor. Calle 2: pH 7,5, sometida al calor. Calle 3: pH 6,2, sometida al calor. Calle 4: pH 6,2, sometida al calor, reducida. Calle 5: pH 7,5, 1 mg/ml de acetilcisteína, sometida al calor. Calle 6: pH 7,5, 1 mg/ml de acetilcisteína, sometida al calor, reducida.

Ejemplo 10: Estabilidad de la peg-EPO en varias formulaciones a 4, 25, 30 y 40°C.

Se incubaba la EPO pegilada en varias formulaciones a diversas temperaturas. En momentos temporales preestablecidos se toman muestras y se evalúa la estabilidad por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (rpHPLC), cromatografía de exclusión de tamaños de alta eficacia (SEC) y electroforesis a través de gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La tabla 3 compara la estabilidad de la peg-EPO en varias formulaciones y a diversas temperaturas. Estos datos demuestran claramente la superioridad de las formulaciones de la presente invención en lo tocante a recuperación de proteínas y agregación.

Tabla 3: Estabilidad de la peg-EPO en varias formulaciones y diversas temperaturas

		% de recuperación después de seis meses a				Agregación detectable a 30°C (+/-)
Formulación *	peg-EPO (µg/ml)	4°C	25°C	30°C	40°C	
A	10	92	91	n.d.	39	n.d.
B	50	97	98	97	78	-
C	50	95	79	79	52	+
E	50	103	102	100	87	-
A	100	96	97	n.d.	50	n.d.
B	400	101	101	101	77	-
C	400	100	94	90	56	+
D	400	98	96	93	73	-
E	400	99	98	100	66	-

* Las formulaciones son:

- formulación A: fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 7,5
- formulación B: fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, 3 % de manita (p/v), pH 6,2
- formulación C: fosfato sódico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0
- formulación D: fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 120 mM, pH 6,2
- formulación E: arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, 3 % de manita, CaCl₂ 1 mM, pH 6,2.

Ejemplo 11: Formulaciones optimizadas que evitan la oxidación de la metionina-54 en la proteína EPO, la me-

tionina actúa como antioxidante

Se incubaba la EPO pegilada en varias formulaciones a diversas temperaturas. Pasados 6 meses se toman muestras y se determina el grado de oxidación de la metionina-54, del modo siguiente. Para abreviar, se tratan las muestras de EPO con endoproteinasa LysC. Los péptidos resultantes se separan por cromatografía en fase inversa. Se calcula la proporción entre péptido oxidado en T8 (que contiene la metionina-54 oxidada) y péptido T8 (que contiene metionina-54 no oxidada). Los datos se recogen en la tabla 4.

Tabla 4: Grado de oxidación de metionina-54 en la proteína EPO en varias formulaciones después de seis meses a la temperatura indicada

		% de metionina-54 oxidada			
Formulación	peg-EPO	4°C	25°C	30°C	40°C
*	(µg/ml)				
A	400	2,00	15,89	24,89	37,89
B	400	2,33	6,55	12,88	30,24
C	400	2,51	2,95	5,99	14,4
A	50	5,37	21,36	30,62	48,05
B	50	3,44	13,38	16,59	30,83
C	50	4,41	5,52	10,01	15,62

* Las formulaciones se indican seguidamente:
 formulación A: fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 7,0
 formulación B: fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40

mM, 3 % de manita (p/v), pH 6,2

formulación C: fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, 3 % de manita (p/v), metionina 1 mM, pH 6,2

Estos datos demuestran claramente que la formulación preferida de la presente invención (fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, 3 % de manita (p/v), pH 6,2) es superior a otras formulaciones por ejemplo fosfato sódico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0, en cuanto al grado de oxidación de la metionina-54. La adición de metionina 1 ó 10 mM a la formulación evita claramente la oxidación de la metionina-54. Además, la metionina actúa como antioxidante y estabiliza la EPO.

Ejemplo 12: Contenido de ácido siálico en muestras de peg-EPO de varias formulaciones

Con el fin de estudiar la integridad de la estructura carbohidrato de la glicoproteína peg-EPO se analiza con técnicas estándar el contenido en ácido siálico en muestras de peg-EPO de formulaciones optimizadas después de mantenerlas almacenadas durante 6 meses a varias temperaturas. Los resultados indican que la integridad de la estructura carbohidrato no sufre efectos negativos por almacenaje de la proteína en las nuevas formulaciones aquí descritas (figura 9).

Ejemplo 13: Bioactividad de la EPO pegilada después de mantenerla a temperaturas elevadas durante períodos prolongados de tiempo

Con el fin de comprobar que el almacenaje de la peg-EPO en fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, 3

% de manita (p/v), pH 6,2, no influye negativamente en la bioactividad "in vivo", se realiza un ensayo estándar de EPO en ratón (ver ejemplo 6). Las muestras de peg-EPO almacenadas durante 6 meses en fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3 % (p/v) de manita, pH 6,2, a las temperaturas indicadas, no presentan pérdida de actividad "in vivo" después de almacenarse a 4, 25 y 30°C, con respecto al estándar de referencia recién preparado (figura 10).

10 Ejemplo 14: Contenido de agregados en peg-EPO después de almacenaje a temperatura elevada durante 6 meses

En orden a analizar el contenido de agregados en las muestras de peg-EPO después de almacenarlas a temperaturas elevadas en fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3 % (p/v) de manita, pH 6,2, se toman muestras al cabo de 6 meses y se analizan por cromatografía de exclusión de tamaños.

No se detectan agregados a 4, 25 ni 30°C, demostrándose la estabilidad de la EPO pegilada en las formulaciones antes mencionadas. La figura 11 muestra una superposición de los cromatogramas de exclusión de tamaños.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: F.Hoffmann-La Roche AG

5 (B) CALLE: 124 Grenzacherstrasse

(C) CIUDAD: Basilea

(D) NACIÓN: Suiza

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): CH-4070

(G) TELÉFONO: (61) 688 11 11

10 (H) TELEFAX: (61) 688 13 95

(I) TELEX: 962 292 hlr ch

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Composición farmacéu-
tica líquida

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

15 (iv) FORMA COMPUTERIZADA:

(A) TIPO DE MEDIO: disquete (floppy disk)

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: WORD

(D) SOFTWARE: PatentIn edición 2.0

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val

96
94

130	135	140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala		
145	150	155 160
Cys Arg Thr Gly Asp		
165		
<210> 2		
<211> 166		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 2		
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu		
1	5	10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His		
	20	25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe		
	35	40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp		
	50	55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu		
65	70	75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp		
	85	90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu		
	100	105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala		
	115	120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val		
	130	135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala		
145	150	155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg		
165		

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica líquida que contiene una proteína eritropoyetina, un anión inorgánico de carga múltiple en un tampón farmacéuticamente aceptable, idóneo para mantener el pH de la solución en un intervalo comprendido entre 5,5 y 7,0 y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.
2. La composición según la reivindicación 1 en forma de solución acuosa.
- 10 3. La composición según las reivindicaciones 1 y 2 en forma de solución isotónica.
4. La composición según las reivindicaciones de 1 a 3 en la que el anión es un anión de un ácido inorgánico fuerte y provisto de carga múltiple.
- 15 5. La composición según las reivindicaciones de 1 a 4, en la que el anión se elige entre el grupo formado por sulfato, citrato y fosfato.
6. La composición según las reivindicaciones de 1 a 5, en la que el anión es el anión sulfato.
- 20 7. La composición según la reivindicación 6 que contiene de 10 a 200 mmoles/l de sulfato.
8. La composición según las reivindicaciones de 1 a 7, en la que el pH se sitúa entre 5,8 y 6,7.
9. La composición según la reivindicación 8 en la que el pH se sitúa entre 6,0 y 6,5.
- 25 10. La composición según la reivindicación 9 en la que el pH se sitúa en torno a 6,2.
11. La composición según las reivindicaciones de 1

a 10 en la que el tampón se elige entre el grupo formado por un tampón fosfato y un tampón arginina/H₂SO₄/Na₂SO₄.

12. La composición según la reivindicación 11 en la que el tamón es un tampón fosfato de 10 a 50 mmolar.

5 13. La composición según las reivindicaciones de 1 a 12, caracterizada porque consta de uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 14. La composición según la reivindicación 13 caracterizada porque uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables se eligen entre el grupo formado por sales, diluyentes, disolventes y conservantes farmacéuticamente aceptables.

15 15. La composición según las reivindicaciones 13 y 14 en la que los excipientes farmacéuticamente aceptables se eligen del grupo formado por agentes tonificadores, polioles, antioxidantes y detergentes no iónicos.

16. La composición según las reivindicaciones de 13 a 15 en la que el excipiente farmacéuticamente aceptable es un poliol.

20 17. La composición según la reivindicación 16, en la que el poliol se elige del grupo formado por la manita, la sorbita, la glicerina, la trehalosa y la sacarosa.

25 18. La composición según la reivindicación 17, en la que el poliol es la manita.

19. La composición según las reivindicaciones de 13 a 18 que comprende un antioxidante.

20. La composición según la reivindicación 19 en la

que el antioxidante es la metionina.

21. La composición según las reivindicaciones de 13 a 20 que contiene hasta 1 mmol/l de CaCl_2 .

22. La composición según las reivindicaciones de 15 a 22, en la que el detergente no iónico es el polisorbato 80, polisorbato 20 o el Pluronic F68.

23. La composición según la reivindicación 22, en la que el detergente no iónico es el Pluronic F68.

24. La composición según las reivindicaciones 22 ó 23, caracterizada porque contiene hasta un 1 % (p/v) de detergente no iónico.

25. La composición según una de las reivindicaciones de 22 a 24, caracterizada porque contiene hasta un 0,1 % (p/v) de detergente no iónico.

26. La composición según una de las reivindicaciones de 1 a 25 caracterizada porque la proteína eritropoyetina es la eritropoyetina humana.

27. La composición según la reivindicación 26, en la que la proteína eritropoyetina se expresa por activación genética endógena.

28. La composición según las reivindicaciones 26 y 27 caracterizada porque la proteína eritropoyetina tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2.

29. La composición según las reivindicaciones de 26 a 28, en la que la proteína tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por adición de 1 a 6 sitios de glicosilación.

30. La composición según las reivindicaciones de 26 a 28 en la que la proteína eritropoyetina tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada con una de las variantes elegida del grupo siguiente:

- 5 Asn³⁰Thr³²;
- Asn⁵¹Thr⁵³;
- Asn⁵⁷Thr⁵⁹;
- Asn⁶⁹;
- Asn⁶⁹Thr⁷¹;
- 10 Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;
- Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
- 15 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
- Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
- 20 Asn¹³⁶Thr¹³⁸;
- Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
- Thr¹²⁵; y
- Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

31. La composición según las reivindicaciones de 26 a 30, en la que la secuencia de la eritropoyetina humana está modificada por un reordenamiento de por lo menos un sitio de glicosilación.

32. La composición según la reivindicación 31, en

la que el reordenamiento consiste en la eliminación de cualquier sitio de glicosilación unido mediante N de la eritropoyetina humana y en la adición de un sitio de glicosilación unido mediante N en la posición 88 de la
5 secuencia de la eritropoyetina humana.

33. La composición según la reivindicación 31, en la que la glicoproteína tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada con una modificación elegida entre el grupo siguiente:

10 Gln²⁴Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
Gln³⁸Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰; y
Gln⁸³Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰.

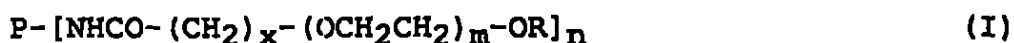
34. La composición según las reivindicaciones de 26 a 33, caracterizada porque la proteína eritropoyetina
15 definida en una cualquiera de las reivindicaciones está pegilada.

35. La composición según la reivindicación 34, caracterizada porque la proteína eritropoyetina es un conjugado, dicho conjugado comprende una proteína eritropoyetina provista de por lo menos un grupo amino libre y provista de una actividad biológica "in vivo" que aumenta la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos en la médula ósea y se elige entre el grupo formado por la eritropoyetina humana y los análogos de la misma que
20 tengan la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación o un reordenamiento de por lo menos un sitio de glicosilación; dicha eritropoyetina está unida con enlace cova-
25

-78-

lente a "n" grupos polietilenglicol de la fórmula $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$, formando el grupo $-\text{CO}$ (es decir, carbonilo) de cada grupo polietilenglicol un enlace amídico con uno de dichos grupos amino; en ella, R es al-
5 quilo de bajo peso molecular; x es el número 2 ó 3; m es un número entre aprox. 450 y aprox. 900; n es un número de 1 a 3; y n y m se eligen de tal manera que el peso molecular del conjugado menos la glicoproteína eritropoyetina se sitúe entre 20 y 100 kilodaltones.

10 36. La composición según la reivindicación 35 con una proteína eritropoyetina de la fórmula:



en la que m, n, x y R tienen los significados definidos antes y P es el resto de una glicoproteína sin los n
15 grupos amino que forman enlaces amida con los grupos polietilenglicol.

37. La composición según la reivindicación 36, en la que en la fórmula (I), x es 2, m es un número de 650 a 750 y n es el número 1 y R es metilo.

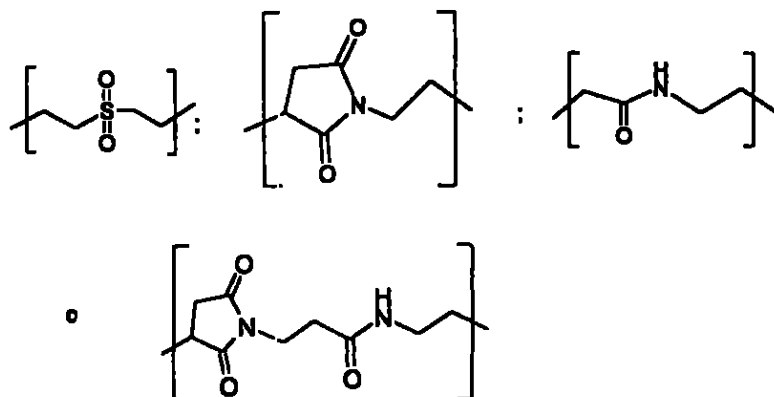
20 38. La composición según la reivindicación 34, en la que la proteína eritropoyetina es un conjugado, dicho conjugado está provisto por lo menos de un grupo amino libre y provisto de una actividad biológica "in vivo" que aumenta la producción de reticulocitos y de glóbulos
25 rojos en la médula ósea y elegida entre el grupo formado por la eritropoyetina humana y análogos de la misma que tengan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada por la adición de 1 a 6 sitios de glicosi-

-79-

lación; dicha glicoproteína está unida por enlace covalente con grupos (alcoxi de bajo peso molecular)-polietilenglicol en un número de uno a tres, cada grupo polietilenglicol está unido mediante enlace covalente a la glicoproteína mediante un engarce de la fórmula
 5 $-C(O)-X-S-Y-$, formando el C(O) del engarce o eslabón un enlace amida con uno de dichos grupos amino, X es $-(CH_2)_k-$ o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, k es un número de 1 a 10, Y es

10

15

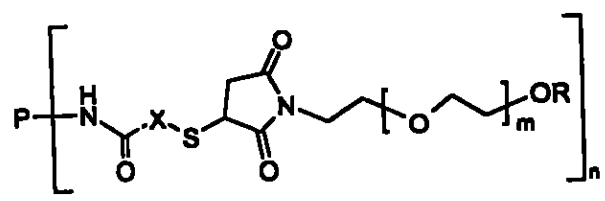


20

el peso molecular medio de cada fracción polietilenglicol se sitúa entre 20 kilodaltones y 40 kilodaltones y el peso molecular del conjugado se sitúa entre 51 kilodaltones y 175 kilodaltones.

39. El conjugado de la reivindicación 38 de la fórmula

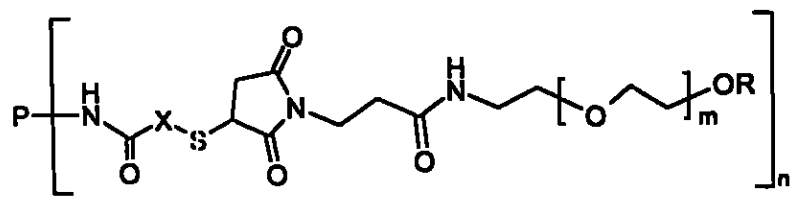
5



en la que n es un número entero de 1 a 3; mes un número entero de 450 a 900; R es alquilo de bajo peso molecular; X es $-(\text{CH}_2)_k-$ o $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, y P es el resto de una glicoproteína eritropoyetina sin el grupo amino o los grupos aminos que forman un enlace amida con X.

15

40. El conjugado de la reivindicación 39, de la fórmula:



20

en la que n es un número entero de 1 a 3; mes un número entero de 450 a 900; R es alquilo de bajo peso molecular; X es $-(\text{CH}_2)_k-$ o $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, y P es el resto de una glicoproteína eritropoyetina sin el grupo amino o los grupos aminos que forman un enlace amida con X.

41. La composición según las reivindicaciones de 1 a 40 que consta de 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml.

42. La composición según las reivindicaciones de 1 a 41 que consta de 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 200 mmoles/l de sulfato y de 10 a 50 mmoles/l de fosfato, pH de 6,0 a 6,5.

5 43. La composición de la reivindicación 42 que contiene metionina hasta 20 mM, del 1 al 5 % de poliol (p/v), hasta un 0,1 % de Pluronic F68 (p/v) y opcionalmente CaCl₂ hasta 1 mM.

10 44. La composición según las reivindicaciones 42 ó 43 que contiene del 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmoles/l de sulfato, 10 mmoles/l de fosfato, el 3 % de manita (p/v), metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68 (p/v), pH 6,2.

15 45. La composición de las reivindicaciones 1 a 41 que contiene de 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 100 mmoles/l de NaCl, de 10 a 50 mmoles/l de fosfato, pH de 6,0 a 7,0, opcionalmente del 1 al 5 % de un poliol.

20 46. La composición según la reivindicación 45 que contiene metionina hasta 20 mM, hasta un 0,1 % de Pluronic F68 y opcionalmente 7,5 µmoles/l de CaCl₂.

25 47. La composición de la reivindicación 45 ó 46 que contiene de 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 100 mmoles/l de NaCl, metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68 y 10 mmoles/l de fosfato, pH 7,0.

48. La composición de las reivindicaciones 1 a 41 que contiene de 10 a 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 50 mmoles/l de arginina, pH de 6 a

6,5, de 10 a 100 mmoles/l de sulfato sódico.

49. La composición de la reivindicación 48 que contiene metionina hasta 20 mM, hasta un 0,1 % de Pluronic F68, opcionalmente hasta 1 mmol/l de CaCl_2 y opcionalmente del 1 al 5 % de un poliol.

50. La composición de las reivindicaciones 48 ó 49, que contiene de 10 a 10.000 μg de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmoles/l de arginina, pH 6,2, 30 mmoles/l de sulfato sódico, un 3 % de manita, metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68 y opcionalmente 1 mmol/l de CaCl_2 .

51. La composición de las reivindicaciones 1 a 41 que contiene de 25 a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de eritropoyetina y

- a) fosfato sódico/potásico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 ó
- 15 b) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 120 mM, pH 6,2 ó
- c) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3 % de manita, pH 6,2 ó
- d) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3 % de manita, metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68, pH
- 20 6,2 ó
- e) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3 % de manita, pH 6,2 ó
- f) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3 % de manita, metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68, pH 6,2.

25 52. La composición según las reivindicaciones 1 a 51 en la que la cantidad de eritropoyetina es 50, 100 ó 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

53. La composición según la reivindicación 52 que

contiene fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% de manita, metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68, pH 6,2.

5 54. La composición según la reivindicación 52 que contiene arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3 % de manita, metionina 10 mM, un 0,01 % de Pluronic F68, pH 6,2.

10 55. La composición según las reivindicaciones de 1 a 54 en forma de un liofilizado o de un polvo secado por atomización.

15 56. Un procedimiento para la preparación de la composición según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 54, que consiste en mezcla una proteína eritropoyetina con una solución que contiene un anión de carga negativa múltiple y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 57. Dispositivo para la liberación persistente local y sistémica que consta de una composición según una de las reivindicaciones de 1 a 54.

58. La invención tal como se ha descrito en el presente escrito.

Fig. 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
Cys Arg Thr Gly Asp¹⁶⁵

Fig. 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
 Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
 Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
 Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Gln Ala Ile Ser¹²⁰
 Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
 Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Asn Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg¹⁶⁶

Fig. 3

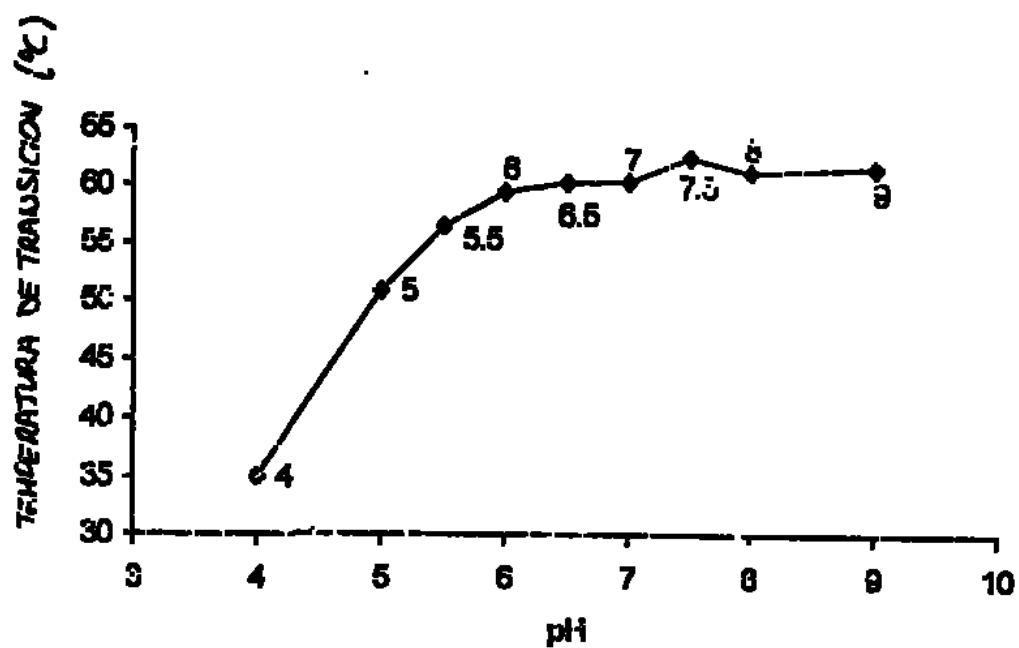


Fig. 4

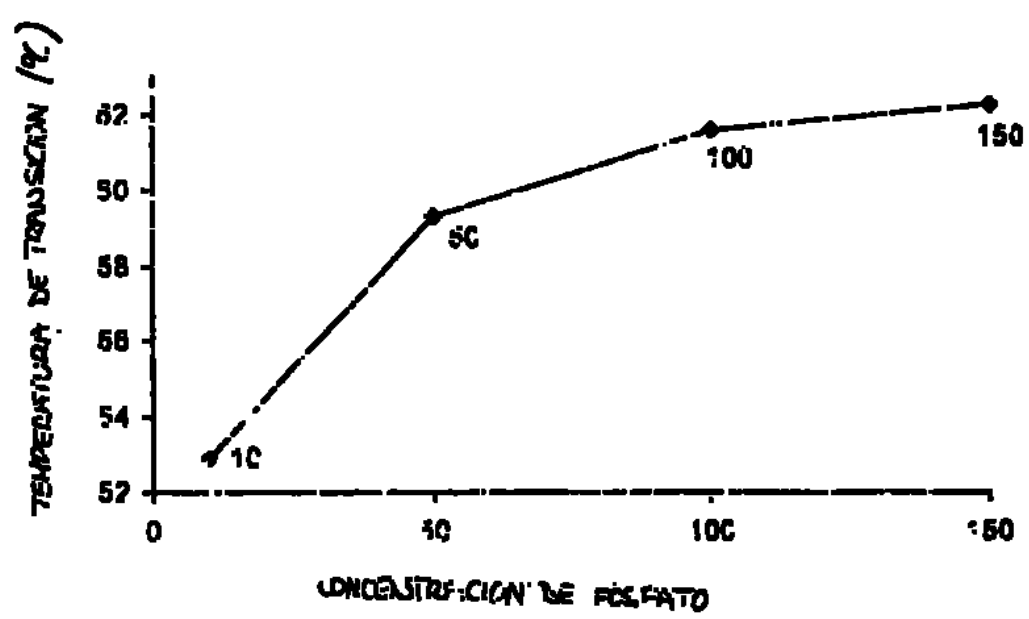


Fig. 5

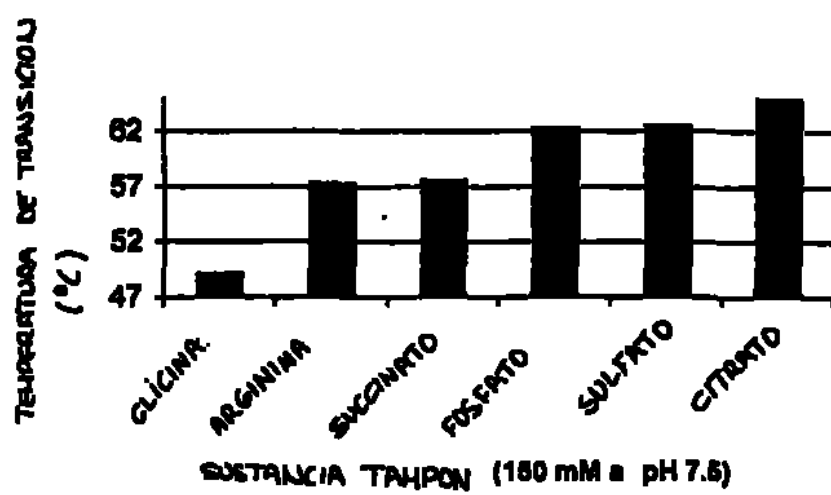


Fig. 6

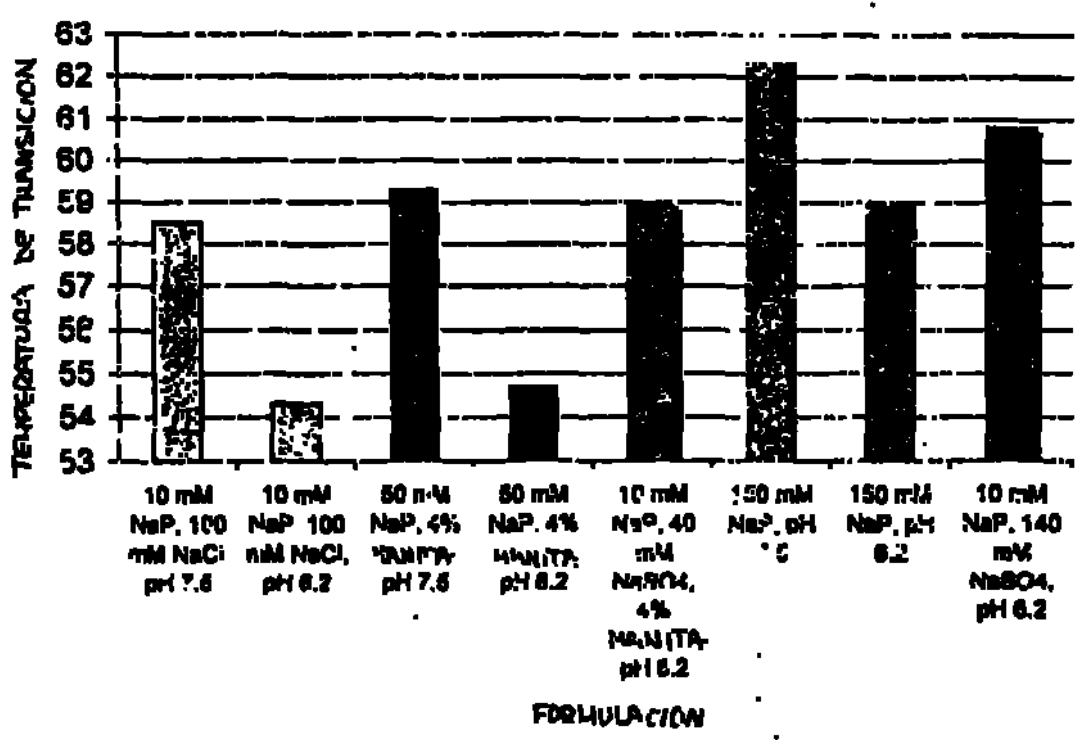


Fig. 7

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

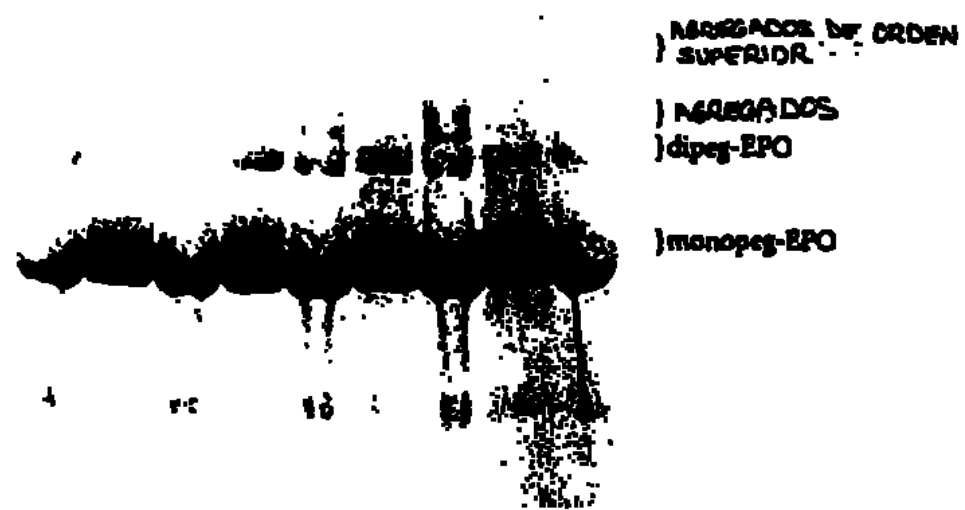


Fig. 8

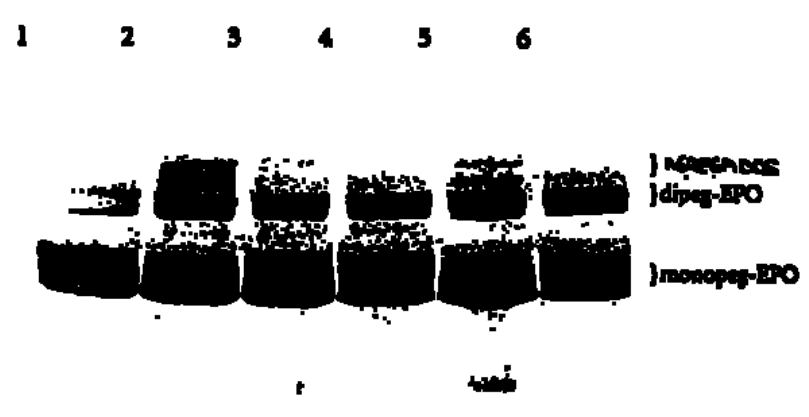


Fig. 9

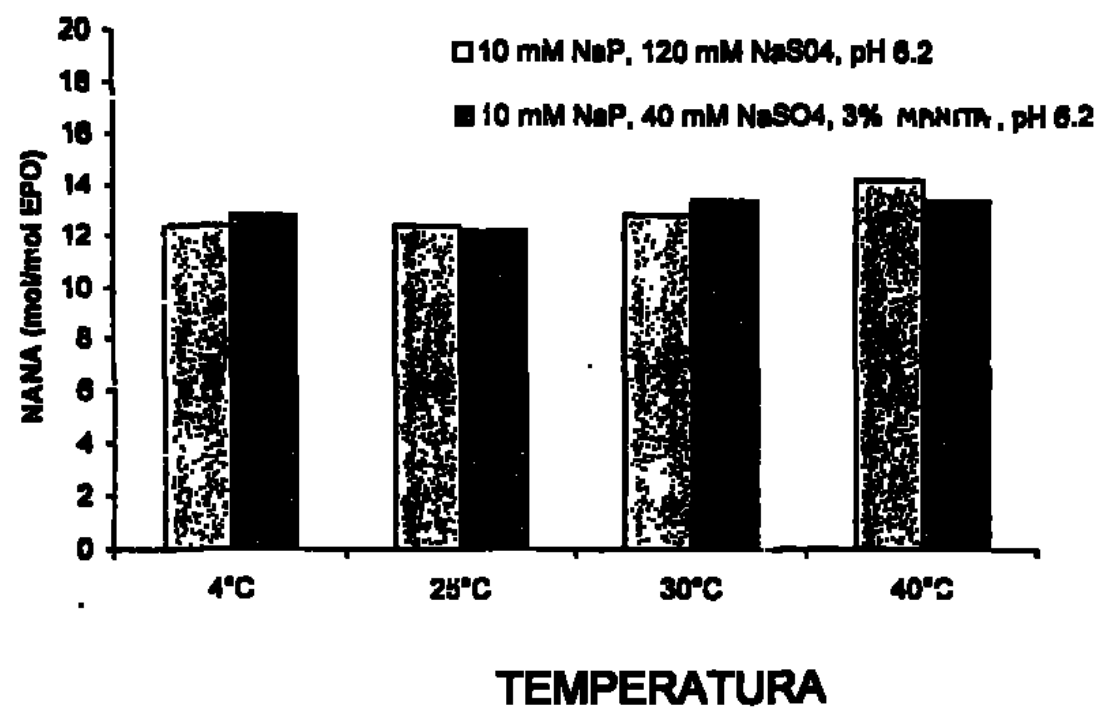


Fig. 10

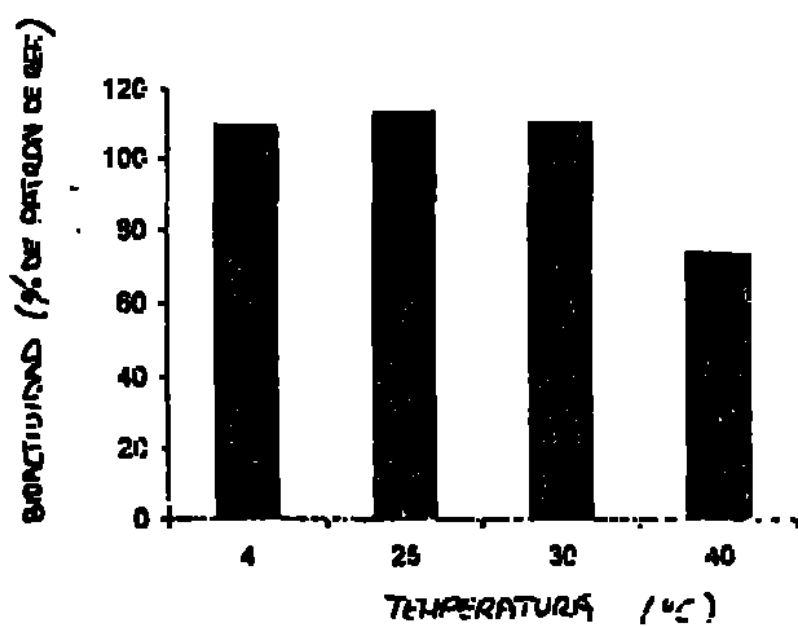
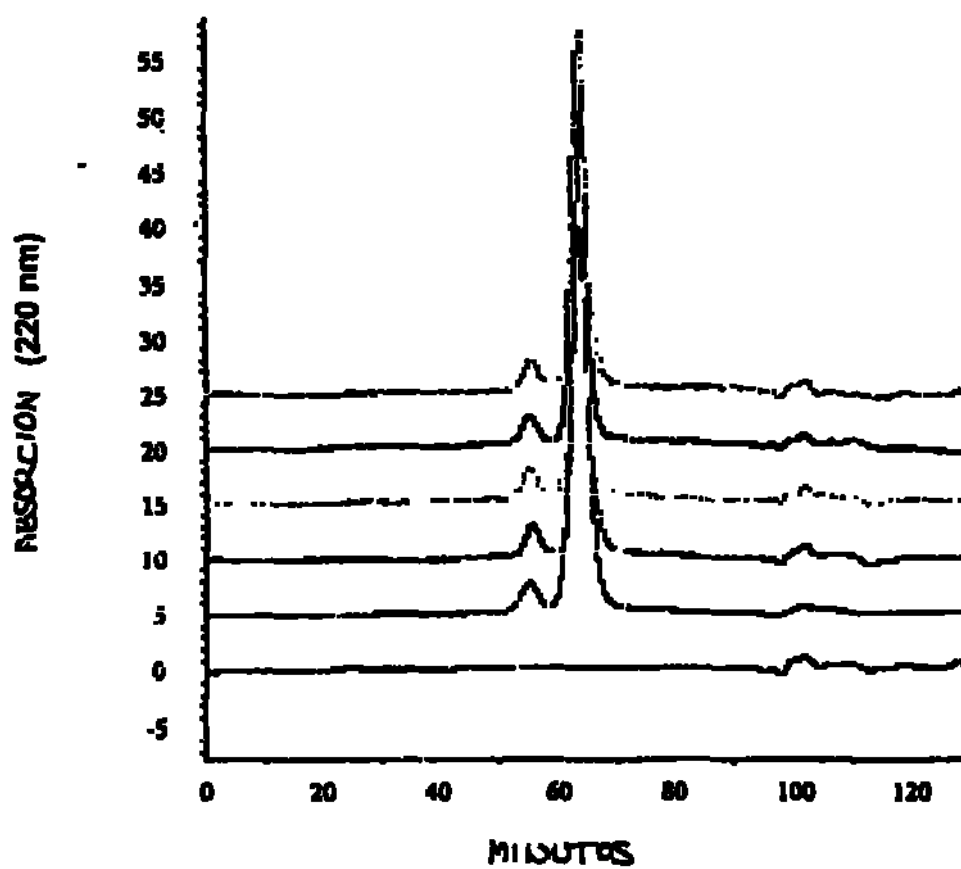


Fig . 11



Traducción oficial del idioma alemán no.: 210-56

Hoja 3:

No. de documentos P 1168/2000

Por medio de la presente autentico la firma anterior, puesta ante mí por
el señor Apollon Papadimitriou, nacido el 23 de septiembre de 1968,
domiciliado en 83673 Bichl, Bachstr. 38 a,
a quien conozco personalmente.

Penzberg, el 15 de septiembre de 2000.

(firmado) Dr. Gregor Basty, notario.

Hoja 1:

(firmado) Dr. Peter Kuster, abogado y notario,
Peterskirchplatz 12, apartado postal, CH- 4001 Basilea, hay un sellos seco del
notario Peter Kuster en Basilea.

Leg.-Prot 2001 no. 112

Apostilla

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

1. País: Suiza

Este documento público

2. ha sido firmado por Dr. iur. P. Kuster

3. en su calidad de notario público

4. está provisto con el sello del mencionado

Confirmado

5. en Basilea

6. el 11 de abril de 2001

7. por la Cancillería de Estado del cantón Basilea-ciudad

Dr. Peter Kuster
Notario Público
Tribunal de Justicia Oficial
Cancillería del Cantón de Basilea
4001

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Norman G. G. G.

023990

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUENTES DE INFORMACION

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 OCT 23 A 10 25

U.D.

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

8. bajo el no. 2'36415'467

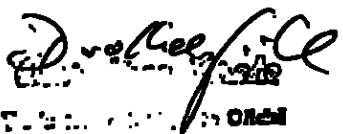
9. Sello:

10. Firma

Hay un sello redondo de la
Cancillería de Estado del cantón de
Basilea-ciudad

(firmado) Heidi Fischer

Es traducción fiel y completa del original


Dorothee Grote
Traductora e intérprete oficial
Resolución no. 2501 del Ministerio de Justicia 1994

Dorothee Grote, traductora e intérprete oficial

Resolución no. 2501 del Ministerio de Justicia 1994

SE:II A FI 163 200
1994

CS 31 72
1994

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Monique Gorte

023175

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 OCT 17 A 11:32

2002
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

TRADUCCION OFICIAL No. 2002-10-22-584
DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES

TRASPASO

Caso 20619

Yo/Nosotros, el suscrito

Apollon Papadimitriou, biólogo, ciudadano alemán

38a Bachstrasse

D-83673 Bichl, Alemania

CESIONISTA(S), por el presente declaro que soy/somos el inventor
único/conjunto de la invención llamada

Nueva Composición Farmacéutica

para la cual la primera solicitud(es) se presentó así:

País/países	:	Europa
Fecha(s) de registro	:	15 de mayo de 2.000
Número de registro	:	00110355.5

y que por una causa contractual adecuada, el recibo y suficiencia de la cual se reconoce por el presente, yo/nosotros hemos vendido, cedido y transferido todos los derechos y títulos a y de dicha invención y de dicha solicitud(es) en todos los países del mundo al CESIONARIO:

F. Hoffmann-La Roche AG

124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle (Switzerland)

La presente cesión es para, pero no se limita a los siguientes países:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazakhstán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Holanda, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República Popular China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Sur Africa, España, Suecia, Suiza, Taiwan, Turquía, Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, EE.UU., Venezuela.

En virtud de esta cesión dicho CESIONARIO tiene pleno derecho a solicitar y obtener en su propio nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios fines y cuenta PATENTE DE INVENCION en todo el mundo, especialmente en los países anteriormente mencionados, y por lo tanto a reivindicar el derecho de

prioridad de la primera solicitud registrada en el país (países) anteriormente mencionados de acuerdo con las convenciones internacionales.

Firmado en (ilegible), este día 15 de septiembre de 2.000

Por

(firma: ilegible)

Apollon Papadimitriou

Se requiere notaría

C l o m b i a

F. Hoffmann-La Roche

Caso 20619

Declaración

Yo, el suscrito notario público, por el presente declaro que la copia anexa llamada 'Cesión' es una copia fiel del documento original que me ha presentado

F. Hoffmann-La Roche AG

de Basilea, Suiza.

Basilea, Suiza, este 09-04-2001 (noveno día de abril de dos mil uno)

(firma: ilegible)

Leg. Prot. 2001 No. 112

Hay un sello.

Traducido, a mi mejor saber y entender, este día 22 de octubre de 2.002, en la ciudad de Santafé de Bogotá, por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 del 15 de agosto de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO
4

F. Hoffmann-La Roche
Case 20619

Colombia

Declaration

I, the undersigned notary public, herewith declare that the annexed copy entitled 'Assignment' is a true copy of the original document which has been presented to me by

F. Hoffmann-La Roche AG

of Basle, Switzerland.

Basel/Switzerland, this 09-04-2001 (ninth day of April two thousand and one)

Dr. P. Kuster
Notar

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterkirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel

Lag. Prot. 2001 No. 112

APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Schweiz (Suisse)

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von *P. Kuster*

3. in seiner Eigenschaft als *Notar*

4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des *Notars*

Besätigt

11. April 2001

5. in Basel (Sole)

6. am

7. durch die Staat. Kanzlei des Kantons Basel-Stadt

8. unter Nr. *2126915467*

9. Siegel/Stempel:

10. Unterschrift:

Heidi Fischer



URGENT: P/M 15/2000

126
Case 20619

15.09.2000
Assignment

124

I/WE, the undersigned

Apollon Papadimitriou, biologist, a German citizen
38a Bachstrasse
D-83673 Bichl, Germany

ASSIGNOR(S), herewith declare that I am/we are the sole/joint inventor(s) of the invention entitled:

New Pharmaceutical Composition

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

Country/countries : Europe
Filing date(s) : May 15, 2000
Filing number(s) : 00110355.5

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle (Switzerland)

The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefor the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Signed at
by

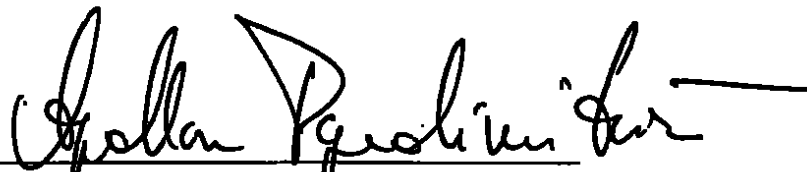
Peusberg

, this

15th

day of

September 2000


Apollon Papadimitriou

Notarization required

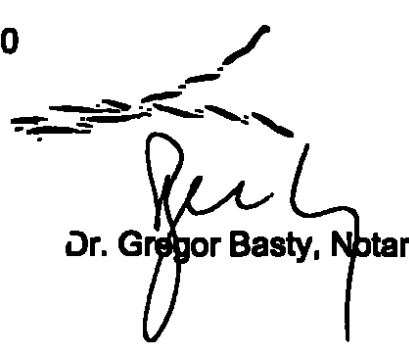
124
125

URNr. P 1168 12000.

Beglaubigt wird hiermit die Echtheit vorstehender,
vor mir vollzogener Unterschrift von

Herrn Apollon Papadimitriou, geboren am 23. September 1968,
wohnhaft 83673 Bichl, Bachstr. 38 a,
persönlich bekannt.

Penzberg, den 15.09.2000



Dr. Gregor Basty, Notar

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- Descripción de la invención ☒
- Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

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

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. ☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. ☐
- Representación gráfica del esquema de trazado ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecha: 12 NOV. 2002