



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

05-3891

21 EXPEDIENTE N°

54 TITULO 'POLIPEPTIDO T1249 PEGILADO '

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 14/16

71 SOLICITANTE F HOFFMANN-LA ROCHE AG

DOMICILIO BASILEA SUIZA

74 REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T P 53 215

22 BOGOTA,D C 1

GF
SS

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 05003091 00000000

Folios: 120

Fecha (999): 2005-01-19 16:13:34

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAR
Dependencia: 2820 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: 124 Grenzacherstrasse, CH-4070
Basilea, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: ALICIA LLOREDICA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá- Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 39.690.713 TP 53.215

④

**INVENTOR(ES)
(72)**

Nombre: BAILON, Pascal, Sebastian y WON, Chee-Youb.

Dirección: 21 Woodbine Road, Florham Park, New Jersey 07932 y 91 Belmont
Drive, Livingston, New Jersey 07039.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2003/007711

Fecha: 16/07/03

Publicación Internacional No. WO 2004/013185 A1

Fecha: 12/02/04

⑥

Título (54)

"POLIPEPTIDO T1249 PEGILADO"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 14/16

⑧

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

24/07/02

10/01/03

(31) Número de Solicitud

60/398,190

60/439,213

⑨

Comprobante de Pago No. 05-294

Fecha: Enero 3 de 2005

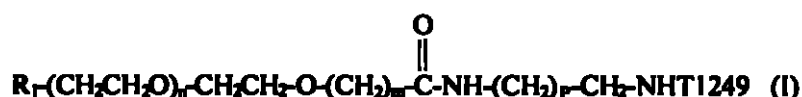
10

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 a HOFFMANN-LA ROCHE INC y documento de cesión de HOFFMANN-LA ROCHE INC a F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.
- ☐ 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 con su traducción, publicación con su traducción, capítulo reivindicatorio como fue originalmente presentado en fase internacional con su traducción, anexo explicativo de modificaciones a las reivindicaciones y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: LILIANA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800174089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 05 - 294
FECHA : ENERO 3 DE 2005

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05003091 00000000 Folios: 128
Fecha (AMD): 2005-01-19 16:13:34
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALLORED A Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	29723665	03/01/2005	4,460,000.00

C O N C E P T O

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50003-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	443,000.00
	TOTAL :	\$ 443,000.

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDADA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ 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 está 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.


ALICIA LLOREDADA RICAURTE

T.P. No. 53.215

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

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 8o., 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 ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, 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, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, 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 ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, 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.

Dado y firmado

The undersigned, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at 4070 Basel, Switzerland

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, 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 ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, 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 and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially, waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to comply with all other legal requirements; 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 in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, 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.

Given and signed this 17th day of August 2004.
F. Hoffmann-La Roche AG

Fridolin Klausner
Holder of procurator

Denise Strebel
Mandatory

5

NOTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

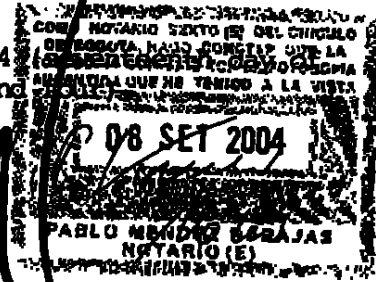
~~Suiza~~
~~Basilea~~ {ss
Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Suiza, legalmente constituida para un periodo de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Suiza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y 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 Basilea, con fecha y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

Switzerland
Basel {ss

On this 17th day of August , 2004 , personally Fridolin Klausner and Denise Strebel came both Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; 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 Suiza, ciudad de Basilea, under date of 19th day of June 1997 , and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004
two thousand and



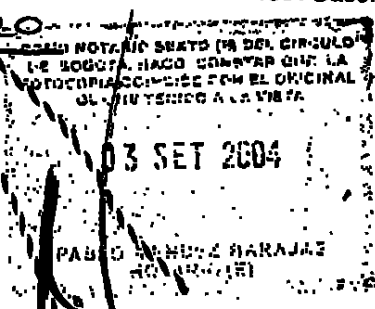
Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel

17.08.2004

2 Fr.

Dr. Peter Kuster

Allg. Procl. 14 Nr. 20



5

OFFICIAL AUTHENTICATION
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by *P. Kuch*

3. in his/her function as *Att. Notar*

4. and certified by the seal of the *Grande*

Certified **18. Aug. 2004**

5. in Basel (Stile)

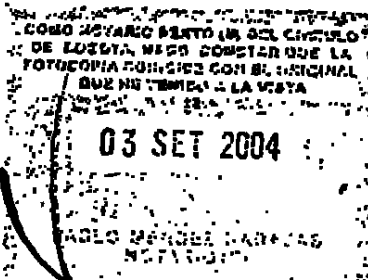
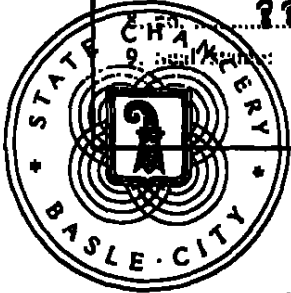
6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8835 / 13 926

9. and

10. Signature: *P. Kuch*



TRADUCCION OFICIAL No.

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

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

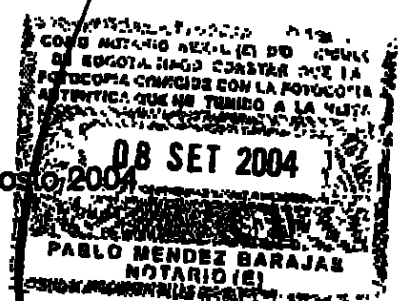
Cancillería de Estado

de la ciudad de Basel (Basilea)

10. Firma

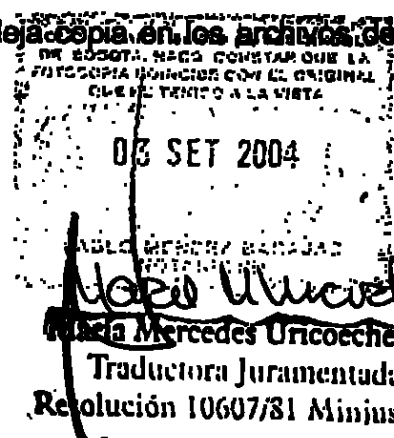
Fdo.: firma ilegible

Ruedi Eggs



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

Bogotá, 2 de septiembre 2004



Expediente No		05003891	No de Folio
Item		No de unidades	✓
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA	1	✓
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones: *ante final.*

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

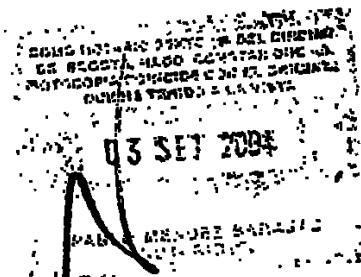
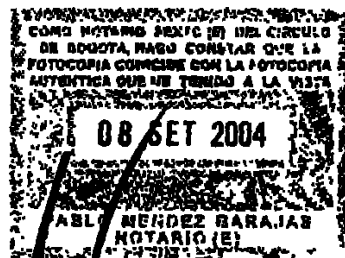
7064 SET -3 P 12: 12

JCS
Jefe de LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

758651

Pena Uncochea
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DESDEMPERA
LAS FUNCIONES INDICADAS



REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/07711

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO

IPC 7 C07K14/16 A61K38/16 A61P31/18

Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

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

IPC 7 C07K 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)

EPO-Internacional, WPI Dato, CHEM ABS Dato

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	US 6 348 568 B1 (ANWER MOHMED K Y COL) 19 de Febrero de 2002 (2002-02-19) citado en la solicitud ver compuestos No. 1520, 1522, 1526, 1528, 1529, 1531 y 1533 en la tabla 1 columna 53, línea 65 - columna 54, línea 38; ejemplo 7	1-16

☐ 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 particular

'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

23 de Diciembre de 2003

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

08/01/2004

Nombre y dirección de correo de la ISA
Oficina de Patentes Europea, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijewijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Fuhr, C

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/EP 03/07711

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 6348568 B1	19-02-2002	US 6258782 B1	10-07-2001
		US 6656906 B1	02-12-2003
		US 2003186874 A1	02-10-2003
		AU 766995 B2	30-10-2003
		AU 4194999 A	06-12-1999
		CA 2332338 A1	25-11-1999
		CN 1310626 T	29-08-2001
		EP 1079846 A1	07-03-2001
		HR 20000789 A1	30-06-2001
		HU 0101826 A2	28-09-2001
		JP 2002515449 T	28-05-2002
		NO 20005836 A	19-01-2001
		PL 344342 A1	05-11-2001
		TR 200100163 T2	21-06-2001
		WO 9959615 A1	25-11-1999
		US 6562787 B1	13-05-2003
		ZA 200006642 A	28-05-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/07711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/16 A61K38/16 A61P31/18

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 C07K 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)

EPO-Internal, WPI Data, 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	US 6 348 568 B1 (ANWER MOHMED K ET AL) 19 February 2002 (2002-02-19) cited in the application see compounds No. 1520, 1522, 1526, 1528, 1529, 1531 and 1533 in table 1 column 53, line 65 -column 54, line 38; example 7	1-16

☐ 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.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 December 2003

Date of mailing of the international search report

08/01/2004

Name and mailing address of the 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) 340-3018

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/07711

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6348568	B1	19-02-2002	US 6258782 B1 10-07-2001
			US 6656906 B1 02-12-2003
			US 2003186874 A1 02-10-2003
			AU 766995 B2 30-10-2003
			AU 4194999 A 06-12-1999
			CA 2332338 A1 25-11-1999
			CN 1310626 T 29-08-2001
			EP 1079846 A1 07-03-2001
			HR 20000789 A1 30-06-2001
			HU 0101826 A2 28-09-2001
			JP 2002515449 T 28-05-2002
			NO 20005836 A 19-01-2001
			PL 344342 A1 05-11-2001
			TR 200100163 T2 21-06-2001
			WO 9959615 A1 25-11-1999
			US 6562787 B1 13-05-2003
			ZA 200006642 A 28-05-2001

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

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
12 de Febrero de 2004 (12.02.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/013165 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07K 14/16,
A61K 38/16, A61P 31/18

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2003/007711

(22) Fecha de Registro Internacional: 16 de Julio de 2003
(16.07.2003)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
60/398,190 24 de Julio de 2002 (24.07.2002) US
60/439,213 10 de Enero de 2003 (10.01.2003) US

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

(72) Inventores: BAILON, Pascal, Sebastian; 21 Woodbine
Road, Florham Park, NJ 07932 (US). WON,
Chee-Youb; 91 Belmont Drive, Livingston, NJ 07039
(US).

(74) Agente: SCHAGER, Frank; Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel (CH).

(81) Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, 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, MZ, NO, NZ, OM,
PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, 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 republicada de nuevo en el caso de
recibo de modificaciones

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

(54) Título: POLIPEPTIDO T1249 PEGILADO

(57) Resumen: Se proporcionan compuestos del polipéptido T1249 pegilado. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen compuestos del polipéptido T1249 pegilado, y procesos de fabricación. Además se proporciona el uso de la composición farmacéutica que comprende, en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula (I), para la preparación de un medicamento para la inhibición de la infección por VIH.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 February 2004 (12.02.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/013165 A1

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/16,
A61K 38/16, A61P 31/18

(21) International Application Number:
PCT/EP2003/007711

(22) International Filing Date: 16 July 2003 (16.07.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/398,190 24 July 2002 (24.07.2002) US
60/439,213 10 January 2003 (10.01.2003) US

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

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

(72) Inventors: BAILON, Pascal, Sebastian; 21 Woodbine
Road, Florham Park, NJ 07932 (US). WON, Chee-Youh;
91 Belmont Drive, Livingston, NJ 07039 (US).

(74) Agent: SCHAGER, Frank; Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel (CH).

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: PEGYLATED T1249 POLYPEPTIDE

(57) Abstract: Pegylated T1249 polypeptide compounds are provided. Also provided are pharmaceutical compositions containing pegylated T1249 polypeptide compounds, and processes of making. Further provided is the use of pharmaceutical composition comprising, in admixture with a pharmaceutically acceptable excipient, a compound of formula (I), for the preparation of a medicament for the inhibition of HIV infection.

WO 2004/013165 A1

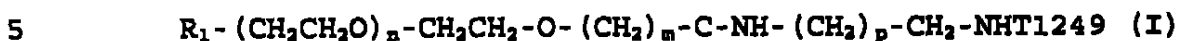
**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL JUNTO CON SU TRADUCCION**

Reivindicaciones:

1. Un compuesto de fórmula (I),

O

||



en donde

R_1 es un grupo de cabeza

m es de 1 a 17,

n es de 10 a 1.000,

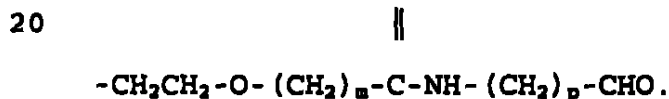
10 p es de 1 a 3, y

NHT1249 es un polipéptido T1249 unido covalentemente a través de su grupo α -amino terminal.

2. Un compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde R_1 se sustituye por el grupo consistente en halógeno, epóxido, maleimida, disulfuro ortopiridilo, tosilato, isocianato, hidrato de hidrazina, haluro cianúrico, N-succinimidiloxi, sulfo-N-succinimidiloxi, 1-benzotriazoliloxi, 1-imidazoliloxi, p-nitrofeniloxi, y
- 15

O

||



3. Un compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde p es 3.

4. Un compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde p es 3, R_1 es metoxi, m es 1, y n es de 100 a 750.
- 25

5. Un compuesto de fórmula:



en donde n es de 10 a 1.000 y NHT1249 es un Polipéptido

AB

16
T1249 unido covalentemente a través de su grupo α -amino terminal.

6. Un compuesto de acuerdo a la reivindicación 5, en donde n es aproximadamente 450.

5 7. Una composición farmacéutica que comprende, en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula:

O

||

10 $R_1 - (CH_2CH_2O)_n - CH_2CH_2 - O - (CH_2)_m - C - NH - (CH_2)_p - CH_2 - NHT1249$ (I)

en donde

R_1 es un grupo de cabeza,

m es de 1 a 17,

n es de 10 a 1.000,

15 p es de 1 a 3, y

NHT1249 es un polipéptido T1249 unido covalentemente a través de su grupo α -amino terminal.

8. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 7, en donde p es 3, R_1 es metoxi, m es 1, y n es
20 de 100 a 750.

9. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 7 en la forma de un polvo liofilizado.

10. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 7 en forma de una solución o suspensión inyectable.
25

11. El uso de una composición farmacéutica que contiene, en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula I, para la preparación de un

medicamento para la inhibición de una infección por VIH:

O

||



5 en donde

R_1 es un grupo de cabeza,

m es de 1 a 17,

n es de 10 a 1.000,

p es de 1 a 3, y

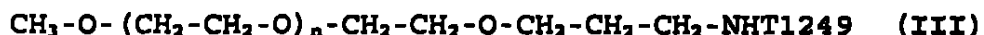
10 NHT1249 es un polipéptido T1249 unido covalentemente a través de su grupo α -amino terminal.

12. Un uso de acuerdo a la reivindicación 11, en donde p es 3, R_1 es metoxi, m es 1, y n es de 100 a 750.

13. Un uso de acuerdo a la reivindicación 11, en donde
15 la composición farmacéutica se inyecta intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutáneamente, intravenosamente, o por infusión continua.

14. Un uso de acuerdo a la reivindicación 11, en donde la composición farmacéutica se administra en una cantidad
20 de alrededor de 50 mg a aproximadamente 300 mg por administración.

15. El uso de una composición farmacéutica que comprende, en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula III, para la preparación
25 de un medicamento para la inhibición de infección por VIH:



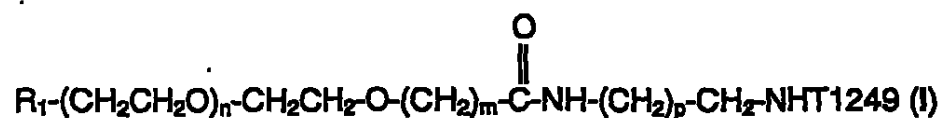
en donde n es de 10 a 1.000 y NHT1249 es un Polipéptido T1249 unido covalentemente a través de su grupo α -amino

terminal.

16. Un uso de acuerdo a la reivindicación 15, en d nde
la composición farmacéutica se administra en una cantidad
de alrededor de 300 mg a 1500 mg por semana en una dosis
5 individual.

Claims:

1. A compound of formula (I),



wherein

R_1 is a capping group,

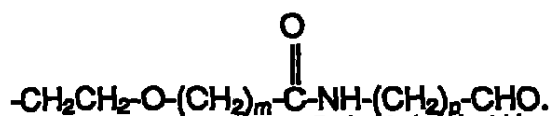
m is from 1 to 17,

n is from 10 to 1,000,

p is from 1 to 3, and

NHT1249 is a T1249 polypeptide covalently bonded through its terminal α -amino group.

2. A compound according to claim 1, wherein R_1 is selected from the group consisting of halogen, epoxide, maleimide, orthopyridyl disulfide, tosylate, isocyanate, hydrazine hydrate, cyanuric halide, N-succinimidyloxy, sulfo-N-succinimidyloxy, 1-benzotriazolyloxy, 1-imidazolyloxy, p-nitrophenyloxy, and

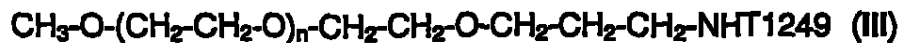


3. A compound according to claim 1, wherein p is 3.

4. A compound according to claim 1, wherein p is 3, R_1 is methoxy, m is 1, and n is from 100 to 750.

20

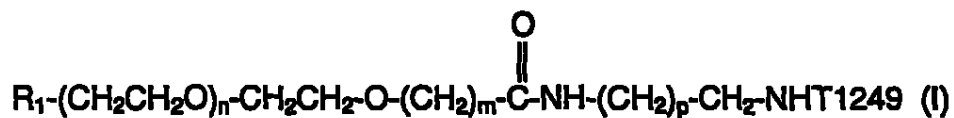
5. A compound of formula:



wherein n is from 10 to 1,000 and NHT1249 is a T1249 polypeptide covalently bonded through its terminal α -amino group.

6. A compound according to claim 5, wherein n is approximately 450.

7. A pharmaceutical composition comprising, in admixture with a pharmaceutically acceptable excipient, a compound of formula:



wherein

R_1 is a capping group,

m is from 1 to 17,

n is from 10 to 1,000,

p is from 1 to 3, and

NHT1249 is a T1249 polypeptide covalently bonded through its terminal α -amino group.

8. A pharmaceutical composition according to claim 7, wherein p is 3, R_1 is methoxy, m is 1, and n is from 100 to 750.

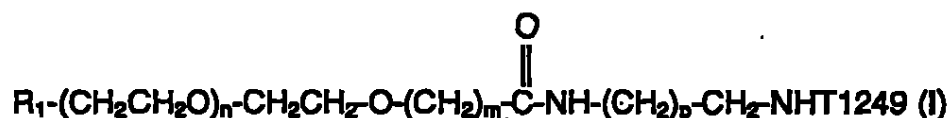
23

21

9. A pharmaceutical composition according to claim 7 in the form of a lyophilized powder.

10. A pharmaceutical composition according to claim 7 in the form of an injectable solution or suspension.

11. Use of pharmaceutical composition comprising, in admixture with a pharmaceutically acceptable excipient, a compound of formula I, for the preparation of a medicament for the inhibition of HIV infection:



wherein

R_1 is a capping group,

m is from 1 to 17,

n is from 10 to 1,000,

p is from 1 to 3, and

NHT1249 is a T1249 polypeptide covalently bonded through its terminal α -amino group.

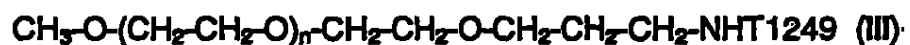
12. A use according to claim 11, wherein p is 3, R_1 is methoxy, m is 1, and n is from 100 to 750.

24

13. A use according to claim 11, wherein the pharmaceutical composition is injected intraperitoneally, intramuscularly, subcutaneously, intravenously, or by continuous infusion.

14. A use according to claim 11, wherein the pharmaceutical composition is administered in an amount of from about 50 mg to about 300 mg per administration.

15. Use of a pharmaceutical composition comprising, in admixture with a pharmaceutically acceptable excipient, a compound of formula III, for the preparation of a medicament for the inhibition of HIV infection:



wherein n is from 10 to 1,000 and NHT1249 is a T1249 polypeptide covalently bonded through its terminal α -amino group.

16. A use according to claim 15, wherein the pharmaceutical composition is administered in an amount of from about 300 mg to about 1500 mg per week in a single dose.

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.

24

POLYPEPTIDO T1249 PEGILADO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Se proporcionan compuestos del polipéptido T1249 pegilado. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen compuestos del polipéptido T1249 pegilado, y procesos de fabricación. Además se proporciona el uso de la composición farmacéutica que comprende, en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula (I), para la preparación de un medicamento para la inhibición de la infección por VIH.

5

POLYPEPTIDO T1249 PEGILADO

La presente invención se refiere a compuestos polipéptidos T1249 pegilados, y a métodos relacionados de uso y elaboración de tales compuestos, así como en farmacéutica
5 composiciones y métodos terapéuticos de tratamiento.

Algunos virus, especialmente VIH, debe realizar un complejo proceso llamado fusión para poder entrar en la célula huésped y reproducirse. Durante la fusión, la membrana externa del virus se fusiona con la membrana de la
10 célula huésped. En el caso de VIH, la membrana externa del virus VIH se fusiona con la membrana de la célula T CD4+ durante la reproducción.

T1249 es un miembro de una nueva clase de agentes antivirales que inhiben la fusión virus/membrana. En el caso
15 de VIH, este proporciona dos efectos saludables: la reproducción de VIH se bloquea y no sucede la muerte consecuente de las células T CD4+.

La resistencia viral a los fármacos anti-VIH aprobados actualmente es un tema significativo en la gestión clínica
20 actual del VIH. Muchos pacientes que comienzan la combinación del tratamiento antiretroviral con los medicamentos aprobados actualmente desarrollaran resistencia a uno o más de estos agentes a medida que pase el tiempo. La investigación sugiere, no obstante, que T1249 puede no estar afecta-
25 do por cualquiera de las resistencias a las clases de anti-retrovirales aprobados actualmente. (Datos presentados en el 5th International Workshop on Drug Resistencia and Treatment Strategies en Scottsdale, Arizona, 4-8 Junio de .

28

26

2001).

Un análisis del rango de dosis de T1249 en un ensayo clínico sugiere que la dosis diaria de T1249, y sin ninguna experiencia previa a tratamiento antiretroviral, incluyendo
5 mutaciones a todas las clases de fármacos aprobados de VIH, es la única variable que está asociada con la reducción de carga viral entre los pacientes en tratamiento. Experimentos adicionales muestran que la actividad en vitro de T1249 no está afectada por las mutaciones asociadas con la resistencia a los inhibidores de la transcriptasa reversa e inhibidores de la proteasa.
10

Como muchos agentes polipéptidos terapéuticos, T1249 se administra generalmente por inyección. Los protocolos terapéuticos actuales a menudo implican más de un inyección
15 diaria.

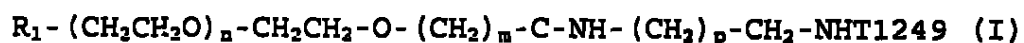
Será, por tanto, ventajoso proporcionar polipéptidos T1249 y composiciones farmacéuticas que posean características farmacocinéticas y actuaciones mejoradas. Será particularmente ventajoso proporcionar dosis terapéuticas de
20 T1249 menores, administraciones menos frecuentes, y/o duración extendida de la acción.

Estos y otros objetos de la presente invención están descritos en mayor detalle a continuación.

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula:
25

O

||



29

27

en donde

R_1 es un grupo de cabeza,

m es de 1 a 17,

n es de 10 a 1,000,

5 p es de 1 a 3, y

NHT1249 es un polipéptido T1249 covalentemente unido a través de su grupo α -amino terminal.

En una realización del compuesto de la presente invención R_1 es metoxi, m es 1, n es de 100 a 750, y p es 3.

10 También se proporciona una composición farmacéutica que comprende, en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula (I), en donde R_1 , m, n, p, y NHT1249 son como se ha definido antes.

- En una realización de la composición farmacéutica de la presente invención R_1 es metoxi, m es 1, n es de 100 a 15 750, y p es 3.

La presente invención proporciona además un método para inhibir la infección por VIH que comprende la administración de una composición farmacéutica que comprende, en 20 una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula (I), en donde R_1 , m, n, p, y NHT1249 son como se ha definido antes. Si la presente invención se refiere a un "método para inhibir la infección por VIH que comprende un compuesto", quiere decir "uso de un compuesto 25 para la preparación de un medicamento para la inhibición de VIH".

En una realización del método para inhibir la infección por VIH, R_1 es metoxi, m es 1, n es de 100 a 750, y p

30

28

es 3.

También se proporciona un método para elaborar un polipéptido T1249 pegilado que comprende la reacción de un polipéptido T1249 con un aldehído de fórmula:

5

O

||



en donde R_1 , m , n , n , y p son como se ha definido antes; para producir un compuesto de fórmula (I), en donde la molécula aldehído de polietilenglicol está unido al grupo amino N-terminal del polipéptido T1249. Si la presente invención se refiere a un "método para realizar" quiere decir un "proceso para realizar".

La Figura 1 muestra una comparación de digestiones enzimáticas de PEG-modificados y T1249 sin modificar. Se muestra la digestión con endoproteinasa Lis-C y subsiguiente separación con HPLC en fase reversa.

La Figura 2 muestra una espectrometría de masas con ionización por desorción de láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI TOF) de la fracción PEG-34 recogida por HPLC (Figura 1). El espectro se obtuvo de forma lineal con ácido trans-3-indoleacrílico como la matriz.

La Figura 3 muestra la secuenciación (Edman) N-terminal de la fracción PEG-34 recogida por HPLC (Figura 1).

La Figura 4 muestra el perfil de concentración-tiempo de mPEG_{20k}-CMAB-T1249 en ratas tras una administración de dosis simple subcutánea.

2a

La Figura 5 muestra el perfil de concentración-tiempo de T1249 en ratas tras una administración de dosis simple subcutánea.

La Figura 6 muestra el efecto de la dosis de T1249 y mPEG_{20k}-CMAB-T1249 sobre la carga viral de VIH-1 en ratones SCID.

Tal como se menciona antes, T1249 es un polipéptido "inhibidor de fusión". T1249 consiste en 39 aminoácidos. La secuencia del polipéptido T1249 es:

10 WQEWKITALLEQAQIQQEKNEIQLKLDKWASLWFW [ID. DE SEC. NO:1]

El aminoácido N-terminal (o amino terminal) es triptófano (W). El aminoácido C-terminal (o carboxilo terminal) es fenilalanina (F).

Tal como se describe en la Tabla 1 de la Patente Estadounidense No. 6.348.568 (ID. DE SEC. No. 1071), que se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad, la secuencia del polipéptido T1249 puede bloquearse/derivarse a uno o ambos de su amino y carboxilo terminal. Tal como se describe en la Patente Estadounidense No. 6.348.568, el triptófano amino terminal es bloqueado/derivado con un grupo acilo y la fenilalanina carboxilo terminal es bloqueada/derivada con un grupo amino (este último como resultado de una conversión del -COOH → -CONH₂).

Tal como se usa aquí, "T1249" deberá entenderse que indica el [ID. DE SEC. NO:1], opcionalmente bloqueado en la fenilalanina C-terminal con un grupo amino. En otras palabras, cuando se hace referencia a "T1249," la fenilalanina C-terminal puede ser tanto -COOH o -CONH₂.

30

La presente invención proporciona compuestos T1249 pegilados de la siguiente fórmula:

O

||



en donde

R_1 es un grupo de cabeza,

m es de 1 a 17,

n es de 10 a 1,000,

10 p es de 1 a 3, y

NHT1249 es un polipéptido T1249 covalentemente unido a través de su grupo α -amino terminal.

Tal como se usa aquí el "grupo de cabeza" R_1 es cualquier grupo químico adecuado, dependiendo bajo preferencia, es generalmente no reactivo o generalmente reactivo con otras porciones químicas. En el compuesto anterior el polietilenglicol está unido covalentemente al grupo α -amino de T1249. El grupo de cabeza R_1 se selecciona para permitir o prevenir bifuncionalidad, por ejemplo, unión covalente a una segunda porción química de interés.

En el caso de que el grupo de cabeza es generalmente no reactivo con otras porciones químicas, R_1 es relativamente inerte y por lo tanto no se unirá covalentemente con otra porción química. Grupos de cabeza R_1 adecuados generalmente no reactivos incluyen: hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, cicloalquilo inferior, alquenilo inferior, cicloalquenilo inferior, arilo, y heteroarilo.

Tal como se usa aquí, el término "alquilo inferior",

indica un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada, que contiene de 1 a 7, preferiblemente de 1 a 4, átomos de carbono, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo y similares. El "alquilo inferior" está opcionalmente sustituido con uno o más grupos independientemente seleccionados de halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, cicloalquilo inferior, alquenilo inferior, cicloalquenilo inferior, arilo, y heteroarilo.

10 El término "alcoxi inferior" indica un grupo alquilo inferior como se ha definido antes que está unido a través de un átomo de oxígeno, siendo ejemplos de grupos alcoxi inferior metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, n-pentoxi y similares. El "alcoxi inferior" está opcionalmente sustituido con uno o más grupos independientemente seleccionados de halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, cicloalquilo inferior, alquenilo inferior, cicloalquenilo inferior, arilo, y heteroarilo.

20 El término "cicloalquilo inferior" indica un grupo cicloalquilo que contiene de 3 a 7, preferiblemente de 4 a 6, átomos de carbono, es decir, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo. El "cicloalquilo inferior" está opcionalmente sustituido con uno o más grupos independientemente seleccionados de halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, cicloalquilo inferior, alquenilo inferior, cicloalquenilo inferior, arilo, y heteroarilo.

25 Tal como se usa aquí, el término "alquenilo inferior" indica un grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada,

32

que contiene de 2 a 7, preferiblemente de 2 a 5, átomos de carbono, por ejemplo, etenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo y similares. El "alquenilo inferior" está opcionalmente sustituido con uno o más grupos independientemente seleccionados de halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, cicloalquilo inferior, alquenilo inferior, cicloalquenilo inferior, arilo, y heteroarilo.

El término "cicloalquenilo inferior" indica un grupo cicloalquenilo, que contiene de 4 a 7 átomos de carbono, por ejemplo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo y similares. El "cicloalquenilo inferior" está opcionalmente sustituido con uno o más grupos independientemente seleccionados de halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, cicloalquilo inferior, alquenilo inferior, cicloalquenilo inferior, arilo, y heteroarilo.

El término "arilo" indica un grupo fenilo o naftilo que no está sustituido o opcionalmente mono- o multi-sustituido por halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, trifluorometilo, hidroxilo, ácido carboxílico, éster carboxílico, nitro, amino, o fenilo, particularmente por halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, trifluorometilo, hidroxilo, nitro, amino y fenilo.

El término "heteroarilo" indica un grupo heteroaromático de 5- o 6- miembros que contiene uno o más hetero átomos seleccionados de N, S, y O y que puede estar benzofusionado y/o sustituido de la misma manera como el "arilo" definido anteriormente.

Grupos de cabeza R₁ generalmente no reactivos preferi-

35

dos incluye metoxi, hidroxí, o benciloxi. Un grupo de cabeza R_1 especialmente preferido es metoxi. Cuando R_1 es metoxi los compuestos polipéptidos pegilados a veces vienen referidos aquí como compuestos en parte, como "mPEG", en donde
5 la "m" indica metoxi.

Si el grupo de cabeza R_1 es generalmente reactivo con otras porciones químicas, entonces R_1 es un grupo funcional capaz de reaccionar con algún otro grupo funcional, tal como una amina y/o sulfhidrilo en un péptido y/o proteína.
10 En tal caso, R_1 puede ser un grupo funcional que es capaz de reaccionar fácilmente con grupos electrofílicos o nucleofílicos sobre otras moléculas, al contrario que aquellos grupos que requieren fuertes catalizadores o condiciones de reacción altamente impracticables para poder reaccionar. Si
15 R_1 es relativamente reactivo, el aldehído de polietilenglicol puede unirse covalentemente con otra porción química.

Ejemplos de grupos adecuados de cabeza R_1 generalmente reactivos incluye: halógeno, epóxido, maleimida, disulfuro de ortopiridilo, tosilato, isocianato, hidrazina hidrato,
20 haluro cianúrico, N-succinimidiloxi, sulfo-N-succinimidiloxi, 1-benzotriazoliloxi, 1-imidazoliloxi, p-nitrofeniloxi, y

O

||

25 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{CHO}$.

El término "halógeno" indica flúor, cloro, bromo, o yodo. Un grupo de cabeza R_1 generalmente reactivo preferido es

34

O

||

-CH₂CH₂-O-(CH₂)_m-C-NH-(CH₂)_p-CHO. Cuando este grupo de cabeza R₁ está presente, deberá notarse que en los compuestos de la presente invención la primera m, n, y/o p puede ser la misma o diferente de la segunda m, n, y/o p en la fórmula. Es preferible, no obstante, que ambas m posean el mismo valor, ambas n posean el mismo valor, y ambas p posean el mismo valor.

En la presente invención, m es de 1 a 17. En una realización preferida, m es de 1 a 14. Más preferiblemente m es de 1 a 7, y aún más preferiblemente, m es de 1 a 4. Más preferido, m es 1.

En la presente invención, n es de 10 a 1,000. En una realización preferida de la presente invención n es de 20 a 1,000. Preferiblemente, n es de 50 a 1,000, aún más preferiblemente n es de 75 a 1,000. Lo más preferible, que n sea de 100 a 750.

En la presente invención, p es de 1 a 3. Preferiblemente, p es 3.

En realizaciones preferidas, p es 3, R₁ es metoxi, m es 1, y n es de 100 a 750; o p es 2, R₁ es metoxi, m es 1, y n es de 100 a 750; o p es 1, R₁ es metoxi, m es 1, y n es de 100 a 750.

La presente invención proporciona realizaciones de fórmula (I), en donde R₁ es metoxi, m es 1, n es de 100 a 750, p es 3, y NHT1249 es un polipéptido T1249 covalentemente unido a través de su grupo α-amino terminal.

37

35

Tal como se ha resaltado antes, los compuestos T1249 pegilados de la invención unen covalentemente el grupo α -amino de T1249 a un derivado de polietilenglicol con una estructura particular. Estos compuestos pegilados pueden elaborarse de cualquier forma deseada, pero generalmente se preparan reaccionando T1249 con derivados de polietilenglicol preparados de forma separada. Por ejemplo, el polipéptido T1249 puede estar pegilado bloqueando todos los residuos de lisina y reaccionando este T1249 bloqueado con un derivado de polietilenglicol. Los residuos de lisina bloqueados del polipéptido T1249 son entonces desbloqueados, resultando en unos T1249 terminalmente pegilados.

El polipéptido T1249 puede prepararse de cualquier forma adecuada. Por ejemplo, los compuestos pueden sintetizarse utilizando las técnicas clásicas de síntesis en fase sólida de Merrifield que involucra un método en fase sólida empleando Boc-aminoácido (Chem. Soc., 85, 2149, 1963), utilizando procedimientos manuales o automáticos, utilizando un método en fase sólida empleando Fmoc -aminoácido (Sheppard, R.C. et al., J. Chem. Soc. Chem. Comm., pp. 165-166 (1985)), utilizando un modelo Advanced Chemtech 200 disponible de Advanced Chemtech., Louisville, Ky., utilizando un Millipore 9050+ disponible de Millipore, Bedford Mass, u otra instrumentación disponible.

T1249 puede producirse por incorporación de compuestos codificantes de cDNA de la invención en vectores plasmídicos funcionales de DNA víricos o circulares. Los vectores o plásmidos pueden utilizarse para transfectar o transformar

38

microorganismos seleccionados. Los microorganismos transformados o transfectados pueden cultivarse bajo condiciones que conducen a la expresión de secuencias de DNA portadas por el vector y puede lograrse el aislamiento de los péptidos deseados del medio de cultivo. (Ver, por ejemplo Patente de los Estados Unidos No. 5.955.422, que se incorpora íntegramente aquí por referencia como si se describiera enteramente.)

T1249 también puede prepararse mediante tecnología de DNA estándar utilizando técnicas que son bien conocidas en el campo. Por ejemplo, los procedimientos resaltados en Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) o Ausubel et al., Current Protocols en Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1995), ambos incorporados aquí por referencia.

Un método particular para elaborar T1249 se describe en La Patente Estadounidense 6.258.7872 y la Patente Estadounidense 6.348.568, ambas incorporados aquí por referencia.

Tras la escisión y la desprotección, T1249 puede purificarse mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, intercambio iónico, cromatografía por gel filtración y/o un sistema de columna en fase reversa/HPLC puede utilizarse para purificar T1249 de longitud completa de los fragmentos del mismo. En el caso cuando un precursor de T1249 se prepara por primera vez, con un grupo bloqueante/protector unido al N-terminal (por ejemplo, grupo acilo) y/o el C-

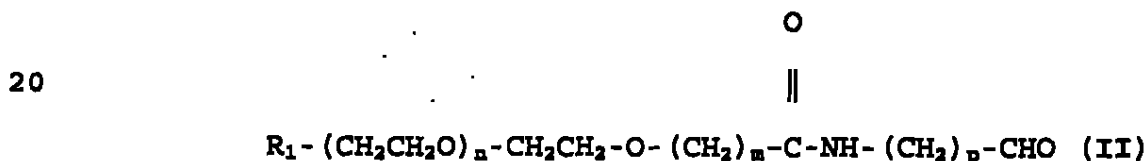
37

terminal (por ejemplo, grupo amino), uno o ambos de estos grupos puede eliminarse usando técnicas conocidas.

La secuencia aminoacídica de T1249 puede confirmarse e identificarse utilizando análisis estándar de aminoácidos así como degradación Edman manual y automática y determinación de cada aminoácido. El análisis por HPLC y espectrometría de masas puede también utilizarse para verificar la producción de T1249.

Los compuestos aldehído de polietilenglicol que pueden reaccionar con T1249 pueden también realizarse de cualquier forma deseada. Es preferible, no obstante, que el polietilenglicol puede realizarse de acuerdo con los métodos descritos en la Solicitud de Patente Estadounidense No. Serie 60/398,196, depositada el 24 de Julio de 2002, titulada "Polyethylene glycol Aldehydes," que se incorpora aquí por referencia íntegramente.

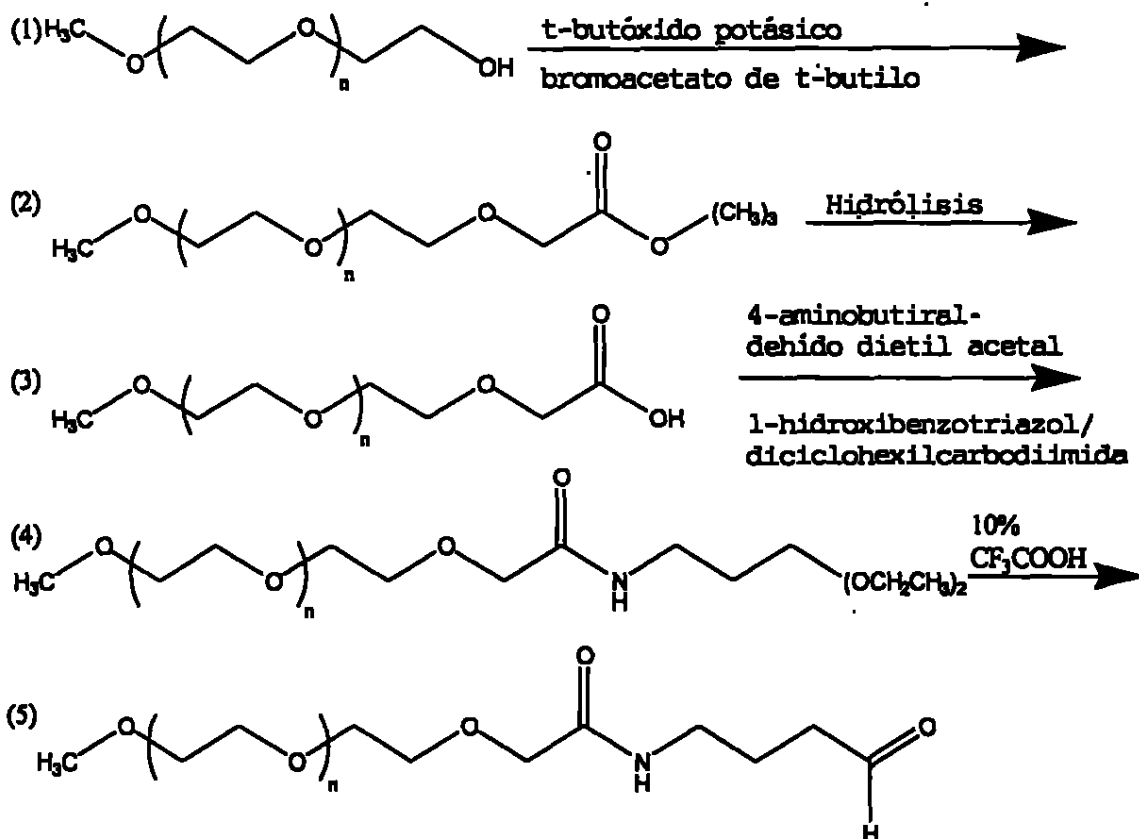
Generalmente, un aldehído de polietilenglicol de fórmula:



en donde R₁, m, n, y p son como se ha definido antes se utiliza para pegilar el T1249. El aldehído de polietilenglicol utiliza para pegilar el T1249 puede prepararse mediante cualquier método adecuado. Un aldehído de polietilenglicol preferido se prepara como sigue:

40

Esquema de Reacción para mPEG_{10k}-butanoaldehído



Aldehídos de polietilenglicol de varios tamaños (por ejemplo variando los valores de n) pueden prepararse siguiendo el esquema de reacción general anterior.

Los compuestos pegilados T1249 de la presente invención pueden prepararse mediante cualquier método adecuado. También proporcionado por la invención, no obstante, es un método para pegar un polipéptido T1249 que comprende reaccionar un polipéptido T1249, NHT1249, con un aldehído de polietilenglicol de fórmula:

10



en donde R_1 , m , n , n , y p son como se ha definido antes;

para produce un compuesto de fórmula:

$R_1 - (CH_2CH_2O)_n - CH_2CH_2 - O - (CH_2)_m - CO - NH - (CH_2)_p - CH_2 - NHT1249$ (I)
en donde la molécula de aldehído de polietilenglicol está
unida al grupo amino N-terminal del polipéptido T1249.

El T1249 pegilado se prepara añadiendo T1249 y el re-
5 activo PEG en un rango de relación molar de 1:1 a 1:100. El
T1249 posee un grupo α -amino libre (cualquier grupo acilo
es eliminado) y cualquiera de un grupo carboxi libre o un
grupo carboxi amino-protegido, como se ha discutido antes.
La mezcla de reacción se coloca en un tampón borato o fos-
10 fato a temperatura ambiente o 4 grados Celsius a alrededor
de 0,5 a 24 horas en un rango de pH de 5,5 a 7,4. La rela-
ción molar del reactivo PEG a péptido/proteínas está entre
1:1 a 100:1. La concentración de péptido/proteínas está
entre 1 a 10 mg/mL. La concentración de tampón está normal-
15 mente entre 10 a 500 mM.

El T1249 pegilado se purifica cogiendo la mezcla de
reacción de T1249 pegilado y diluyéndola con un tampón de
equilibrio (Tris 20 mM, pH 7,5). La mezcla resultante se
aplica entonces sobre una columna de Q-Sefarosa. Tras apli-
20 car la mezcla sobre la columna QA, esta se lava con el tam-
pón de equilibrio eluido con NaCl 75 M; eluido con NaCl 200
mM; eluido con NaCl 1M; y regenerado con HOAC 1M + NaCl 1M
y NaOH 0,5.

Mediante la utilización de HPLC en fase reversa, es
25 posible separar fácilmente y aislar el producto monopegila-
do N-terminal, de otros intermediarios en la mezcla. Por
ejemplo, en un cromatograma de T-1249 pegilados, muchos
picos pueden formarse, cada uno con diferentes tiempos de

40

retención. El primer pico puede representar péptido no re-
activo, en los 10,7 minutos, y el segundo pico puede repre-
sentar péptido monopegilado, a 17,6 minutos, seguido por
péptido di-pegilado, a 19 minutos. Cada producto recogido
5 se confirmó por espectrometría de masas con ionización por
desorción de láser asistida por matriz en tiempo de vuelo
(MALDI-TOF).

En realizaciones preferidas de los polipéptidos T1249
pegilados de la presente invención, p es 3, R₁ es metilo, m
10 es 1, y n es de 100 a 750; o p es 2, R₁ es metoxi, m es 1, y
n es de 100 a 750; o p es 1, R₁ es metoxi, m es 1, y n es de
100 a 750.

También se proporciona un polipéptido T1249 pegilado
de la siguiente formula:

15
$$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NHT1249 (III)}$$

en donde n es de 10 a 1,000 y NHT1249 es un polipéptido
T1249 covalentemente unido a través de su grupo α-amino
terminal. En una realización n es aproximadamente 225, por
ejemplo, 227. En otra realización, n es aproximadamente
20 450.

Este polipéptido T1249 pegilado puede elaborarse me-
diante cualquier forma deseada, preferiblemente, se elabora
mediante el método descrito en el Ejemplo 7.

Las composiciones farmacéuticas de la invención com-
25 prenden, en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente
aceptable, un compuesto de fórmula (I), en donde R₁, m, n,
p, y NHT1249 son como se ha definido antes

Las composiciones farmacéuticas de la presente inven-

43

ción comprende polipéptidos T1249 pegilados, o las sales de los mismos, pueden elaborarse mediante cualquier forma deseada, por ejemplo, mediante métodos de mezclado convencional, encapsulación, disolución, granulación, emulsificación, atrapamiento, o procesos de liofilización. Estas preparaciones farmacéuticas pueden formularse con excipientes y vehículos inorgánicos u orgánicos terapéuticamente inertes. Excipientes adecuados para la inyección incluye agua, alcoholes, polioles, glicerina, aceites vegetales, fosfolípidos y surfactantes.

Las preparaciones farmacéuticas pueden también contener agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, agentes emulsificantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, agentes recubridores, o antioxidantes. También pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas, incluyendo ingredientes activos adicionales.

Las formulaciones adecuadas para la administración por inyección (incluyendo inyección intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intravenosa, o por infusión continua) puede presentarse convenientemente en forma de dosis unitarias y puede prepararse mediante técnicas farmacéuticas convencionales. Tales técnicas incluyen el paso de asociar los polipéptidos T1249 pegilados y el vehículo(s) o excipiente(s) farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan mediante la asociación uniforme e íntima de los polipéptidos pegilados T1249 con vehículos líquidos. Formu-

laciones adecuadas para la administración mediante inyección incluye: soluciones de inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener anti-oxidantes, tampones, bacterioestáticos y solutos que mantienen la formulación isotónica con la sangre del recipiente utilizado; y suspensiones estériles acuosa y no acuosa que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en dosis unitarias o contenedores multi-dosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en condiciones heladas y secas (liofilizadas) necesitando sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de usar.

Formulaciones de dosis unitarias preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria, dosis sub-diaria, dosis semanal, dosis sub-semanal, como se ha descrito aquí anteriormente, o una fracción apropiada de las mismas, del ingrediente administrado.

Preferiblemente, el polipéptido pegilado T1249 está en forma de dosis unitaria. Tal como se usa aquí, "forma de dosis unitaria," significa que una cantidad apropiada de una dosis simple del polipéptido pegilado T1249 está en forma premedida y/o preempaquetada. Esto permite la preparación conveniente del polipéptido pegilado T1249 para la administración, e incluso permite la auto-administración del paciente. La cantidad de dosis unitarias dependerá claramente de la cantidad de polipéptido pegilado T1249 a liberar, y la frecuencia de dosis.

45

43

El polipéptido pegilado T1249 puede también proporcionarse en forma de un polvo liofilizado en una cantidad de dosis unitaria, adecuada para la reconstitución con un excipiente farmacéuticamente aceptable justo antes del tiempo
5 de administración.

Una composición farmacéutica particular de la invención comprende, en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula (I), en donde R_1 es metoxi, m es 1, n es de 100 a 750, y p es 3.

10 Otra composición farmacéutica de la invención es una farmacéutica composición que comprende, en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula (III), en donde n es de 10 a 1,000 y NHT1249 es un polipéptido T1249 covalentemente unido a través de su grupo
15 α -amino terminal. En una realización n es aproximadamente 225, por ejemplo 227. En otra realización, n es aproximadamente 450.

La presente invención proporciona además métodos para inhibir infección por VIH que comprende la administración a
20 un paciente una composición farmacéutica que comprende, en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula (I), en donde R_1 , m, n, p, y NHT1249 son como se ha definido antes.

Actualmente los polipéptidos pegilados T1249 son generalmente administrados en forma de polipéptidos (no pegilados) T1249. Pueden realizarse modificaciones, no obstante, para sacar partido de las propiedades farmacocinéticas mejoradas de los polipéptidos pegilados T1249.

:

46

En el método de inhibición por VIH de la invención, la composición farmacéutica puede administrarse de cualquier forma adecuada y ruta. En un método preferido el polipéptido pegilado T1249 es administrado en forma de solución o
5 suspensión inyectable. Preferiblemente, la solución o suspensión inyectable es administrada por inyección subcutánea o intravenosamente.

En otro método preferido, el polipéptido pegilado T1249 es administrado a través de un sistema de liberación
10 transdérmico, por ejemplo, un parche transdérmico.

En el método de inhibición de VIH de la invención, la composición farmacéutica puede administrarse en cualquier dosis adecuada y horario. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en cualquier forma, y
15 a través de cualquier ruta, deseada. Generalmente, no obstante, los polipéptidos pegilados T1249 de la presente invención son administrados parenteralmente, por ejemplo, en forma de soluciones inyectables.

La determinación de una cantidad terapéuticamente
20 efectiva está dentro del conocimiento en la materia, y la cantidad terapéuticamente efectiva o dosis de un polipéptido pegilado T1249 de acuerdo con esta invención puede variar y será ajustada a los requerimientos individuales en cada caso particular. En general, en el caso de administra-
25 ción por inyección a humanos adultos pesando aproximadamente 70 Kg, una dosis diaria de aproximadamente 50 mg a alrededor de 300 mg, preferiblemente alrededor de 50 mg a alrededor de 200 mg, será apropiado, aunque el límite superior

47

45

puede excederse cuando se indique. La dosis puede administrarse como dosis simple, en dosis divididas, o como infusión continua.

La composición farmacéutica puede administrarse en cualquier horario de dosis adecuado. Preferiblemente, la composición farmacéutica es administrada una vez al día, dos veces al día, una vez cada dos días, una vez a la semana, o dos veces a la semana. Más preferiblemente, la composición farmacéutica es administrada una vez a la semana.

Preferiblemente, la composición farmacéutica es administrada una vez a la semana en la dosis de alrededor de 300 mg a alrededor de 1.500 mg. Más preferiblemente, la composición farmacéutica es administrada una vez a la semana en la dosis de alrededor de 400 mg a alrededor de 1,000 mg. Aún más preferiblemente, la composición farmacéutica es administrada una vez a la semana en la dosis de alrededor de 100 mg a alrededor de 200 mg.

La presente invención también proporciona un método para inhibir la infección por VIH que comprende la administración de una composición farmacéutica que comprende, la mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula (I), en donde R_1 es metoxi, m es 1, n es de 100 a 750, y p es 3.

También se contempla dentro del alcance de la invención un método para inhibir la infección por VIH que comprende la administración de una composición farmacéutica que comprende, la mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula (III), en donde n es

de 10 a 1,000 y NHT1249 es un polipéptido T1249 covalentemente unido a través de su grupo α -amino terminal. En una realización n es aproximadamente 225, por ejemplo, 227. En otra realización, n es aproximadamente 450.

5 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor los compuestos, composiciones, y métodos de la presente invención. Estos ejemplos son solo ilustrativos y no intentan limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

10

Ejemplo 1

Preparación del mPEG_{10k}-butanoaldehído

mPEG de peso molecular 10,000 (30,0 g, 3 mmol) en 240 mL de tolueno se secó azeotrópicamente por reflujo durante 2 horas, seguido por la eliminación de 120 mL de tolueno.

15 La solución resultante se enfrió a temperatura ambiente entonces se añadieron terc-butoxido potásico (0,68 g, 6 mmol) en 20 mL de terc-butanol absoluto y 20 mL de tolueno a la solución PEG. La mezcla resultante se agitó durante dos horas a temperatura ambiente bajo argón. Bromoacetato

20 de terc-butilo (1,00 mL, 6,75 mmol) se añadió a la reacción mediante jeringa y la reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente bajo argón. La solución de reacción se condensó entonces mediante evaporación rotatoria. El residuo se precipitó por adición a dietil éter. El producto

25 mPEG_{10k} t-butil carboximetil éster precipitado se eliminó por filtración y se secó al vacío. Rendimiento: 28 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,40 ppm (t, 9H, $-CH_3$); 3,21 ppm (s, $-OCH_3$); 3,50 ppm (s, $-O-CH_2CH_2-O-$); 3,96 ppm (s, 2H, $-O-CH_2-COO-$).

47

mPEG_{10k} t-butil carboximetil éster (26,5 g) se disolvió entonces en 350 mL de 1N hidróxido sódico y la solución se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El pH de la mezcla se ajustó a 2,5 por adición de 6 N ácido clorhídrico, y la mezcla se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró, concentró y precipitó en dietil éter. El producto ácido m-PEG_{10k}-carboximetilo se recogió por filtración y se secó al vacío. Rendimiento: 24 g. RMN (d_6 -DMSO): 3,21 ppm (s, -OCH₃); 3,5 ppm (s, -O-CH₂CH₂-O-); 3,99 ppm (s, 2H, -O-CH₂-COOH).

Ácido m-PEG_{10k}-carboximetilo (6g, 0,6 mmol) se disolvió entonces en diclorometano anhidro (30 mL) seguido por la adición de 4-aminobutilraldehído dietilacetal (140 mL, 0,9 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (80 mg, 0,6 mmol), y diciclohexilcarbodiimida (160 mg, 0,78 mmol). La mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente bajo argón. La mezcla de reacción se filtró, concentró, y precipitó con una mezcla de 2-propanol y dietil éter (1:1). El producto mPEG_{10k}-butanoacetal se secó al vacío toda la noche. Rendimiento: 5,4 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,07-1,12 ppm (t, 6H, (-O-CH₂-CH₃)₂); 1,46 ppm (m, 4H, -NHCH₂CH₂CH₂-CH-); 3,08-3,11 ppm (q, 2H, -NHCH₂CH₂CH₂-CH-); 3,21 ppm (s, -OCH₃); 3,5 ppm (s, -O-CH₂CH₂-O-); 3,85 ppm (s, 2H, -O-CH₂-CO-NH-); 4,44 ppm (t, 1H, -NHCH₂CH₂CH₂-CH-); 7,67 ppm (-NH-).

mPEG_{10k}-butanoacetal (2 g, 0,2 mmol) se disolvió entonces en 20 mL de 80 % CF₃COOH y la solución se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El pH de la mezcla se ajustó a 6,0 por adición de una solución 1 N de NaOH, y se añadió

50

48

cloruro sódico (10% peso) y luego el pH de la solución se ajustó a 7,0 por adición de NaOH 1 N. La mezcla se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró, concentró y precipitó en dietil éter. El
5 producto mPEG_{10k}-butanoaldehído se recogió por filtración y se secó al vacío. Rendimiento: 1,7 g. RMN (d₆-DMSO): 3,21 ppm (s, -OCH₃); 3,5 ppm (s, -O-CH₂CH₂-O-); 3,85 ppm (s, 2H, -O-CH₂-CO-NH-); 7,67 ppm (-NH-); 9,66 ppm (-CHO-).

Ejemplo 2

10 Pegilación of T1249 con mPEG_{10k}-butanoaldehído

Butanoaldehído de PEG 10kDa (mPEG_{10k}-CMAB) preparado de acuerdo al Ejemplo 1 se añadió a 20 mg de T1249 (pureza 93,7 %) en 1,0 mL de tampón (50 mM fosfato potásico pH 6,5) en una relación molar de 5 moles de reactivo por un mol de
15 T1249. El polipéptido T1249 se desaciló en el α-amino terminal, pero se protegió en el carboxilo terminal por -NH₂. Se añadió a la mezcla de reacción 10% (v/v) de solución 0,5 M de cianoborohidruro sódico en agua y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. T-1249 pegilado se purificó
20 de la mezcla de reacción utilizando cromatografía de intercambio iónico (QA). Un paso de gradientes con concentraciones de sal incrementadas de 65 mM a 1 M NaCl en 20 mM Tris, pH 7,5 se utilizó para separar el T1249 pegilado y T1249 sin modificar.

25

Ejemplo 3

Preparación of mPEG_{20k}-butanoaldehído

mPEG de peso molecular 20.000 (60,0 g, 3 mmol) en 800 mL of tolueno se secó azeotrópicamente mediante reflujo

51

49

durante 2 horas, seguido por la eliminación de 200 mL de tolueno. La solución resultante se enfrió a temperatura ambiente entonces se añadió terc-butóxido potásico (0,68 g, 6 mmol) en 20 mL de terc-butanol absoluto y 20 mL de tolueno a la solución de PEG. La mezcla resultante se agitó durante dos horas a temperatura ambiente bajo argón. Bromoacetato de terc-butilo (1,00 mL, 6,75 mmol) se añadió a la reacción a través de una jeringa y la reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente bajo argón. La solución de reacción se condensó entonces por evaporación rotatoria. El residuo se precipitó por adición a dietil éter. El producto precipitado mPEG_{20k} t-butil carboximetil éster se eliminó por filtración y se secó al vacío. Rendimiento: 56 g. RMN (d₆-DMSO): 1,42 ppm (t, 9H, -CH₃); 3,21 ppm (s, -OCH₃); 3,50 ppm (s, -O-CH₂CH₂-O-); 3,98 ppm (s, 2H, -O-CH₂-COO-).

mPEG_{20k} t-butil carboximethyl éster (28 g) se disolvió entonces en 750 mL de hidróxido sódico 1N y la solución se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El pH de la mezcla se ajustó a 2,5 por adición de ácido clorhídrico 6 N, y la mezcla se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró, concentró y precipitó en dietil éter. El producto ácido m-PEG_{20k}-carboximetilo se recogió por filtración y se secó al vacío. Rendimiento: 25 g. RMN (d₆-DMSO): 3,21 ppm (s, -OCH₃); 3,5 ppm (s, -O-CH₂CH₂-O-); 4,01 ppm (s, 2H, -O-CH₂-COOH).

ácido m-PEG_{20k}-carboximetilo (20 g, 1,0 mmol) se disolvió entonces en diclorometano anhidro (100 mL) seguido por

50

la adición de 4-aminobutilraldehído dietilacetal (0,77 mL, 4 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (270 mg, 2,0 mmol), y diclohexilcarbodiimida (620 mg, 3,0 mmol). La mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente bajo argón. La mezcla de reacción se filtró, concentró, y precipitó con mezcla de 2-propanol y dietil éter (1:1). El producto mPEG_{20k}-butanoacetal se secó al vacío toda la noche. Rendimiento: 8,6 g. RMN (d_6 -DMSO): 1,07-1,12 ppm (t, 6H, (-O-CH₂-CH₃)₂); 1,46 ppm (m, 4H, -NHCH₂CH₂CH₂-CH-); 3,08-3,11 ppm (q, 2H, -NHCH₂CH₂CH₂-CH-); 3,21 ppm (s, -OCH₃); 3,5 ppm (s, -O-CH₂CH₂-O-); 3,85 ppm (s, 2H, -O-CH₂-CO-NH-); 4,44 ppm (t, 1H, -NHCH₂CH₂CH₂-CH-); 7,67 ppm (-NH-).

mPEG_{20k}-butanoacetal (14,7 g, 0,73 mmol) se disolvió entonces en 200 mL de 10 % CF₃COOH y la solución se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El pH de la mezcla se ajustó a 6,0 por adición de una solución NaOH 1N, y cloruro sódico (10% peso) se añadió y luego el pH de la solución se ajustó a 7,0 por adición de NaOH 1 N. La mezcla se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró, concentró y precipitó en dietil éter. El producto mPEG_{20k}-butanoaldehído se recogió por filtración y se secó al vacío. Rendimiento: 13,1 g. RMN (d_6 -DMSO): 3,21 ppm (s, -OCH₃); 3,5 ppm (s, -O-CH₂CH₂-O-); 3,85 ppm (s, 2H, -O-CH₂-CO-NH-); 7,67 ppm (-NH-); 9,65 ppm (-CHO-).

25

Ejemplo 4

Pegilación of T1249 con mPEG_{20k}-butanoaldehído

Butanoaldehído de PEG 20kDa preparado de acuerdo al Ejemplo 3 se añadió a 20mg de T1249 (pureza 93,7%) que se

53

51

disolvió en 0,4 mL de borato 50 mM, tampón pH 9,5 y luego se diluyó 10-veces con fosfato potásico 100 mM pH 6,5 en una relación molar de 10 moles de reactivo por un mol de T1249. El polipéptido T1249 se desaciló en el α -amino terminal, pero se protegió en el carboxilo terminal mediante -NH₂. A la mezcla de reacción se añadió 0,4 mL (10%, v/v) de una solución de cianoboro-hidruro sódico 0,5 M (NaBH₃CN) en agua y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. la mezcla de reacción se diluyó entonces 10 veces con tampón de equilibrio (20 mM Tris, pH 7,5) y filtrado a través de un filtro de 0,45 μ m. El T1249 pegilado se purificó de la mezcla de reacción usando cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sefarosa). Un paso de gradientes con incrementos de la concentración de sales de 75 mM, 200 mM a 1 M de NaCl en el tampón de equilibrio se utilizó para separar los T1249 di-pegilados, mono-pegilados y no modificados entre ellos, respectivamente. El experimento anterior se repitió comenzando con 70 mg de T1249, 1:10 exceso molar de PEG_{20k}-butanoaldehído y purificado como se ha descrito antes. Los conjuntos de T1249 mono-pegilados (200mM NaCl eluido) de ambos experimentos se combinaron, concentraron a aproximadamente 2 mg/mL y diafiltraron en el tampón de almacenaje (tampón PBS, pH 7.3) y almacenados a -20°C hasta su uso. Una alícuota del material se utilizó para probar la actividad antiviral.

Ejemplo 5

% Mono-, % Di-, y % Tri-Pegilados T1249 con mPEG_{20k}-butanoaldehído

54

52

El % de Mono-, el % de di-, y el % de T1249 tri-pegilados con mPEG_{20k}-butanoaldehído se determinó a través de una serie de experimentos en donde la relación molar de T1249:PEG, pH de la solución de reacción, y el tiempo de reacción fueron variados como se puede ver en las Tablas 1, 2, y 3. El propósito de estos experimentos fue optimizar los parámetros de pegilación.

Por ejemplo, en la Tabla 1, butanoaldehído de PEG de 20kDa (mPEG_{20k}-CMAB) preparado de acuerdo al Ejemplo 3 se añadió a 5 mg de T1249 (pureza 93,7 %) en 50 mM de fosfato potásico pH 6,5. El polipéptido T1249 se desaciló en el α -amino terminal, pero se protegió en el carboxilo terminal por -NH₂. La relación molar del reactivo PEG a T1249 fue de 1:1, 1:2, y 1:5. A la mezcla de reacción se le añadió un 10% (v/v) de solución de cianoborohidruro sódico 0,5 M en agua. Una alícuota se eliminó en el intervalo de tiempo predeterminado de 2, 4, 6, y 24 horas a temperatura ambiente.

Tabla 1

20 Tampón Fosfato potásico pH 6,5

T1249: Relación Molar PEG	Tiempo	% mono- pegilados	% di- pegilados	% tri- pegilados	% T1249
1:1	2h	14	0,1	0	84
1:1	4h	18	0,19	0	81
1:1	6h	21	0,21	0	78
1:1	24h	25	0,91	0	72
1:2	2h	29	0,69	0	68

55

3

T1249: Relación Molar PEG	Tiempo	% mono- pegilados	% di- pegilados	% tri- pegilados	% T1249
1:2	4h	34	1,14	0	63
1:2	6h	37	1,55	0	59
1:2	24h	39	3,16	0	54
1:5	2h	53	5	0	39
1:5	4h	59	9	0	26
1:5	6h	61	12	0	20
1:5	24h	55	23	0	15

Para la Tabla 2, butanoaldehído de PEG 20kDa (mPEG_{20k}-CMAB) preparado de acuerdo al Ejemplo 3 se añadió a 5 mg de T1249 (pureza 93,7 %) en 50 mM de fosfato potásico pH 6,0 en una relación molar de diez moles de reactivo PEG por un 5 mol de T1249. El polipéptido T1249 se desaciló en el α -amino terminal, pero se protegió en el carboxilo terminal por -NH₂. A la mezcla de reacción se le añadió un 10% (v/v) de solución de cianoborohidruro sódico 0,5 M en agua. Una alícuota se eliminó en el momento intervalo de tiempo pre-
10 determinado de 2, 4, 6, y 24 horas a temperatura ambiente.

Tabla 2

Tampón Fosfato Potásico pH 6,0

T1249: Relación Molar PEG	Tiempo	% mono- pegilados	% di- pegilados	% tri- pegilados	% T1249
1:10	2h	60	11	0	22
1:10	4h	61	23	0	10
1:10	6h	59	24	5	7

56

1:10	24h	38	38	18	4
------	-----	----	----	----	---

Para la Tabla 3, butanoaldehído de PEG de (mPEG_{20k}-CMAB) preparado de acuerdo al Ejemplo 3 se añadió a 5 mg de T1249 (pureza 93,7%) en 50 mM de fosfato potásico pH 5,5 en una relación molar de diez moles de reactivo PEG por un mol de T1249. El polipéptido T1249 se desaciló en el α -amino terminal, pero se protegió en el carboxilo terminal mediante -NH₂. A la mezcla de reacción se añadió una solución al 10% (v/v) de 0,5 M de cianoborohidruro sódico en agua. Una alícuota se eliminó en el momento intervalo de tiempo pre-

5

10 determinado de 2, 4, 6, y 24 horas a temperatura ambiente.

Tabla 3

Tampón Fosfato potásico pH 5,5

T1249: Relación Molar PEG	Tiempo	% mono- pegilados	% di- pegilados	% tri- pegilados	% T1249
1:10	2h	47	7	0	41
1:10	4h	58	16	0	20
1:10	6h	60	22	3	10
1:10	24h	32	38	25	3

El porcentaje de T1249 mono-, di-, y tri-pegilados, y T1249 no reactivos libres se obtuvo mediante HPLC de fase

15 reversa para cada mezcla de reacción. Los datos ejemplificados en las Tablas 1, 2, y 3 anteriores ilustra cuando las cantidades óptimas de T1249 mono-pegilado se alcanza variando las condiciones de la relación molar de T1249:PEG, pH, y tiempo de reacción. Por ejemplo, en la Tabla 1 un

20 óptimo de mono-pegilación de 61% se muestra en una relación

molar de T1249:PEG de 1:5 y en un tiempo de 6h. en Tabla 2, un óptimo de mono-pegilación de 61% se muestra en una relación molar de T1249:PEG de 1:10 y en un tiempo de 4h. En la Tabla 3, un óptimo de mono-pegilación de 60% se muestra en una relación molar de T1249:PEG de 1:10 y en un tiempo de 6h.

Ejemplo 6

Determinación de los lugares de Pegilación

Para evaluar el lugar de unión de PEG a T1249, una serie de experimentos se realizaron. Los resultados demostraron que >95% de la modificación está localizada en el residuo triptófano N-terminal. Lugares de modificación adicionales pueden aparecer en menor medida (< 5%), pero su identidad exacta no se ha establecido de forma clara.

Para poder determinar el lugar de modificación de PEG, se digirió una muestra con endoproteinasa Lis-C y los péptidos se separaron mediante HPLC de fase reversa. Los picos de péptidos individuales se analizaron además con nano espray ESI (ionización por electrospray) espectrometría de masas, MALDI TOF (espectrometría de masas con ionización por desorción de láser asistida por matriz en tiempo de vuelo) y secuenciación de N-terminal (Edman). Estos procedimientos se resumen a continuación.

Muestras de T1249 butanoaldehído mono-pegilados de 20K (20k mPEG-CMAB-T1249) preparado de acuerdo al Ejemplo 4 y T1249 (α -amino terminal libre; carboxilo terminal protegido por $-NH_2$) se digirió proteolíticamente con endoproteinasa Lis-C durante 2 horas a temperatura ambiente con una mues-

56

tra en una relación de enzima de 10/1 (p/p). La reacción se paró por adición de acético a una concentración final de 2% (v/v).

La separación de péptidos proteolíticos se realizó mediante HPLC de fase reversa con un sistema HPLC HP1100 equipado con una columna de fase reversa Phenomenex Luna (C-18, 3 μ , 150 x 200 mm). El sistema de solvente consiste de agua, acetonitrilo y ácido trifluoroacético (0,05%). El gradiente fue de 5% al 64% de solvente orgánico en 50 minutos en una tasa de flujo de 0,2 mL/min. Los picos que contienen péptidos se recogieron para un análisis más profundo.

Todas las muestras recogidas se analizaron entonces con espectrometría de masas nano espray ESI en un instrumento atrapa iones Finnigan LCQ. Los péptidos individuales se identificaron basándose en sus pesos moleculares experimentales. La fracción que contiene péptidos PEG se analizó también con espectrometría de masas MALDI TOF en un instrumento Bruker Reflex. Las matrices utilizadas fueron ácido trans-3-indoleacrílico o ácido alfa-4-hdroxicinámico.

La fracción que contiene péptidos PEG se sometió entonces al secuenciador automático N-terminal (Edman) en un instrumento de precisión Perkin Elmer (ABI).

Los resultados del análisis de HPLC de fase reversa de los fragmentos proteolíticos de T1249 pegilado se muestran en la Figura 1. La Figura 1 muestra el rastro de UV obtenido del análisis de HPLC de fase reversa de las dos muestras. El péptido N-terminal observado en el control T1249

SA

5X

(Pico HT-20 en la Figura 1B) está casi totalmente ausente en el PEG T1249 modificado (Figura 1A). En su lugar apareció un nuevo pico (Pico PEG-34 en la Figura 1A). Contiene el/los péptido(s) PEG modificados.

5 Los resultados de la espectroscopia de masas obtenidos del análisis de las fracciones individuales de HPLC se resumen en la Tabla 4. Todos los pesos moleculares experimentales de los péptidos no modificados fueron compatibles con los calculados.

10 Tabla 4: Resultados analíticos obtenidos de las fracciones recogidas por HPLC (ver también Figura 1).

Pico de HPLC	PM (calc.) ² Da	PM (exp.) ³ Da	Secuencia N-terminal ⁴	Péptido	ID Sec
PEG-17	922,4	922,4	n.D.	NEIELQK	ID Sec:2
PEG-22	1611,9	1611,7	n.D.	ITALLEQAQIQQEK	ID Sec:3
PEG-34	n.D.	23082,6	XQEWEQK	PEG-WQEWEQK	ID Sec:4
PEG-37	1122,5	1122,4	n.D.	WASLWEWF-NH2	ID Sec:5
HT-17	922,4	922,4	n.D.	NEIELQK	ID Sec:2
HT-20	1032,5	1032,4	n.D.	WQEWEQK	ID Sec:4
HT-22	1611,9	1611,7	n.D.	ITALLEQAQIQQEK	ID Sec:3
HT-37	1122,5	1122,4	n.D.	WASLWEWF-NH2	ID Sec:5

¹ver también la figura 1; ² masa exacta calculada en Da; ³ masa medida en Da, nano sprai ESI MS de péptidos no modificados y EM MALDI TOF de péptidos modificados PEG; ⁴ secuencia automática Edman; n.D. = no disponible, x = no

60

58

identificado; ⁵ basado en la compatibilidad de PM y/o secuenciación Edman. La secuencia de aminoácido de la muestra de T1249 sin modificar es:

WQWEQKITALLEQAQIQQEKNEIELQKLDKWASLWEWF-NH₂.

5 El espectro de masas MALDI TOF obtenido del intacto T1249 PEG modificado se muestra en la figura 2A. El peso molecular medido fue de 26758 Da. Nótese la presencia de algunos péptidos no modificados. El origen de estos no se conoce actualmente, aunque puede estar originado potencialmente por las mediciones del espectrómetro en sí. El espectro de masas MALDI TOF obtenido de la fracción PEG-34 (figura 1) se muestra en la figura 2B. El peso molecular medido fue de 23083 Da. El peso molecular así como la aparición del espectro de masas identifica esta fracción de HPLC PEG-10 34 como la que contiene el/los péptido(s) PEG modificados. La presencia de PEG en esta fracción de HPLC puede también mostrarse por espectrometría de masas por nano espray ESI (datos no mostrados).

Los resultados de la secuenciación automática del N-terminal (Edman) se muestran en la figura 3. La mayor secuencia observada fue el péptido N-terminal endo Lis-C xQWEQK. Con excepción del primer residuo de aminoácido, todos los otros aminoácidos se recuperaron en cantidades sustanciales. Esencialmente no pudo recuperarse triptófano en la primera posición de aminoácidos (Figura 3, ciclo 3). Los rastros de UV HPLC, el espectro de masas MALDI TOF así como los resultados de la secuenciación N-terminal s identifica el triptófano N-terminal como el mayor lugar de mo-25

dificación PEG.

Los resultados anteriores son consistentes con la presencia de una unión entre el aldehído de polietilenglicol y el triptófano N-terminal de T1249. Aunque una unión directamente a la cadena lateral del triptófano no puede ser excluida enteramente, los resultados de la secuenciación N-terminal parece contradecir la presencia de una porción "bloqueante" PEG en el grupo amino N-terminal.

Ejemplo 7

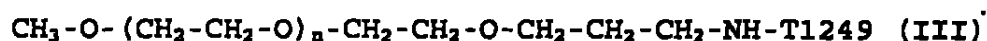
10 Pegilación de T1249 con mPEG_{10k}-propionaldehído

Se utiliza un propionaldehído de PEG de 10kDa, con la siguiente estructura.



200 mg of mPEG10k-propionaldehído se añadió a 20 mg del T1249 (pureza 93,7 %) en 1,0 mL de tampón (50 mM fosfato potásico pH 6,5) en a relación molar de 5 moles de reactivo por un mol de T1249. El polipéptido T1249 se desaciló en el α-amino terminal, pero se protegió en el carboxilo terminal con -NH₂.

20 A la mezcla de reacción se añadió una solución al 10% (v/v) de cianoborohidruro sódico 0,5 M en agua y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. El T1249 pegilado se purificó de la mezcla de reacción utilizando cromatografía de intercambio iónico (QA). La estructura del T1249 pegilado es la siguiente:



Un gradiente lineal con incremento en la concentración de sales de 65 mM a 1 M de NaCl en 20 mM de Tris, pH 7,5

60

se utilizó para separar el T1249 pegilado y T1249 no modificado. El porcentaje de T1249 mono-pegilado y T1249 sin reaccionar libre se obtuvo entonces por HPLC de fase reversa y se determinó que era del 31,7%.

5

Ejemplo 8

Ensayos Antivirales cMAGI/MAGI

Estos ensayos indican la reducción del título de virus infecciosos utilizando el indicador de líneas celulares MAGI (Activación Multinuclear de un Indicador de Galactosidasa) o el derivado CCR5-que expresa cMAGI. La línea celular MAGI deriva de las células parentales HeLa por introducción de genes para CD4 y un marcador b-gal dirigido al LTR de VIH-1 con un vector amfotrópico de retrovirus (Kimp-ton J, Emerman M, J Virol 66:2232-9, 1992). La línea celular cMAGI deriva de la línea celular MAGI por la introducción del gen CCR5 utilizando el vector amfotrópico retroviral, PA317 (Chackerian B, Long EM, Luciw PA, Overbaugh J, J Virol 71:3932-9, 1997). Las células cMAGI soportan la replicación de aislados NSI primarios (R5) y virus de laboratorio X4 adaptados, mientras que las células MAGI soportan la replicación de sólo los virus X4. Ambas líneas celulares explotan la capacidad de VIH-1 para transactivar la expresión de un gen marcador b-galactosidasa dirigido por HIV-LTR. El marcador b-gal ha sido modificado para localizar en el núcleo y puede detectarse con el sustrato X-gal como una tinción nuclear intensa al cabo de unos días de la infección. El número de núcleos teñidos puede interpretarse así como el número de viriones infectivos en el inóculo probado

63

61

si ha habido sólo una ronda de infección antes de la tinción.

Un inhibidor de la infección y de la fusión célula-célula, por ejemplo, T1249 (Wild C, Greenwell T, Matthews T, AIDS Res Hum Retroviruses 9:1051-3, 1993), se añadió 24 horas post-infección para permitir una lectura que confidencialmente representa una ronda sencilla de infección. Las células infectadas se enumeraron utilizando un visualizador CCD y ambos aislados primario y de laboratorio adaptado mostraron una relación lineal entre la entrada de virus y el número de células infectadas visualizado por el visualizador. En los ensayos MAGI y cMAGI un 50% de la reducción en el título infectivo ($V_n/V_0 = 0,5$) es significativo y proporciona el primer valor de corte para evaluar la actividad antiviral. Un 90% de la reducción en el título infectivo (V_n/V_0) es utilizado como un valor de corte adicional para evaluar la actividad antiviral.

Cada dilución de compuesto prueba se ensayó por duplicado contra un inóculo de virus ajustado para proporcionar aproximadamente 1500-2000 células infectadas /pocillo de una placa de 48 micropocillos. El compuesto prueba se añadió a las células cMAGI o células MAGI, seguido por el inóculo de virus, y 24 horas después, se añadió un inhibidor de la infección y de la fusión célula-célula (Wild C, Greenwell T, Matthews T, AIDS Res Hum Retroviruses 9:1051-3, 1993) para prevenir rondas secundarias de infección y diseminación célula-célula del virus. Las células se cultivaron durante 2 días más, se fijaron y se tiñeron con sus-

64

62

trato X-gal para detectar células infectadas. El número de células infectadas para cada control y dilución de compuesto prueba se determinó con el visualizador CCD. La IC50 se define como la dilución de un compuesto prueba que supone el 50% de reducción en el título infectivo del virus. La IC90 se define como la dilución que supone el 90% de reducción en el título infectivo.

Ejemplo 9

IC50/IC90 para T1249 Pegilado

Los resultados de IC 50 e IC 90 para T1249 y T1249 pegilados con mPEG_{20k}-butanoaldehído (Ejemplo 4), aquí como "mPEG_{20k}-CMAB-T1249," se muestra en la Tabla 5 a continuación. Los valores de IC₅₀ e IC₉₀ se determinaron de acuerdo con el Ejemplo 8.

Péptido	IC50 (µg/mL)	IC90 (µg/mL)
T1249	0,003	0,023
mPEG _{20k} -CMAB-T1249	0,041 (lote 1)	0,206 (lote 1)
	0,170 (lote 2)	0,835 (lote 2)

Tabla 5. resultados de IC 50 y IC 90.

Se observó una reducción (IC50, 13,7 veces e IC90, 9 veces para el lote 1) de la actividad anti-viral *in vitro* con mPEG_{20k}-CMAB-T1249 comparado respecto a la molécula parental T1249. No obstante, esta pérdida de actividad *in vitro* no es predictiva de la actividad biológica *in vivo* tal como se muestra en los resultados del Ejemplo 12 (Ver, Figura 6).

65

Ejemplo 10

Farmacocinéticas de T1249 Pegilado con mPEG_{20k}-
propionaldehído

Diseño del Estudio

5 9 ratas Wistar macho (Laboratorios Charles River, Wil-
mington, DE) (n=3/tiempo) recibieron una dosis subcutánea
sencilla de T1249 pegilado con mPEG_{20k}-propionaldehído
(Ejemplo 4).

El mPEG_{20k}-CMAB-T1249 se suspendió en agua y se tituló
10 con NaOH para llevarlo a pH 6,8. La suspensión de mPEG_{20k}-
CMAB-T1249 se solubilizó entonces en un volumen mínimo de
tampón carbonato sódico y diluido con tampón PBS a un pH de
7,3 - 7,4. La cantidad de PEG-T1249 empleada fue suficiente
para proporcionar una concentración de 150 mg mPEG_{20k}-CMAB-
15 T1249 por mL en la formulación final. Las ratas se dosifi-
caron con 8 mg de ingrediente activo/kg peso corporal.

Tras la administración de dosis, alrededor de 1 mL de
sangre se recogió del seno retro-orbital en cada punto de
tiempo. Los tiempos fueron 0,5, 1, 3, 6, 8, 16, 24, 32, 48,
20 72, y 96 horas tras la administración de dosis. Todas las
muestras de sangre se mantuvieron a temperatura ambiente
durante 30 minutos y el suero se separó con centrifugación
fría.

Método Bioanalítico

25 Todas las muestras de sangre se separaron en una co-
lumna C18 de HPLC de fase reversa usando un gradiente li-
neal consistente en acetato de amonio 0,05 M y acetonitri-
lo. La absorbancia se monitorizó a 280 nm. Las concentra-

64

ciones se extrapolaron de una representación (área bajo la curva v. [mPEG_{20k}-CMAB-T1249]) usando extractos de suero de mPEG_{20k}-CMAB-T1249 como estándar de calibración.

Los parámetros farmacocinéticos descritos derivaron de las concentraciones de perfiles de sueros reunidos de mPEG_{20k}-CMAB-T1249, su metabolito, y la combinación de los dos, usando análisis no compartimental a través de WinNonlin, versión 3,3 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA), un paquete de programas comercial de cinéticas.

10 Resultados

La Fig. 4 muestra el perfil de tiempo-concentración profile de mPEG_{20k}-CMAB-T1249 en ratas tras una dosis de administración subcutánea simple. A las 0,5 horas de tiempo no se detectaron niveles de mPEG_{20k}-CMAB-T1249 o metabolito, indicando un proceso de absorción lenta desde el sitio de inyección. Para el metabolito, la primera concentración detectable se encontró a las 6 horas tras la dosis, que representa una lenta formación de metabolito. Las menores concentraciones de suero de mPEG_{20k}-CMAB-T1249 y su metabolito se detectaron a las 48 y 72 horas tras la dosis, respectivamente.

Se muestran Cl/ F Sistémico y V_d/F, AUC (0-48 horas o 0-72 horas), C_{max}, T_{max}, y vida media en la Tabla 6, debajo.

67

65

Parámetro (unidad)	mPEG _{20k} -CMAB-T1249	mPEG _{20k} -CMAB-T1249 Metabolito	Parental y Metabolito
AUC (µg hr/mL)	279 ^a	508 ^b	766 ^b
C _{max} (µg/mL)	14,8	13,9	27,2
T _{1/2} terminal (hr)	8,9	15,7	13,8
Cl/F (mL/hr/kg)	27,4	14,6	10,0
V _d /F (mL/kg)	353	330	199
T _{max} (hr)	16	24	16

Tabla 6. Parámetros farmacocinéticas para mPEG_{20k}-CMAB-T1249 en ratas.

^a AUC_{0-48hr}; ^b AUC_{0-72hr}

Ejemplo 11

5 Farmacocinéticas de T1249

Diseño del estudio

Cada grupo de tratamiento, consistente de 9 ratas Sprague-Dawley (Laboratorios Charles River, Wilmington, DE) por sexo. Cada miembro del grupo recibió una dosis subcutánea sencilla o intravenosa de T1249 (lote 2 referenciado en el Ejemplo 9/Tabla 5). Las ratas se dosificaron a 1,2 o 15 mg del ingrediente activo/kg de peso corporal.

Las muestras de sangre se recogieron de los animales prueba durante un periodo de tiempo de doce horas de tres ratas por sexo por grupo a cada punto de tiempo. Los tiempos fueron 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, y 12 horas atrás la administración de dosis.

Método Bioanalítico

Las muestras de sangre se analizaron usando un ensayo ECLIA PcAb T1249. ECLIA PcAb T1249 es un inmunoensayo de

68

dos sitios no competitivo, que utiliza dos preparaciones diferentes de PCAb de conejo específicas para T1249. En este ensayo, las determinaciones de T1249 se realizan incubando primero la muestra del ensayo diluida en un tubo que también contiene anticuerpo marcado con biotina (preparación A) y anticuerpo marcado rutenio (preparación B). En el siguiente paso, se añaden cuentas magnéticas recubiertas de estreptavidina al tubo para capturar los inmunocomplejos de anticuerpo-péptido-anticuerpo (sándwiches) que se han formado. La mezcla se bombea entonces a través de un flujo celular en el analizador, tras el cual se aplica una corriente eléctrica a un imán adyacente al flujo celular. Se genera luz a través de las reacciones de oxidación-reducción cíclicas entre los iones del rutenio que están conjugados con los anticuerpos detectores e iones tripropilamina que están presentes en exceso en el tampón de ensayo. Esta energía lumínica es el punto final medido. Una muestra que contiene una cantidad apreciable de T1249 presenta una mayor señal comparada con una muestra que contiene poca o ninguna cantidad de T1249.

Resultados

La Fig. 5 muestra el perfil de concentración-tiempo de T1249 en ratas tras una administración de dosis simple subcutánea o intravenosa.

T_{max}, vida media, AUC (0-12 horas y 0-∞ horas), y C_{max} se muestran en la Tabla 7, a continuación.

67

Parámetro (unidad)	Dosis Grupos			
	1,2 mg/kg (SC)	15 mg/kg (SC)	1,5 mg/kg (IV)	5,0 mg/kg (IV)
T _{1/2} terminal (hr)	2,02	2,00	2,46	1,86
T _{max} (hr)	1,09	1,88	-	-
C _{max} (µg/mL)	6,37	21,5	15,7	46,3
AUC _(0-12hr) (µg hr/mL)	27,0	107	45,6	118
AUC _(0-∞) (µg hr/mL)	27,6	110	47,1	120

Tabla 7. Parámetros Farmacocinéticos para T1249 en ratas.

Considerando los datos farmacocinéticos para mPEG_{20k}-CMAB-T1249 (Tabla 6) y la dosis subcutánea de 15 mg/kg con T1249 (Tabla 7), mPEG_{20k}-CMAB-T1249 presenta un incremento de 4,5-veces en la vida media terminal. La mayor T_{max} refleja un aclaramiento menor para mPEG_{20k}-CMAB-T1249 en comparación con T1249 hasta que posee una C_{max} similar. Además, una vez normalizados los datos de la Tabla 7 para la diferencia de dosis (15 mg/kg normalizado a 8 mg/kg como en el Ejemplo 10), un incremento de 5 veces sobre T1249 en AUC se observó para mPEG_{20k}-CMAB-T1249 (57,1 µg hr/mL (normalizado) para T1249 versus 279 µg hr/mL para mPEG_{20k}-CMAB-T1249).

Ejemplo 12

Efecto de T1249 y mPEG_{20k}-CMAB-T1249 sobre la carga viral de VIH-1 en ratón

Se emplearon 9 ratones HuPBMC-SCID por grupo de tratamiento (excepto el control de PEG que tienen 6 ratones). En

70

el día 0, cada grupo de tratamiento recibió un tratamiento p.m. después de la infección con VIH aislado. Después, cada grupo de tratamiento recibió 2 tratamientos en un día (a.m. y p.m.) del día 1 al día 6. Los ratones se aislaron el día.

5 Ver Tabla 8 para los detalles de dosis. Se recogieron muestras de plasma para el análisis de T1249 alrededor de 14 horas tras la última administración de dosis.

Grupo de Dosis	Dosis	Ratón/grupo	Día	Actividad
Control Salino	0 mg/día	9	1-6	dosis am dosis pm
T1249	0,7 mg/día	9	1-6	dosis am
	2 mg/día	9		dosis pm
	7 mg/día	9		
mPEG _{20k} -CMAB-T1249	0,7 mg/día	9	1-6	dosis am
	2 mg/día	9		dosis pm
	7 mg/día	9		
PEG Control	7 mg/día	6	1-6	dosis am dosis pm
All			7	aislado

Tabla 8. Esquema de dosis.

10 VIH-1 en plasma se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El plasma se separó para la cuantificación del compuesto T1249. Las muestras de plasma congeladas pasaron a ser compuestos de análisis.

15 La Figura 6 muestra el efecto de la dosis de T1249 y mPEG_{20k}-CMAB-T1249 sobre la carga viral de VIH-1 en ratones SCID.

69

T1249 y mPEG_{20k}-CMAB-T1249 son igualmente activos in vivo. Los resultados no muestran diferencias apreciables en la supresión de actividad viral in vivo medido contra la concentración de plasma del compuesto probado.

5 Los resultados anteriores indican las ventajosas propiedades de la invención, la actividad biológica equivalente in vivo de mPEG_{20k}-CMAB-T1249 y T1249 en las mismas concentraciones de plasma (Ejemplo 12), y un perfil farmacocinético muy superior de mPEG_{20k}-CMAB-T1249 como se demuestra
10 por la comparación de los Ejemplos 10 y 11.

La invención siendo así descrita, será obvio que la misma puede variar de muchas maneras. Tales variaciones no deben entenderse como un alejamiento en el espíritu y alcance de la invención y todas estas modificaciones deben
15 incluirse dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

72

20

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BAILON, Pascal Sebastián

WON, Chee-Youb

<120> Polipéptido T1249 pegilado

5 <130> 21327US1

<150> US 60/439.213

<151> 2003-01-10

<150> US 60/398.190

<151> 2002-07-24

10 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica derivada sintéticamente

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (39) .. (39)

<223> El residuo 39 está modificado opcionalmente con un grupo amino.

<400> 1

25

73

21

	<210>	2
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
5	<220>	
	<223>	Secuencia peptídica derivada sintéticamente
	<400>	2
10		
	<210>	3
	<211>	14
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
15	<220>	
	<223>	Secuencia peptídica derivada sintéticamente
	<400>	3
20		
	<210>	4
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Artificial
25	<220>	
	<223>	Secuencia peptídica derivada sintéticamente
	<400>	4
	<210>	5

72

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
5 <223> Secuencia peptídica derivada sintéticamente
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> El residuo 8 está modificado opcionalmente con un
10 grupo amino.
<400> 5

15

75

73

Reivindicaciones:

1. Un compuesto de fórmula (I),



5 $R_1 - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - (\text{CH}_2)_m - \text{C} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_p - \text{CH}_2 - \text{NHT1249} \text{ (I)}$

en donde

R_1 es un grupo de cabeza

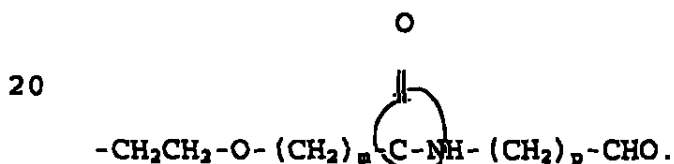
m es de 1 a 17,

n es de 10 a 1.000,

10 p es de 1 a 3, y

NHT1249 es un polipéptido T1249 unido covalentemente a través de su grupo α -amino terminal.

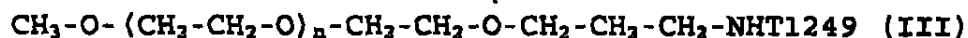
2. Un compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde R_1 se sustituye por el grupo consistente en halógeno, epóxido, maleimida, disulfuro ortopiridilo, tosilato, isocianato, hidrato de hidrazina, haluro cianúrico, N-succinimidiloxi, sulfo-N-succinimidiloxi, 1-benzotriazoliloxi, 1-imidazoliloxi, p-nitrofeniloxi, y



3. Un compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde p es 3.

4. Un compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en donde p es 3, R_1 es metoxi, m es 1, y n es de 100 a 750.

5. Un compuesto de fórmula:



en donde n es de 10 a 1.000 y NHT1249 es un Polipéptido

76

74

T1249 unido covalentemente a través de su grupo α -amino terminal.

6. Un compuesto de acuerdo a la reivindicación 5, en donde n es aproximadamente 450.

5 7. Una composición farmacéutica que comprende, en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula:

O

||

10 $R_1 - (CH_2CH_2O)_n - CH_2CH_2 - O - (CH_2)_m - C - NH - (CH_2)_p - CH_2 - NHT1249$ (I)

en donde

R_1 es un grupo de cabeza,

m es de 1 a 17,

n es de 10 a 1.000,

15 p es de 1 a 3, y

NHT1249 es un polipéptido T1249 unido covalentemente a través de su grupo α -amino terminal.

8. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 7, en donde p es 3, R_1 es metoxi, m es 1, y n es
20 de 100 a 750.

9. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 7 en la forma de un polvo liofilizado.

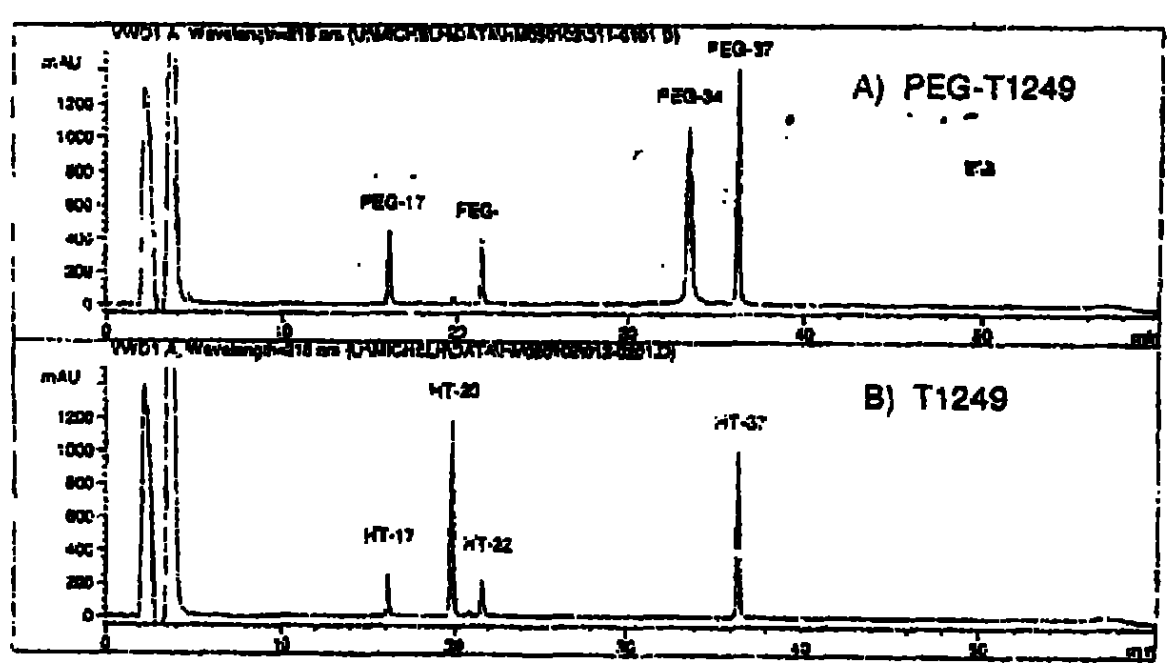
10. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 7 en forma de una solución o suspensión inyec-
25 table.

77

75

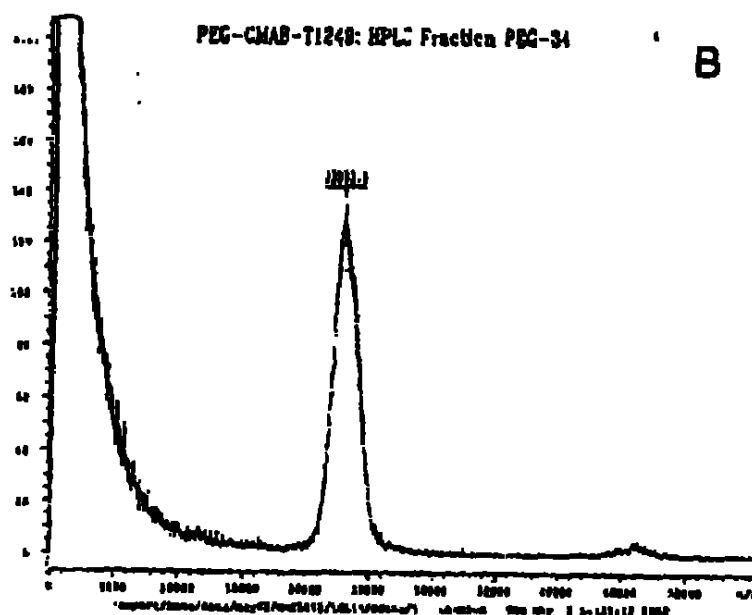
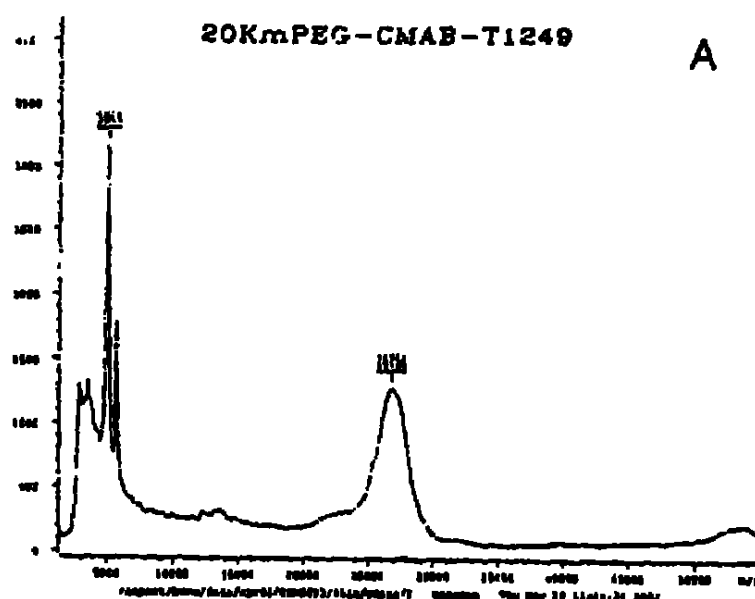
Figura 1: Comparación de una T1249 digerida proteolítica no modificada y modificada. Digestión con endoproteinasa Lis-C y separación subsiguiente con HPLC de fase reversa. A) muestra de T-1249 de PEG-Butanoaldehído de 20 kDa; B) muestra de T-1249. Absorbancia de UV a 215 nm.

10



78

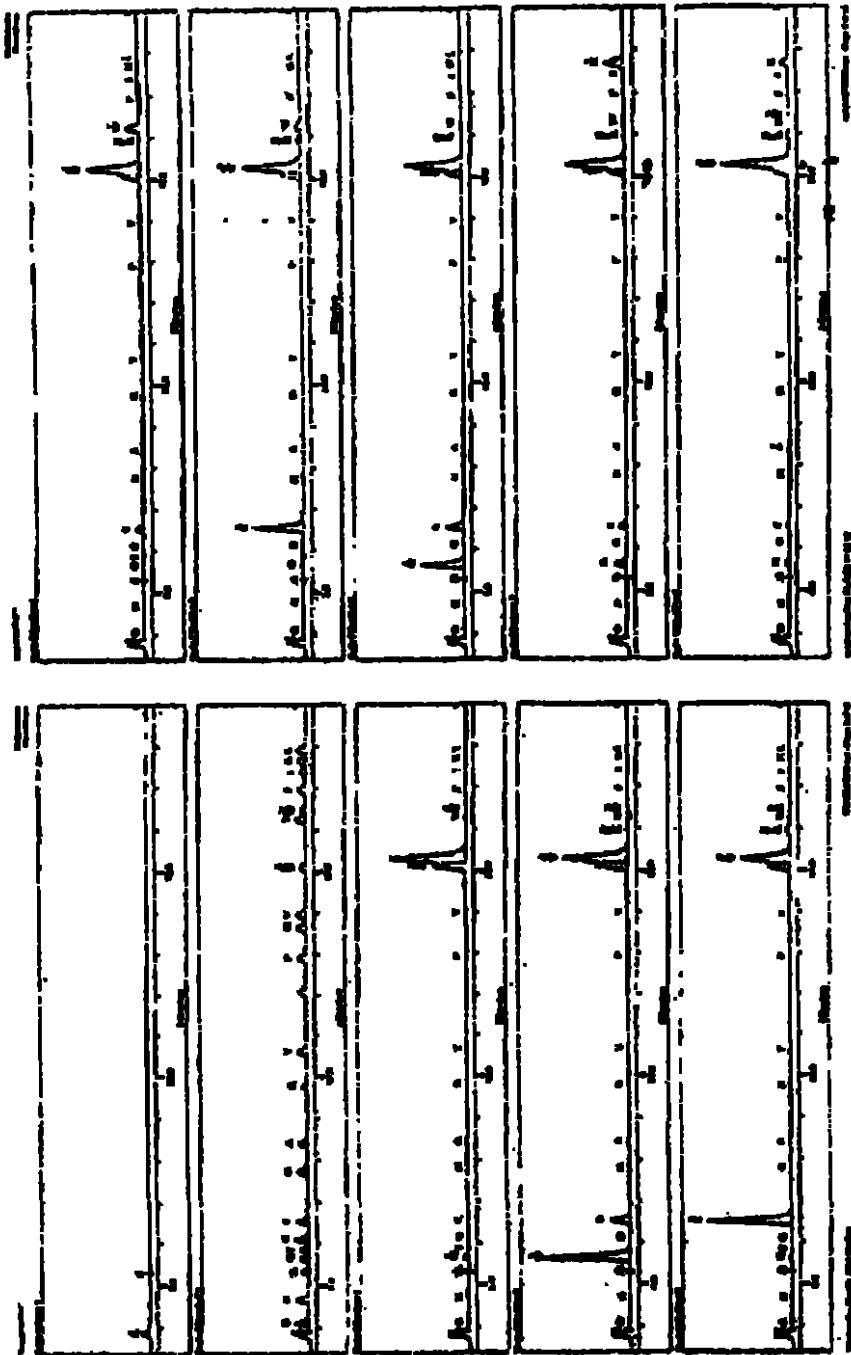
Figura 2: Espectrometría de masas con ionización por desorción de láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI TOF). Masa espectral de la fracción HPLC recogida con PEG-34 (Figura 1). El espectro se adquirió de un modo lineal con ácido Trans-3 indolacrílico como la matriz. Peso molecular en Da.



27

Figura 3: Secuenciación N-terminal (Edman) de la fracción PEG-34 recogida por HPLC.

5



28

Figura 4. Perfil de Tiempo-Concentración de Mpeg_{20K}-T1249 en ratas después de una administración subcutánea sencilla den 8 mg/Kg.

5

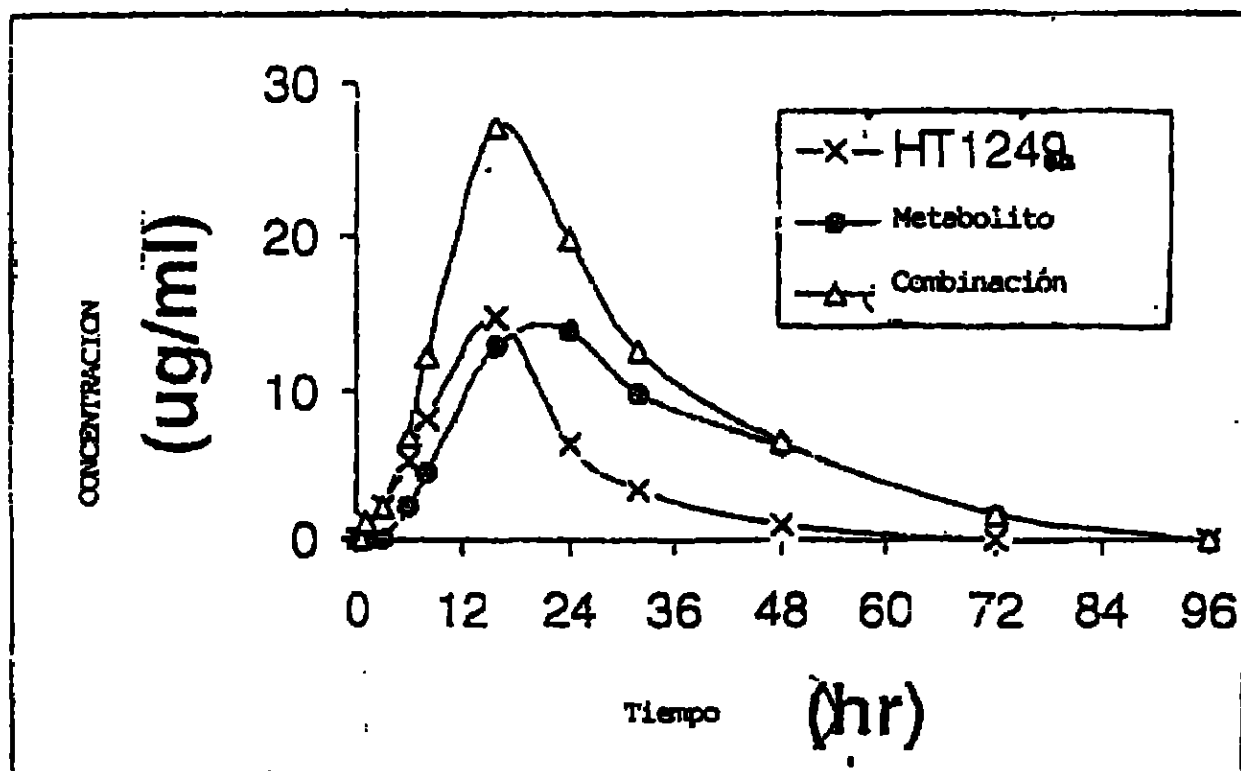


Figura 5. Farmacocinéticas de plasma para la T-1249 administrada por inyección intravenosa o subcutánea en ratas.

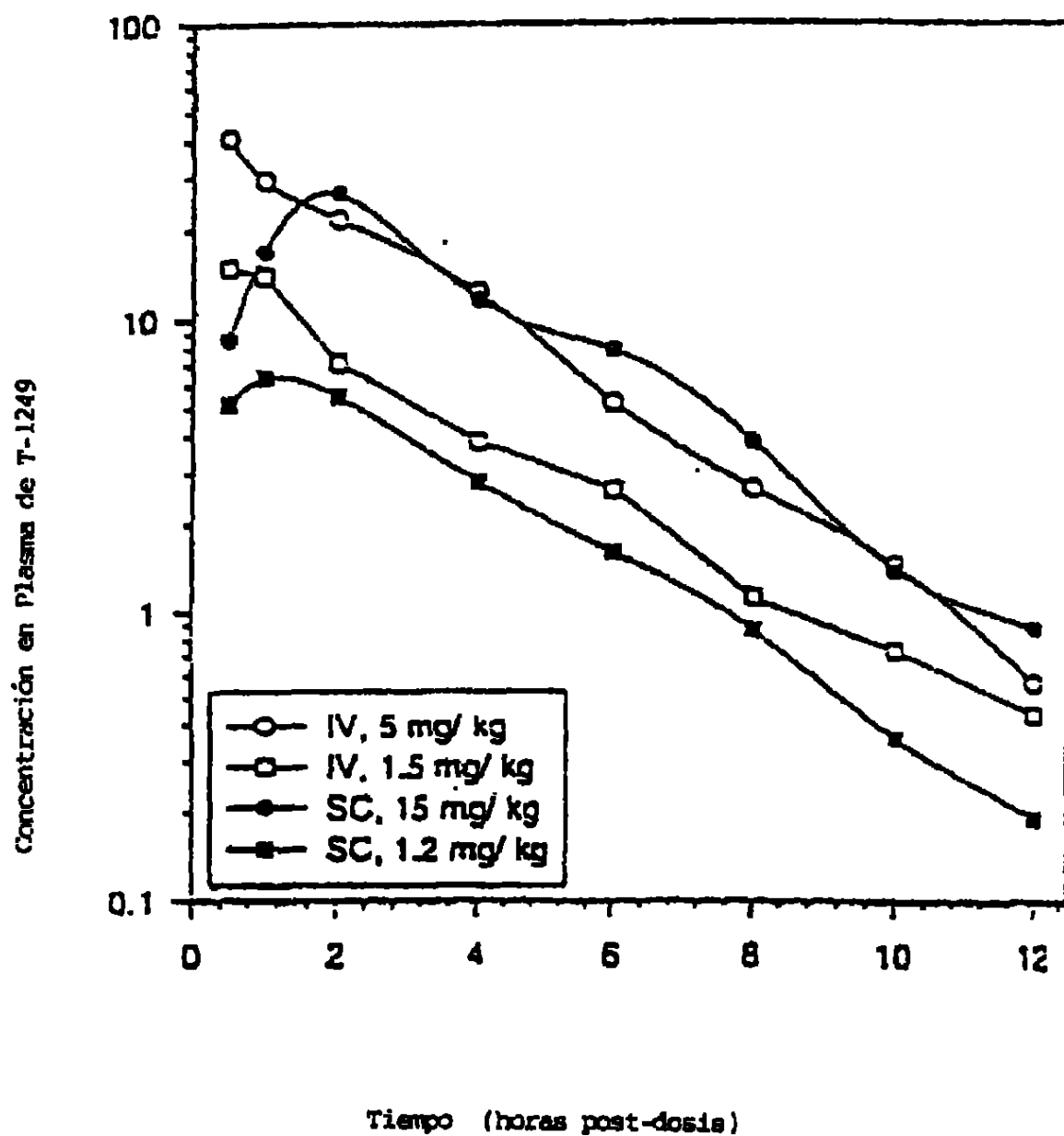
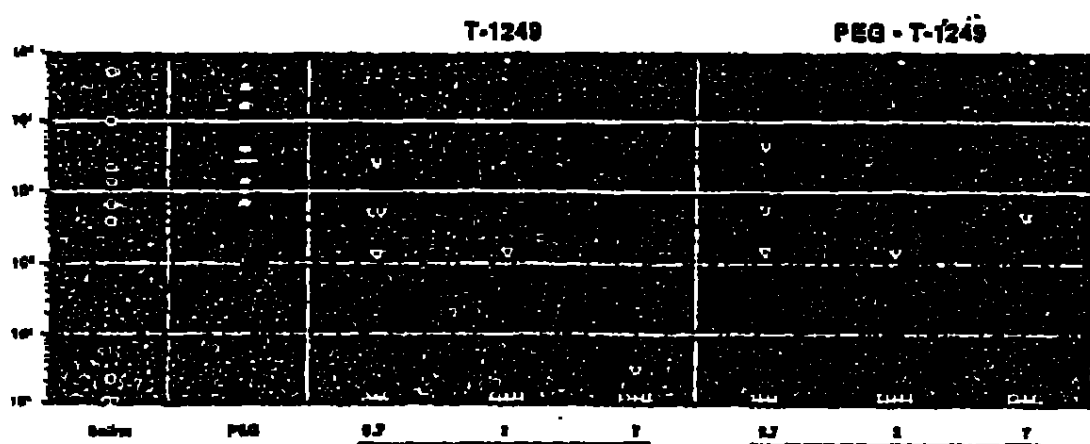


Figura 6

Efecto de T-249 y PEG-T-1249 sobre la carga viral de VIH-1 en Plasma.

En ratón SCID después de 7 días de tratamiento.

Carga Viral en Plasma (RNA de VIH-1 copies/mL)



DOSIS (mg/Kg/día - I.P., bld)

* p < 0.05 (vs. control)

hembras SCID, 6-8 semanas

81

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
- EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO
2. HA SIDO FIRMADO POR: T. LAWRENCE
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: OFICIAL DE CERTIFICACIONES
4. LLEVA EL SELLO DE: LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

CERTIFICADO

5. EN: WASHINGTON, D.C.
6. EL: 30 DE MAYO DE 2003
7. POR: EL ASISTENTE DE AUTENTICACIONES OFICIALES, DEPARTAMENTO DE ESTADO DE LOS ESTADOS UNIDOS
8. BAJO EL NO.: 03018476-1
9. SELLO: HAY SELLO EN ALTO RELIEVE DEL DEPARTAMENTO DE ESTADO DE LOS ESTADOS UNIDOS
10. FIRMADO POR: JOAN C. HAMPTON

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
305520
COPIA FIRMA APOYADA EN EL
DOCUMENTO DESERTEGA
LAS FUNCIONES INDICADAS

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine
HELENA URIBE DE LEMOINE



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2005 ENE 17 P 11:31
JES
JEFE DE LEGALIZACIONES
OFICIAL R.C.

84

42
TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODOS A QUIENES LOS PRESENTEN LLEGUEN, SALUDOS

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

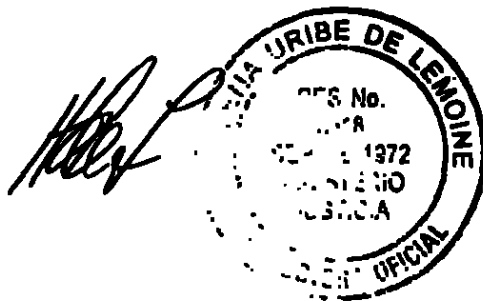
23 DE Mayo de 2003

POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICAMOS QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO
ES UNA COPIA VERDADERA DE UN DOCUMENTO REGISTRADO EL 11 DE
SEPTIEMBRE DE 2002 QUE SE ENCUENTRA EN LOS ARCHIVOS DE ESTE
DESPACHO.

Por autorización del COMISIONADO DE MARCAS Y PATENTES

FIRMADO: T. LAWRENCE - Funcionario Certificador.

HAY SELLO EN ALTO RELIEVE DEL FUNCIONARIO.



83

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

9-11-02

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas

EXPEDIENTE NO. 21327 US

Al Honorable Comisionado de Patentes y Marcas Comerciales:
sírvasse registrar los documentos originales adjuntos o la
copia de los mismos.

1. Nombre de las partes que traspasan:

- 1) Pascal Sebastian Bailon
- 2) Chee-Youb Won

Nombres adicionales de: No

2. Nombre y dirección de la parte que recibe:

HOFFMANN-LA ROCHE INC.

3. Naturaleza del traspaso: Cesión

Dirección: 340 Kingsland Street

Ciudad: Nutley, Estado: New Jersey, Zip: 07110

Nombre adicional y Dirección adjunta: No

Fecha de Ejecución: 1) 21 DE Agosto de 2002
2) 24 de Julio de 2002.

4. Número de solicitud o número de patente:

Si el documento está siendo radicado junto con una nueva
solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es:

SERIE DE SOLICITUD PROVISIONAL EN LOS ESTADOS UNIDOS NO.
60/398,190, RADICADA EL 24 DE JULIO DE 2002.

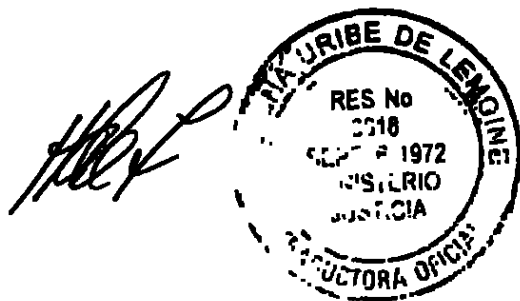
Números adicionales adjuntos?: No.

09/16/2002 BTOM11 00000145 062525 60398190

01 FC: 581 40.00 CH

PATENTE

REEL: 013285 FRAME 0471



84

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

5. Nombre y dirección de la persona a quien debe enviarse la correspondencia relativa a este documento:

George W. Johnston

Dirección interna:

HOFFMANN-LA ROCHE INC.

PATENT LAW DEPARTMENT

Dirección:

340 Kingsland Street, Ciudad: Nutley Estado: New Jersey

Zip: 07110

6. Número total de solicitudes y patentes involucradas: UNA

7. Total Derechos: US\$40.00

Se autoriza debitarlos de la cuenta de depósito.

Se autoriza cobrar faltantes a la cuenta de depósito.

8. Número de la cuenta de depósito: 08-2525

NO UTILICE ESTE ESPACIO

9. Declaración y firma:

Hasta donde van mis conocimientos, la anterior información es verdadera y correcta y cualquier copia adjunta es una copia verdadera del documento original.

PERSONA QUE FIRMA: EILEEN M. EBEL - 6 DE FEBRERO DE 2002

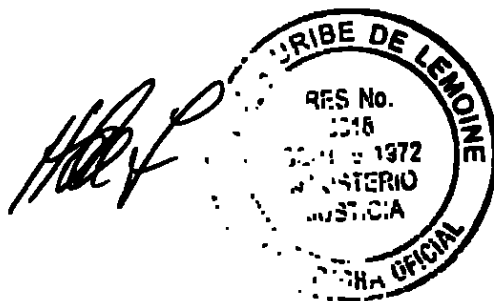
Contacto: Bettyann Hedemus

Teléfono: (973) 235 4383

Fax: (973) 235 2363

Número total de páginas incluyendo la cubierta, anexos y documentos: 6.

123395



REEL: 013285 FRAME 0472

15

87

85

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

INVENCION CONJUNTA

Expediente No. 21327 US

TRASPASO

CONSIDERANDO QUE yo, Pascal Sebastian Bailon, (Cedente), junto con Chee-Youb Won hemos inventado ciertas nuevas y útiles mejoras que se describen y hemos reivindicado su aplicación para Patente en los

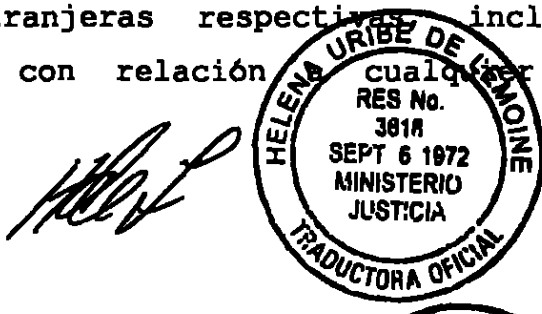
Estados Unidos, e identificadas como Serie No. 60/398,190, radicadas el 24 de Julio de 2002, y titulada

POLIPÉPTIDO T1249 PEGILADO

CONSIDERANDO QUE HOFFMANN-LA ROCHE INC., una sociedad constituida y que existe bajo y en virtud de las leyes del Estado de Nueva Jersey, y cuya sede principal está situada en Nutley, New Jersey, desea adquirir todo el interés sobre dicha invención, dicha solicitud y la Patente que será obtenida;

POR LO TANTO, en consideración a la suma de UN DÓLAR (US\$1.00) y a otras buenas y valiosas consideraciones cuyo recibo y suficiencia se reconocen por el presente, hemos vendido, cedido y traspasado y por medio de los presentes, vendemos, cedemos y traspasamos a HOFFMANN-LA ROCHE INC. (el Cesionario), y a los representantes y sucesores legales del Cesionario, el derecho total, el título e interés en todo el mundo para dicha invención y dicha solicitud, así como la respectiva solicitud que reivindica la prioridad con base en la fecha de radicación de dicha solicitud identificada como el Expediente No. 21327 US1 y las patentes, tanto locales como extranjeras respectivas, incluyendo el derecho de reclamar con relación a cualquier solicitud de patente

8



88

86

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

posterior en los Estados Unidos o en el exterior, la fecha de prioridad de dicha solicitud bajo cualquier estatuto en los Estados Unidos y cualquier convenio o tratado internacional; y por medio del presente autorizamos y solicitamos la expedición de dichas patentes locales y extranjeras, de conformidad con los términos del presente Acuerdo.

POR DICHA CONSIDERACIÓN, por medio del presente me comprometo y acuerdo con el Cesionario que no ejecutaré ningún escrito ni haré ningún acto de ningún tipo que entre en conflicto con estos presentes, y que en cualquier momento, a solicitud y sin consideración posterior o adicional, pero por cuenta y gasto de dicho Cesionario, ejecutaremos todos los trasposos adicionales y demás escritos y efectuaremos todos aquellos actos adicionales que dicho Cesionario considere necesario o deseable llevar a cabo para el goce perfecto por parte del Cesionario de este otorgamiento y a prestar la asistencia necesaria para hacer la solicitud con el fin de obtener la patente provisional original, la continuación parcial, la división la re-emisión, el re-examen o la prórroga de la Patente de los Estados Unidos o de cualquier país extranjero sobre dicho invento y para hacer cumplir los derechos o acciones que se causen como resultado de dichas solicitudes de patentes, incluyendo, pero sin limitarse al hecho de dar testimonio en un proceso o transacción que involucre dichas solicitudes o patentes, y ejecutar las declaraciones preliminares y otras declaraciones, siendo entendido que el compromiso y el acuerdo anterior se hace para beneficio de los cesionarios y de los representantes legales de todas las partes del presente.



89

87

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

PATENT REEL 013285 FRAME 0473

EN TESTIMONIO DE LO ANTERIOR firmo y coloco mi sello a los veintiún días del mes de Agosto de 2002 en Nutley, New Jersey, U.S.A.

FIRMADO: PASCAL SEBASTIAN BAILON

RECONOCIMIENTO

Estados unidos de América

Estado de New Jersey

Condado de Essex

El 21 de Agosto de 2002, ante mí compareció personalmente PASCAL SEBASTIAN BAILON, a quien conozco como la persona descrita en la anterior Cesión, quien reconoció que ejecutó la anterior Cesión como su acto libre para todos los fines estipulados allí.

FIRMADO: LOU ANN DONATONI - NOTARIO PÚBLICO DE NEW JERSEY CON COMISIÓN HASTA EL 26 DE MARZO DE 2003.

121989

PATENTE

REEL: 013285 FRAME: 0474

INVENCION CONJUNTA

Expediente No. 21327 US

TRASPASO

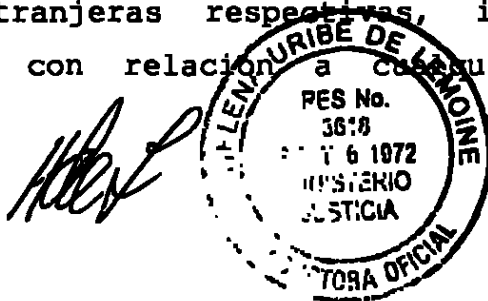
CONSIDERANDO QUE yo, Chee-Youb Won, (el Cedente), conjuntamente con Pascal Sebastian Bailon, hemos inventado ciertas nuevas y útiles mejoras que se describen y hemos reivindicado la solicitud de Patente en los Estados Unidos, identificada bajo el expediente número 21327US titulada titulada

POLIPÉPTIDO T1249 PEGILADO

CONSIDERANDO QUE HOFFMANN-LA ROCHE INC., una sociedad constituida y que existe bajo y en virtud de las leyes del Estado de Nueva Jersey, y cuya sede principal está situada en Nutley, New Jersey, desea adquirir todo el interés sobre dicha invención, dicha solicitud y la Patente que será obtenida;

POR LO TANTO, en consideración a la suma de UN DÓLAR (US\$1.00) y a otras buenas y valiosas consideraciones cuyo recibo y suficiencia se reconocen por el presente, hemos vendido, cedido y traspasado y por medio de los presentes, vendemos, cedemos y traspasamos a HOFFMANN-LA ROCHE INC. (el Cesionario), y a los representantes y sucesores legales del Cesionario, el derecho total, el título e interés en todo el mundo para dicha invención y dicha solicitud, así como la respectiva solicitud que reivindica la prioridad con base en la fecha de radicación de dicha solicitud identificada como el Expediente No. 21327 US1 y las patentes, tanto locales como extranjeras respectivas, incluyendo el derecho de reclamar con relación a cualquier solicitud de patente

11

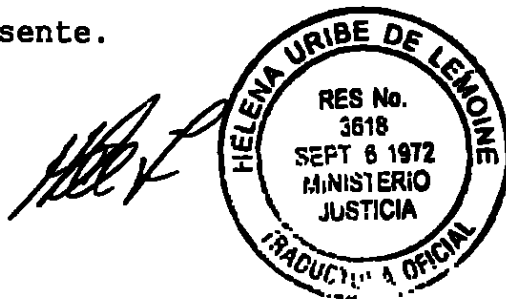


89

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

posterior en los Estados Unidos o en el exterior, la fecha de prioridad de dicha solicitud bajo cualquier estatuto en los Estados Unidos y cualquier convenio o tratado internacional; y por medio del presente autorizamos y solicitamos la expedición de dichas patentes locales y extranjeras, de conformidad con los términos del presente Acuerdo.

POR DICHA CONSIDERACIÓN, por medio del presente me comprometo y acuerdo con el Cesionario que no ejecutaré ningún escrito ni haré ningún acto de ningún tipo que entre en conflicto con estos presentes, y que en cualquier momento, a solicitud y sin consideración posterior o adicional, pero por cuenta y gasto de dicho Cesionario, ejecutaremos todos los traspasos adicionales y demás escritos y efectuaremos todos aquellos actos adicionales que dicho Cesionario considere necesario o deseable llevar a cabo para el goce perfecto por parte del Cesionario de este otorgamiento y a prestar la asistencia necesaria para hacer la solicitud con el fin de obtener la patente provisional original, la continuación parcial, la división la re-emisión, el re-examen o la prórroga de la Patente de los Estados Unidos o de cualquier país extranjero sobre dicho invento y para hacer cumplir los derechos o acciones que se causen como resultado de dichas solicitudes de patentes, incluyendo, pero sin limitarse al hecho de dar testimonio en un proceso o transacción que involucre dichas solicitudes o patentes, y ejecutar las declaraciones preliminares y otras declaraciones, siendo entendido que el compromiso y el acuerdo anterior se hace para beneficio de los cesionarios y de los representantes legales de todas las partes del presente.



90

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

PATENT REEL 013285 FRAME 0473

EN TESTIMONIO DE LO ANTERIOR firmo y coloco mi sello a los veinticuatro días del mes de Julio de 2002 en Nutley, New Jersey, U.S.A.

FIRMADO: PASCAL SEBASTIAN BAILON

RECONOCIMIENTO

Estados unidos de América

Estado de New Jersey

Condado de Essex

El 24 de Julio de 2002, ante mí compareció personalmente Chee-Youb Won, a quien conozco como la persona descrita en la anterior Cesión, quien reconoció que ejecutó la anterior Cesión como su acto libre para todos los fines estipulados allí.

FIRMADO: LOU ANN DONATONI - NOTARIO PÚBLICO DE NEW JERSEY CON COMISIÓN HASTA EL 26 DE MARZO DE 2003.

121988

PATENTE

REEL: 013285 FRAME: 0476

91

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Lawrence

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

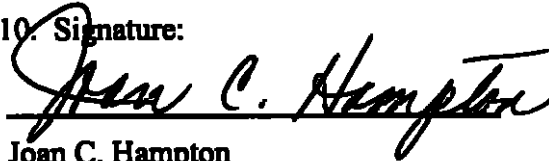
6. the thirtieth of May, 2003

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 03018476-1

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Joan C. Hampton

94

92

A 3014968

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

May 23, 2003

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
SEPTEMBER 11, 2002.



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

T. Lawrence

T. LAWRENCE
Certifying Officer

COLOMBIA

95

09-17-2002
102222107
PATENTS ONLY

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office

9-11-02

Case Docket No. 21327 DB

To the Honorable Commissioner of Patents and Trademarks: Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

- 1) Pascal Sebastian Bailon
2) Chae-Youb Wem

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: HOFFMAN-LA ROCHE INC.

Internal Address: _____

Additional name(s) of conveying

party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

- ☒ Assignment ☐ Merger
☐ Security Agreement ☐ Change of Name
☐ Other _____

Street Address: 340 KINGSLAND STREET

City: MUTLWY State: NY Zip: 07110

Execution Date: 1) AUGUST 21, 2002
2) JULY 24, 2002

Additional name(s) & address(es) attached:
Yes ☐ No ☒

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No. (s)

B. Patent No. (s)

U.S. PROVISIONAL APPL. SERIAL NO. 60/398,190 FILED: JULY 24, 2002

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

09/16/2002 07:11:11 00000145 000001 10/22/2002
01 PDSM 00.00 CH

PATENT
REEL: 013285 FRAME: 0471

96

94

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Name: GEORGE W. JOHNSTON

Internal Address:

HOFFMANN-LA ROCHE INC.

PATENT LAW DEPARTMENT

Street address: 340 KINGSLAND STREET

City: MUTLEY State: NJ Zip: 07110

6. Total number of applications and patents involved: ONE

7. Total fee (37 CFR 3.41).....\$ 40.00

☒ Authorized to be charged to deposit account

☒ Authorized any deficiencies to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

08-2525

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

WILLIAM M. REEL

Name of Person Signing

William M. Reel

Signature

SEPTEMBER 6, 2002

Date

CONTACT: Bettyann Hedamus
TELEPHONE: (973) 235-4383
FAX: (973) 235-2363

Total number of pages including cover sheet, attachments and document: 6

123395

PATENT
REEL: 013285 FRAME: 0472

97

JOINT INVENTION

Case Docket No. 21327 US

ASSIGNMENT

WHEREAS, I, Pascal Sebastian Bailon (Assignor) together with Chee-Youb Won, have invented certain new and useful improvements in which are described and claimed in application for United States Patent and identified as Serial No. 60/398,190, filed July 24, 2002, entitled

PEGYLATED T1249 POLYPEPTIDE

WHEREAS, HOFFMANN-LA ROCHE INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of New Jersey, and having its principal place of business at Nutley, New Jersey, is desirous of acquiring the entire interest in and to said invention, said application and the Patent to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, for and in consideration of One Dollar (\$1.00) and other good and valuable consideration to me in hand paid, the receipt and sufficiency whereof are hereby acknowledged, I have sold, assigned, and set over, and by these presents do hereby sell, assign, and set over unto the said HOFFMANN-LA ROCHE INC. (Assignee), and said Assignee's legal representatives, successors, the entire right, title and interest, for the whole world, in and to said invention and said application, as well as any subsequent application which claims priority based upon the filing date of said application identified as Serial No. 60/398,190 and the patents, both domestic and foreign, that may or shall result therefrom including the right to claim in respect of any subsequent United States and foreign patent applications and patents, the priority date of said application under any United States statute and international convention or treaty; and I do hereby authorize and request the issuance of said patents, domestic and foreign, conformably to the terms of this Agreement.

UPON SAID CONSIDERATION, I do hereby covenant and agree with the said Assignee that I will not execute any writing or do any act whatsoever conflicting with these presents, and that I will at any time upon request, without further or additional consideration, but at the expense of the said Assignee, execute such additional assignments and other writings and do such additional acts as said Assignee may deem necessary or desirable to perfect the Assignee's enjoyment of this grant, and render all necessary assistance in making application for and obtaining provisional, original, continuation, continuation-in-part, divisional, reissued, re-examined or extended Patent of the United States or of any and all foreign countries on said invention, and in enforcing any rights or choses in action accruing as a result of such applications or patents, including but not limited to, giving testimony in any proceedings or transactions involving such applications or patents, and executing preliminary statements and other affidavits, it being understood that the foregoing covenant and agreement shall bind and inure to the benefit of the assigns and legal representatives of all parties hereto.

PATENT
REEL: 013285 FRAME: 0473

96

IN WITNESS WHEREOF, I have herunto set my hand and affixed my seal this 21st day of August, 2002.

Nutley, New Jersey, U.S.A.

Pascal Sebastian Bailon
Pascal Sebastian Bailon

ACKNOWLEDGMENT

United States of America)
State of New Jersey)
County of Essex)

On August 21, 2002, before me personally appeared Pascal Sebastian Bailon to me known to be the person described in the foregoing Assignment, who acknowledged that he executed the foregoing Assignment of his own free will for the purposes therein set forth.

Lou Ann Donatoni

LOU ANN DONATONI
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires March 25, 2003

121989

JOINT INVENTION

Case Docket No. 21327 US

ASSIGNMENT

WHEREAS, I, Chee-Youb Won (Assignor) together with Pascal Sebastian Bailon, have invented certain new and useful improvements in which are described and claimed in application for United States Patent and identified as Case Docket No. 21327 US, entitled

PEGYLATED T1249 POLYPEPTIDE

WHEREAS, HOFFMANN-LA ROCHE INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of New Jersey, and having its principal place of business at Nutley, New Jersey, is desirous of acquiring the entire interest in and to said invention, said application and the Patent to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, for and in consideration of One Dollar (\$1.00) and other good and valuable consideration to me in hand paid, the receipt and sufficiency whereof are hereby acknowledged, I have sold, assigned, and set over, and by these presents do hereby sell, assign, and set over unto the said HOFFMANN-LA ROCHE INC. (Assignee), and said Assignee's legal representatives, successors, the entire right, title and interest, for the whole world, in and to said invention and said application, as well as any subsequent application which claims priority based upon the filing date of said application identified as Case Docket No. 21327 US and the patents, both domestic and foreign, that may or shall result therefrom including the right to claim in respect of any subsequent United States and foreign patent applications and patents, the priority date of said application under any United States statute and international convention or treaty; and I do hereby authorize and request the issuance of said patents, domestic and foreign, conformably to the terms of this Agreement.

UPON SAID CONSIDERATION, I do hereby covenant and agree with the said Assignee that I will not execute any writing or do any act whatsoever conflicting with these presents, and that I will at any time upon request, without further or additional consideration, but at the expense of the said Assignee, execute such additional assignments and other writings and do such additional acts as said Assignee may deem necessary or desirable to perfect the Assignee's enjoyment of this grant, and render all necessary assistance in making application for and obtaining provisional, original, continuation, continuation-in-part, divisional, reissued, re-examined or extended Patent of the United States or of any and all foreign countries on said invention, and in enforcing any rights or choses in action accruing as a result of such applications or patents, including but not limited to, giving testimony in any proceedings or transactions involving such applications or patents, and executing preliminary statements and other affidavits, it being understood that the foregoing covenant and agreement shall bind and inure to the benefit of the assigns and legal representatives of all parties hereto.

PATENT
REEL: 013285 FRAME: 0475

100

98

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed my seal this 24th day of July, 2002.

Nutley, New Jersey, U.S.A.

Cheerup Won
Chee-Youb Won

ACKNOWLEDGMENT

United States of America)
State of New Jersey)
County of Essex)

On July 24, 2002, before me personally appeared Chee-Youb Won to me known to be the person described in the foregoing Assignment, who acknowledged that he executed the foregoing Assignment of his own free will for the purposes therein set forth.

Lou Ann Donatoni

LOU ANN DONATONI
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires March 26, 2003.

121988

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: M. K. HAWKINS
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: OFICIAL DE CERTIFICACIONES
4. LLEVA EL SELLO DEL: OFICINA DE PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

CERTIFICADO

5. EN: WASHINGTON, D. C.
6. EL: 16 DE JULIO DE 2003
7. POR: EL ASISTENTE DE AUTENTICACIONES OFICIALES,
DEPARTAMENTO DE ESTADO DE LOS ESTADOS UNIDOS
8. BAJO EL NO.: 03022305-12
9. SELLO: HAY SELLO EN ALTO RELIEVE DEL DEPARTAMENTO DE
ESTADO DE LOS ESTADOS UNIDOS
10. FIRMADO POR: SONYA N. JOHNSON

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
305521
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
Jefe de Legalizaciones
2005 ENE 17 P 11:31
BOGOTÁ B.C.

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



100

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODOS A QUIENES LOS PRESENTEN LLEGUEN, SALUDOS

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

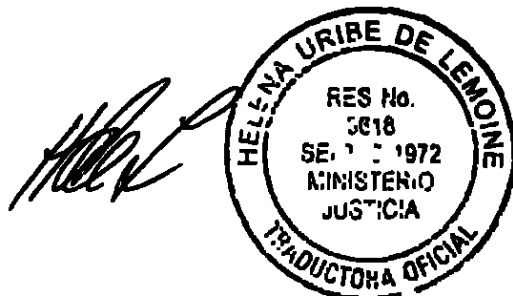
11 de Julio de 2003

POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICAMOS QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO
ES UNA COPIA VERDADERA DE UN DOCUMENTO REGISTRADO EL 19 DE
FEBRERO DE 2003, QUE SE ENCUENTRA EN LOS ARCHIVOS DE ESTE
DESPACHO.

Por autorización del COMISIONADO DE MARCAS Y PATENTES

FIRMADO: M. K. HAWKINS - Funcionario Certificador.

HAY SELLO EN ALTO RELIEVE DEL FUNCIONARIO.



103

2/19/03

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas

EXPEDIENTE NO. 21327 US1

Al Honorable Comisionado de Patentes y Marcas Comerciales:
sírvasse registrar los documentos originales adjuntos o la
copia de los mismos.

1. Nombre de la parte que traspasa:

1) Pascal Sebastian Bailon

2) Chee-Youb Won

Nombres adicionales de: No

2. Nombre y dirección de la parte que recibe:

HOFFMANN-LA ROCHE INC.

3. Naturaleza del traspaso: Cesión

Dirección: 340 Kingsland Street

Ciudad: Nutley, Estado: New Jersey, Zip: 07110

Nombre adicional y Dirección adjunta: no

Fecha de Ejecución: 10 de Enero de 2003.

4. Número de solicitud o número de patente:

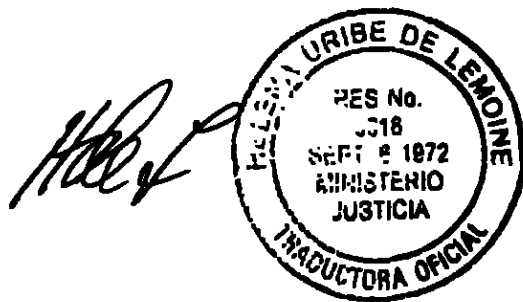
Si el documento está siendo radicado junto con una nueva
solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es:

SERIE DE SOLICITUD PROVISIONAL EN LOS ESTADOS UNIDOS NO.
60/439,213, RADICADA EL 10 DE ENERO DE 2003.

Números adicionales adjuntos?: No.

02/21/2003 TDIAZ1 00000009 082525 60439213

01 FC:8021 40.00 CH



5. Nombre y dirección de la persona a quien debe enviarse la correspondencia relativa a este documento:

George W. Johnston

Dirección interna:

HOFFMANN-LA ROCHE INC.

PATENT LAW DEPARTMENT

Dirección:

340 Kingsland Street, Ciudad: Nutley Estado: New Jersey

Zip: 07110

6. Número total de solicitudes y patentes involucradas: UNA

7. Total Derechos: US\$40.00

Se autoriza debitarlos de la cuenta de depósito.

Se autoriza cobrar faltantes a la cuenta de depósito.

8. Número de la cuenta de depósito: 08-2525

NO UTILICE ESTE ESPACIO

9. Declaración y firma:

Hasta donde van mis conocimientos, la anterior información es verdadera y correcta y cualquier copia adjunta es una copia verdadera del documento original.

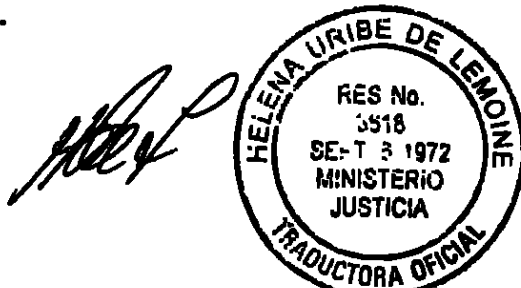
PERSONA QUE FIRMA: EILEEN M. EBEL - 11 DE FEBRERO DE 2003

Contacto: Bettyann Hedemos

Teléfono: (973) 235 4383

Fax: (973) 235 2363

Número total de páginas incluyendo la cubierta, anexos y documentos: 4.



INVENCION CONJUNTA

Expediente No. 21327 US1

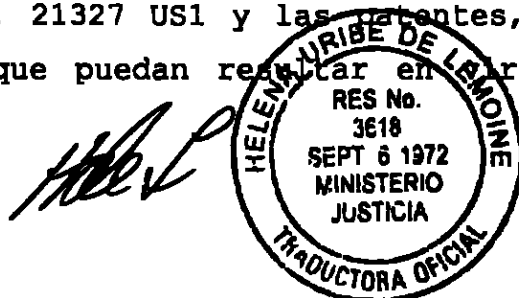
TRASPASO

Considerando que nosotros, Pascal Sebastian Bailon, Chee-Youb Won (Cedentes) hemos inventado ciertas nuevas y útiles mejoras que se describen y reivindican en la solicitud de Patente en los Estados Unidos, e identificada con el Número de Expediente 21327 US1 titulada

POLIPÉPTIDO T1249 PEGILADO

CONSIDERANDO QUE HOFFMANN-LA ROCHE INC., una sociedad constituida y que existe bajo y en virtud de las leyes del Estado de Nueva Jersey, y cuya sede principal está situada en Nutley, New Jersey, desea adquirir todo el interés sobre dicha invención, dicha solicitud y la Patente que será obtenida;

POR LO TANTO, en consideración a la suma de UN DÓLAR (US\$1.00) y a otras buenas y valiosas consideraciones cuyo recibo y suficiencia se reconocen por el presente, hemos vendido, cedido y traspasado y por medio de los presentes, vendemos, cedemos y traspasamos a HOFFMANN-LA ROCHE INC. (el Cesionario), y a los representantes y sucesores legales del Cesionario, el derecho total, el título e interés en todo el mundo sobre dicha invención y dicha solicitud, así como la posterior solicitud que reivindica la prioridad con base en la fecha de radicación de dicha solicitud identificada como Expediente No. 21327 US1 y las patentes, tanto locales como extranjeras, que puedan resultar en virtud de lo anterior,



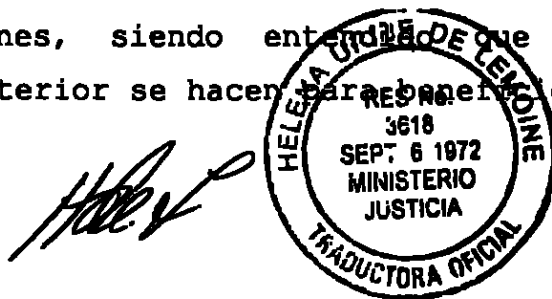
104

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

incluyendo el derecho a reclamar, con respecto a cualquier solicitud de patente posterior en los Estados Unidos o en el exterior, la fecha de prioridad de dicha solicitud bajo cualquier estatuto en los Estados Unidos y cualquier convenio o tratado internacional; y por medio del presente autorizamos y solicitamos la expedición de dichas patentes, locales y extranjeras, de conformidad con los términos del presente acuerdo.

POR DICHA CONSIDERACIÓN, por medio del presente nos comprometemos y acordamos con el Cesionario que no ejecutaremos ningún documento ni haremos ningún acto de ningún tipo que entre en conflicto con estos presentes, y que en cualquier momento, a solicitud y sin consideración posterior o adicional, pero por cuenta y gasto de dicho Cesionario, ejecutaremos todos los traspasos y demás escritos adicionales y efectuaremos todos aquellos actos que dicho Cesionario considere necesarios o deseables para el goce perfecto por parte del Cesionario de este otorgamiento y a prestar la asistencia necesaria para hacer la solicitud con el fin de obtener la patente provisional original, la continuación parcial, la división, la re-emisión, el re-examen o la prórroga de la Patente de los Estados Unidos o de cualquier país extranjero sobre dicho invento y para hacer cumplir los derechos o acciones que se causen como resultado de dichas solicitudes de patentes, incluyendo, pero sin limitarse al hecho de dar testimonio en un proceso o transacción que involucre dichas solicitudes o patentes, y ejecutar las declaraciones preliminares y otras declaraciones, siendo entendido que el compromiso y el acuerdo anterior se hacen para beneficio de los cesionarios y

2



107

105

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

de los representantes legales de todas las partes del presente.

EN TESTIMONIO DE LO ANTERIOR firmamos y colocamos nuestros sellos a los diez días del mes de Enero de 2003 en Nutley, New Jersey, U.S.A.

FIRMADO: PASCAL SEBASTIAN BAILON

FIRMADO: CHEE-YOUB WON

REL 013763 FRAME 135

RECONOCIMIENTO

Estados unidos de América

Estado de New Jersey

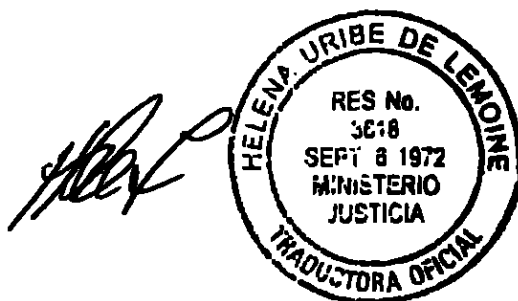
Condado de Essex

El 10 de Enero de 2003, ante mí comparecieron personalmente PASCAL SEBASTIAN BAILON y CHEE-YOUB WON, a quienes conozco como las personas descritas en la anterior Cesión, quienes reconocieron que ejecutaron la anterior Cesión como su acto libre para todos los fines estipulados allí.

FIRMADO: LOU ANN DONATONI - NOTARIO PÚBLICO DE NEW JERSEY CON COMISIÓN HASTA EL 26 DE MARZO DE 2003.

126649

REGISTRADO EL: 19 DE FEBRERO DE 2003.



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

106

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by M. K. Hawkins

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the sixteenth of July, 2003

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 03022305-12

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Sonya N. Johnson

109

A 2037220

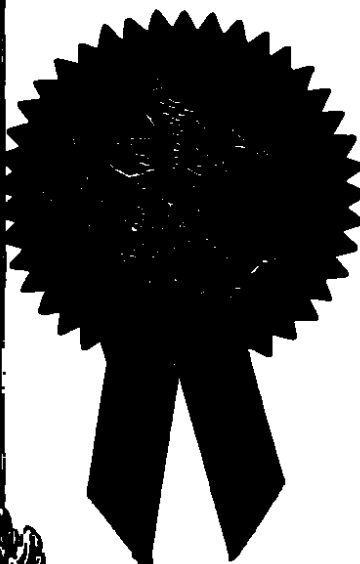
THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

July 11, 2003

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
FEBRUARY 19, 2003.



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

M. K. HAWKINS
Certifying Officer

C O L O M B I A

107

110

RECO

02-24-2003



102370074

2/19/03

Case Docket No. 21327 US1

To the Honorable Commissioner of Patents and Trademarks: Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

- 1) Pascal Sebastian Bailon
- 2) Chee-Youb Won

Additional name(s) of conveying

party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: HOFFMANN-LA ROCHE INC.

Internal Address: _____

3. Nature of conveyance:

- ☒ Assignment ☐ Merger
- ☐ Security Agreement ☐ Change of Name
- ☐ Other _____

Street Address: 340 KINGSLAND STREET

City: NOTLEY State: NJ Zip: 07110

Execution Date: January 10, 2003

Additional name(s) & address(es) attached:
Yes ☐ No ☒

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No.(s)

B. Patent No.(s)

U.S. PROVISIONAL APPLN. SERIAL NO. 60/439,213

FILED: January 10, 2003

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

02/21/2003 10:02:21 00000000 00000000 60439213
01 FEB03 44.00 CH

REL 013763 FRAME 0132

108

111

5. Name and address of party to whom
correspondence concerning document
should be mailed:

Name: GEORGE W. JOHNSTON

Internal Address:

HOFFMANN-LA ROCHE INC.

PATENT LAW DEPARTMENT

Street address: 340 KINGSLAND STREET

City: NOTLEY State: NJ Zip: 07110

6. Total number of applications and patents
involved: ONE

7. Total fee (37 CFR 3.41).....\$ 40.00

☒ Authorized to be charged to deposit
account

☒ Authorized any deficiencies to be
charged to deposit account

8. Deposit account number:

08-2525

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct
and any attached copy is a true copy of the original document.

WILEEN M. EBEL

Name of Person Signing



Signature

FEBRUARY 11, 2003

Date

CONTACT: Bettyann Hadamus

TELEPHONE: (973) 235-4383

FAX: (973) 235-2363

Total number of pages including cover sheet, attachments and document: 4

REL 013763 FRAME 0133

109

112

ASSIGNMENT

WHEREAS, WE, Pascal Sebastian Bailon, Chee-Youb Won (Assignors) have invented certain new and useful improvements which are described and claimed in application for United States Patent and identified as Case Docket No. 21327 US1, entitled

PEGYLATED T1249 POLYPEPTIDE

WHEREAS, HOFFMANN-LA ROCHE INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of New Jersey, and having its principal place of business at Nutley, New Jersey, is desirous of acquiring the entire interest in and to said invention, said application and the Patent to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, for and in consideration of One Dollar (\$1.00) and other good and valuable consideration to us in hand paid, the receipt and sufficiency whereof are hereby acknowledged, we have sold, assigned, and set over, and by these presents do hereby sell, assign, and set over unto the said HOFFMANN-LA ROCHE INC. (Assignee), and said Assignee's legal representatives, successors, the entire right, title and interest, for the whole world, in and to said invention and said application, as well as any subsequent application which claims priority based upon the filing date of said application identified as Case Docket No. 21327 US1 and the patents, both domestic and foreign, that may or shall result therefrom including the right to claim in respect of any subsequent United States and foreign patent applications and patents, the priority date of said application under any United States statute and international convention or treaty; and we do hereby authorize and request the issuance of said patents, domestic and foreign, conformably to the terms of this Agreement.

UPON SAID CONSIDERATION, we do hereby covenant and agree with the said Assignee that we will not execute any writing or do any act whatsoever conflicting with these presents, and that we will at any time upon request, without further or additional consideration, but at the expense of the said Assignee, execute such additional assignments and other writings and do such additional acts as said Assignee may deem necessary or desirable to perfect the Assignee's enjoyment of this grant, and render all necessary assistance in making application for and obtaining provisional, original, continuation, continuation-in-part, divisional, reissued, re-examined or extended Patent of the United States or of any and all foreign countries on said invention, and in enforcing any rights or choses in action accruing as a result of such applications or patents, including but not limited to, giving testimony in any proceedings or transactions involving such applications or patents, and executing preliminary statements and other affidavits, it being understood that the foregoing covenant and agreement shall bind and inure to the benefit of the assigns and legal representatives of all parties hereto.

REL 013763 FRAME 0134

110

113

IN WITNESS WHEREOF, we have hereunto set our hands and affixed our seals this 10th day of January, 2003.

Nutley, New Jersey, U.S.A.

Pascal Sebastian Bailon
Pascal Sebastian Bailon

Chee-Youb Won
Chee-Youb Won

ACKNOWLEDGMENT

United States of America)
State of New Jersey)
County of Essex)

On January 10, 2003, before me personally appeared Pascal Sebastian Bailon, Chee-Youb Won to me known to be the persons described in the foregoing Assignment, who acknowledged that they executed the foregoing Assignment of their own free will for the purposes therein set forth.

Lou Ann Donatoni

LOU ANN DONATONI
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires March 26, 2003

126649

RECORDED ON: 02/19/2003

REL 013763 FRAME 0135

114

112

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: LOU ANN DONATONI

3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO PÚBLICO DE NEW JERSEY

4. LLEVA EL SELLO DEL: LOU ANN DONATONI, NOTARIO

CERTIFICADO

5. EN: TRENTON, NEW JERSEY.

6. EL: 23 DE MAYO DE 2003

7. POR: JOHN E McCORMAC, CPA, TESORERO

8. BAJO EL NO.: A172884

9. SELLO: HAY GRAN SELLO EN ALTO RELIEVE

10. FIRMADO POR: JOHN E McCORMAC

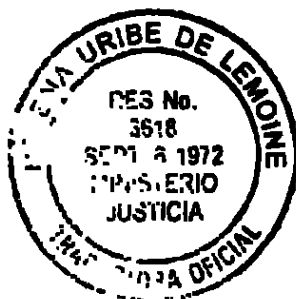
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
309519
JERSEY
Cuya firma aparece en el
documento desahogado
las funciones indicadas

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2005 ENE 17 P 11:31
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



115

113

Expediente No. 21327 US

CESIÓN

HOFFMANN-LA ROCHE INC. (Cedente), una sociedad del Estado de Nueva Jersey, Estados Unidos de América, cuyas oficinas principales están situadas en Nutley, New Jersey, Estados Unidos de América, por medio del presente cede a

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (Cesionario)

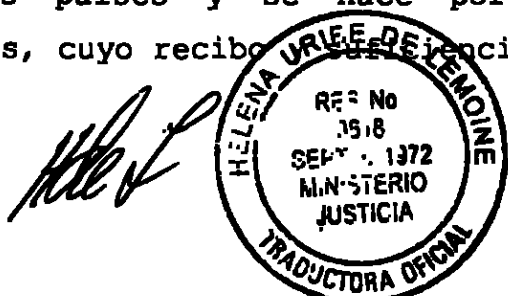
124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle, Suiza

todos sus derechos, títulos e intereses para todos los países del mundo, salvo los Estados Unidos de América y sus territorios y posesiones, sobre el invento descrito y reivindicado en la solicitud de Patente de los Estados Unidos Serie No. 60/398,190, radicada el 24 de Julio de 2002 y titulada

POLIPÉPTIDO T1249 PEGILADO

por Pascual Sebastian Bailon y Chee-Youb Won, así como sus posteriores solicitudes en todos los países del mundo, salvo en los Estados Unidos de América y sus territorios y posesiones, con las posteriores reivindicaciones de solicitudes de esta solicitud Serie No. 60/398,190, como prioridad; y con respecto al invento y a las solicitudes de patentes locales y extranjeras sobre dicha invención, la cesión de todos los derechos, títulos e intereses en la misma, para todo el mundo, a favor del Cedente, fue ejecutada el 21 de Agosto de 2002 por Pascal Sebastian Bailon y el 24 de Julio de 2002 por Chee-Youb Won.

La presente cesión tiene por objeto pero no está limitada a los siguientes países y se hace por buenas y valiosas consideraciones, cuyo recibo y autenticidad se reconocen:



116

114

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

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

El Cedente expresamente cede al Cesionario el derecho a radicar las correspondientes solicitudes de patente en todos los países del mundo, salvo en los Estados Unidos de América y a reclamar la fecha de prioridad bajo cualquier tratado o convenio internacional de cualquiera de las anteriores solicitudes de patentes de los Estados Unidos cedidas por el Cedente en la presente Cesión. El Cedente se compromete a ejecutar todas las cesiones adicionales y los documentos que puedan necesitarse, así como a llevar a cabo todos los actos adicionales necesarios para permitir al Cesionario disfrutar de todos los derechos de la presente Cesión.

POR Y A NOMBRE DE: HOFFMANN-LA ROCHE INC.,

FIRMADO: GEORGE W. JOHNSTON - VICEPRESIDENTE

Nutley, New Jersey, U.S.A.

FECHA: 6 DE SEPTIEMBRE DE 2002.



117

115

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

RECONOCIMIENTO

Estados unidos de América

Estado de New Jersey

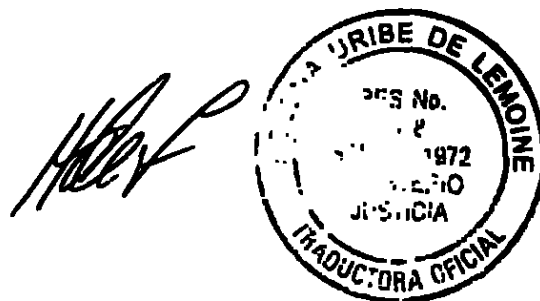
Condado de Essex

El 6 de Septiembre de 2002, ante mí compareció personalmente George W. Johnston, a quien conozco como la persona descrita en la anterior Cesión, y quien reconoció que ejecutó la anterior Cesión a nombre de Hoffmann-La Roche Inc., y que está facultado para ejecutar la anterior Cesión y para traspasar los derechos otorgados bajo la misma.

FIRMADO: LOU ANN DONATONI - NOTARIO PÚBLICO DE NEW JERSEY CON COMISIÓN HASTA EL 26 DE MARZO DE 2003.

HAY SELLO EN RELIEVE DEL NOTARIO

55386



AAB

116

APOSTILLE

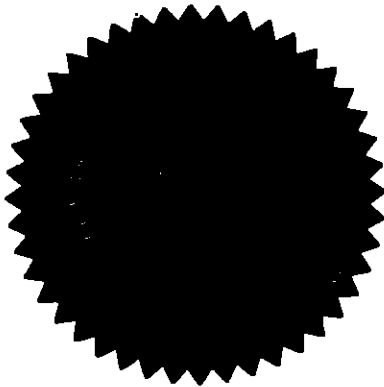
(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
LOU ANN DONATONI
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
LOU ANN DONATONI, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 23RD DAY OF MAY 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A172884
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE

John E McCormac



1A

ASSIGNMENT

HOFFMANN-LA ROCHE INC. (Assignor), a corporation of the State of New Jersey, United States of America, having its principal place of business at Nutley, New Jersey, United States of America, hereby assigns to

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG (Assignee)
124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle, Switzerland

all of its right, title and interest for all countries of the world except the United States of America and its territories and possessions, in and to the invention described and claimed in an application for United States Patent, Serial No. 60/398,190, filed on July 24, 2002, entitled

PEGYLATED T1249 POLYPEPTIDE

by Pascal Sebastian Bailon and Chee-Youb Won

as well as in any subsequent application(s) in all countries of the world, except the United States of America and its territories and possessions, which subsequent application(s) claims this application, Serial No. 60/398,190, as priority; and in respect of which invention and all such patent applications, domestic and foreign, on said invention, an assignment of all right, title and interest therein, for the whole world, in favor of Assignor was executed on August 21, 2002 by Pascal Sebastian Bailon and July 24, 2002 by Chee-Youb Won.

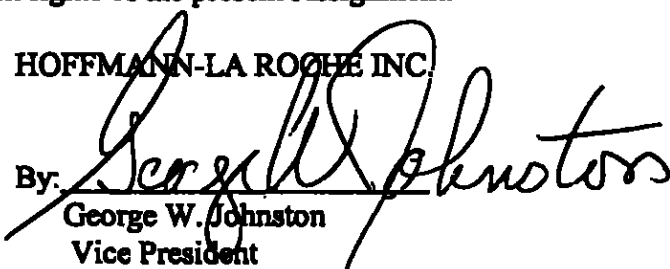
The present assignment is for, but is not limited to, the following countries and is for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged:

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, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, Venezuela.

Assignor expressly assigns to Assignee the right to file corresponding patent applications in all countries of the world except the United States of America and to claim the priority date under any international treaty or convention of any of the above U.S. patent application(s) assigned by Assignor in this present Assignment. Assignor agrees to execute any additional assignments and writings as well as to perform any additional acts necessary to enable Assignee to enjoy the full rights of the present Assignment.

Nutley, New Jersey, U.S.A.
Date: September 6, 2002

HOFFMANN-LA ROCHE INC.

By: 

George W. Johnston
Vice President

120

118

ACKNOWLEDGMENT

United States of America)
State of New Jersey)
County of Essex)

On September 6, 2002, before me personally appeared George W. Johnston to me known to be the person described in the foregoing Assignment, who acknowledged that (s)he executed the foregoing Assignment on behalf of Hoffmann-La Roche Inc., and that (s)he is empowered to execute the foregoing Assignment and to convey the rights granted thereunder.



LOU ANN DONATONI
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires March 26, 2003

55386

121

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: BETTYANN HEDEMUS

3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO PÚBLICO DE NEW JERSEY

4. LLEVA EL SELLO DE: BETTYANN HEDEMUS, NOTARIO

CERTIFICADO

5. EN: TRENTON, NEW JERSEY

6. EL: 23 DE MAYO DE 2003

7. POR: JOHN E. McCORMAC, CPA, TESORERO DE NEW JERSEY

8. BAJO EL NO.: A172921

9. SELLO: HAY SELLO EN ALTO RELIEVE DE NEW JERSEY

10. FIRMADO POR: JOHN E. McCORMAC

LA TRADUCTORA OFICIAL

HELENA URIBE DE LEMOINE



126

Expediente No. 21327 US1

CESIÓN

HOFFMANN-LA ROCHE INC. (Cedente), una sociedad del Estado de Nueva Jersey, Estados Unidos de América, cuyas oficinas principales están situadas en Nutley, New Jersey, Estados Unidos de América, por medio del presente cede a

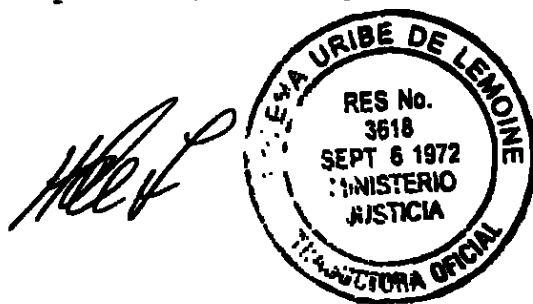
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (Cesionario)

124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle, Suiza

todos sus derechos, títulos e intereses para todos los países del mundo, salvo los Estados Unidos de América y sus territorios y posesiones, en el invento descrito y reivindicado en la solicitud de Patente de los Estados Unidos Serie No. 60/439,213, radicada el 10 de Enero de 2003 y titulada

POLIPÉPTIDO T1249 PEGILADO

por Pascal Sebastian Bailon y Chee-Youb Won, así como sus posteriores solicitudes en todos los países del mundo, salvo en los Estados Unidos de América y sus territorios y posesiones, con las posteriores reivindicaciones de solicitudes de esta solicitud Serie No. 60/439,213, como prioridad; con respecto a la invención y a las solicitudes de patentes locales y extranjeras sobre dicha invención, la cesión de todos los derechos, títulos e intereses en la misma, para todo el mundo, a favor del Cedente, fue ejecutada el 10 de Enero de 2003 por Pascal Sebastian Bailon y el 24 de Julio de 2002 por Chee-Youb Won.



123

121

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 004/2005.-

La presente cesión cubre pero no está limitada a los siguientes países y se hace por buenas y valiosas consideraciones, cuyo recibo y suficiencia se reconocen:

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

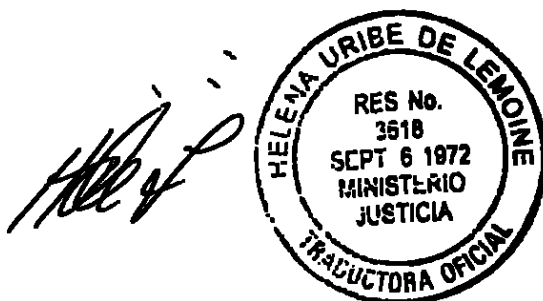
El Cedente expresamente cede al Cesionario el derecho a radicar las correspondientes solicitudes de patente en todos los países del mundo, salvo en los Estados Unidos de América y a reclamar la fecha de prioridad bajo cualquier tratado o convenio internacional de cualquiera de las anteriores solicitudes de patentes de los Estados Unidos cedidas por el Cedente en la presente Cesión. El Cedente se compromete a ejecutar todas las cesiones adicionales y los documentos que puedan necesitarse, así como llevar a cabo todos los actos adicionales necesarios para permitir al Cesionario disfrutar de todos los derechos de la presente Cesión.

POR Y A NOMBRE DE: HOFFMANN-LA ROCHE INC.,

FIRMADO: GEORGE W. JOHNSTON - VICEPRESIDENTE

Nutley, New Jersey, U.S.A.

FECHA: 4 DE FEBRERO DE 2003.



RECONOCIMIENTO

Estados unidos de América

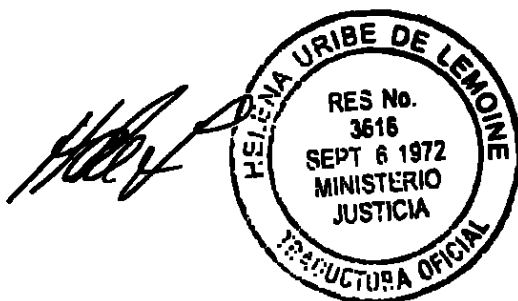
Estado de New Jersey

Condado de Essex

El 4 de Febrero de 2003, ante mí compareció personalmente George W. Johnston, a quien conozco como la persona descrita en la anterior Cesión, y quien reconoció que ejecutó la anterior Cesión a nombre de Hoffmann-La Roche Inc., y que está facultado para ejecutar la anterior Cesión y para traspasar los derechos otorgados bajo la misma.

FIRMADO: BETTYANN HEDEMUS - NOTARIO PÚBLICO DE NEW JERSEY CON COMISIÓN HASTA EL 25 DE SEPTIEMBRE DE 2007.

55386



123

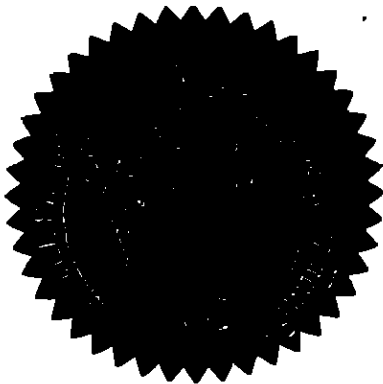
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
BETTYANN HEDEMUS
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
BETTYANN HEDEMUS, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 23RD DAY OF MAY 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A172921
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E McCormac

ASSIGNMENT

HOFFMANN-LA ROCHE INC. (Assignor), a corporation of the State of New Jersey, United States of America, having its principal place of business at Nutley, New Jersey, United States of America, hereby assigns to

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG (Assignee)
124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle, Switzerland

all of its right, title and interest for all countries of the world except the United States of America and its territories and possessions, in and to the invention described and claimed in an application for United States Patent, Serial No. 60/439,213, filed on January 10, 2003, entitled

PEGYLATED T1249 POLYPEPTIDE

by Pascal Sebastian Bailon and Chee-Youb Won

as well as in any subsequent application(s) in all countries of the world, except the United States of America and its territories and possessions, which subsequent application(s) claims this application, Serial No. 60/439,213, as priority; and in respect of which invention and all such patent applications, domestic and foreign, on said invention, an assignment of all right, title and interest therein, for the whole world, in favor of Assignor was executed on January 10, 2003 by Pascal Sebastian Bailon and Chee-Youb Won.

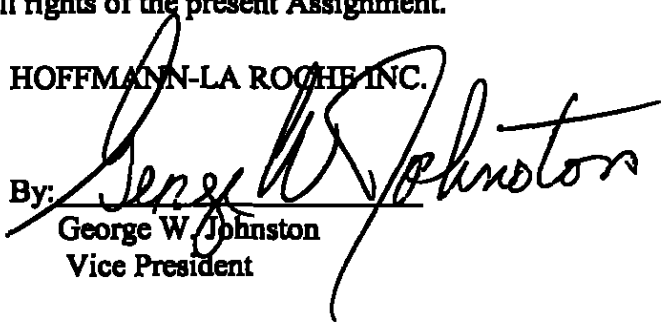
The present assignment is for, but is not limited to, the following countries and is for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged:

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, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, Venezuela.

Assignor expressly assigns to Assignee the right to file corresponding patent applications in all countries of the world except the United States of America and to claim the priority date under any international treaty or convention of any of the above U.S. patent application(s) assigned by Assignor in this present Assignment. Assignor agrees to execute any additional assignments and writings as well as to perform any additional acts necessary to enable Assignee to enjoy the full rights of the present Assignment.

Nutley, New Jersey, U.S.A.
Date: February 4, 2003

HOFFMANN-LA ROCHE INC.

By: 
George W. Johnston
Vice President

125

ACKNOWLEDGMENT

United States of America)
State of New Jersey)
County of Essex)

On February 4, 2003, before me personally appeared George W. Johnston to me known to be the person described in the foregoing Assignment, who acknowledged that (s)he executed the foregoing Assignment on behalf of Hoffmann-La Roche Inc., and that (s)he is empowered to execute the foregoing Assignment and to convey the rights granted thereunder.

Bettyann Hedemus
BETTYANN HEDEMAUS
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
Commission Expires 9/26/2007

55386

128

Radicacion : 63003091 00000000 **Folios:** 120
Fecha (AMD): 2005-01-19 16:13:34
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 3020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD []

- | | | |
|---|-----|----|
| ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente | [x] | 1 |
| ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [x] | 1 |
| ◆ Descripción de la invención | [x] | 27 |
| ◆ Dibujos de ser estos pertinentes | [x] | 78 |
| ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas | [x] | 2 |

COMPLETA [x]

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 | [] |

COMPLETÀ []

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 trazado | [] |
| ◆ | Comprobante de pago de las tasas establecidas | [] |

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Claudia M Nivo
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

127

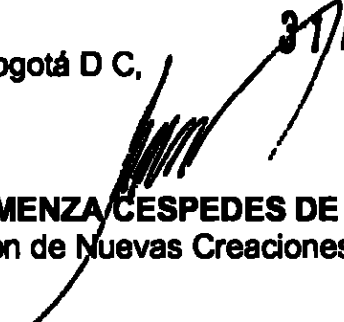
2020
Bogotá D C

Doctor(a)
ALICIA LLOREDA SARMIENTO
Apoderado(a)
F.HOFFMANN-LA ROCHE

REFERENCIA:	Radicación N°	05-3891
	Solicitud internacional	PCT/EP2003/007711
	Fecha limite inicio fase nacional	2005-02-24
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio N°	1889
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486, de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la oficina de comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la Decisión 486.

Cúmplase
Dado en Bogotá D C, **31/ENE. 2005**


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe División de Nuevas Creaciones (