

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

05-87779

54. TITULO PROCESO PARA PREPARAR DIDESOXIINOSINA USANDO ENZIMA DE ADENOSINA
DESAMINASA

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K31/52 ; A61P31/18

71. SOLICITANTE BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

DOMICILIO PRINCETON, NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO HECTOR GOMEZ MEJIA

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C. 01/09/2005

SS

PETITORIO

AS: 98.585



Radicación: 0508779 00000000 Folios: 154
Fecha (AHD): 2005-09-01 17:00:41
Tramite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

04-10-05

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY**
Dirección: P.O. Box 4000, Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543-4000, Estados Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos
Lugar de Constitución: Estados Unidos
Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **HECTOR GOMEZ MEJIA**
Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9
Teléfono: 380-2200 Fax: 380-2700
E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 22720 TP 19436

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **Paul M. Skonezny, Michael Politino, Suo W. Liu, Alfred W. Boyle, Jason G. Chen, Gregory L. Stein, Thomas Franceschini, Wendy L. Anderson**
Dirección: 3471 Van Wie Drive East, Baldwinsville, NY 13027, US; 111 Century Drive, Syracuse, NY 13209, US; 4997 Firethorn Circle, Manlius, NY 13104, US; 4836 Westfield Drive, Manlius, NY 13104, US; 4956 Tinderbox Circle, Manlius, NY 13104, US; 870 Country Route 84, Mallory, NY 13103, US; 8635 Honeycomb Path, Cicero, NY 13039, US; 217 Mexico Point Drive, Mexico, NY 13114, US (Respectivamente)
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/006103 Fecha 27-02-2004
Publicación Internacional No. WO 2004/078993 A2 Fecha 16-09-2004

Título (54): PROCESO PARA PREPARAR DIDESOXIINOSINA USANDO ENZIMA DE ADENOSINA DESAMINASA

7 Clasificación Internacional (51) C07H19/167 A61K31/52 A61P31/48

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

04-03-2003

(31) Número de Solicitud

60/451,842

9 Comprobante de pago No. 05-56.560

Fecha 1-09-2005

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

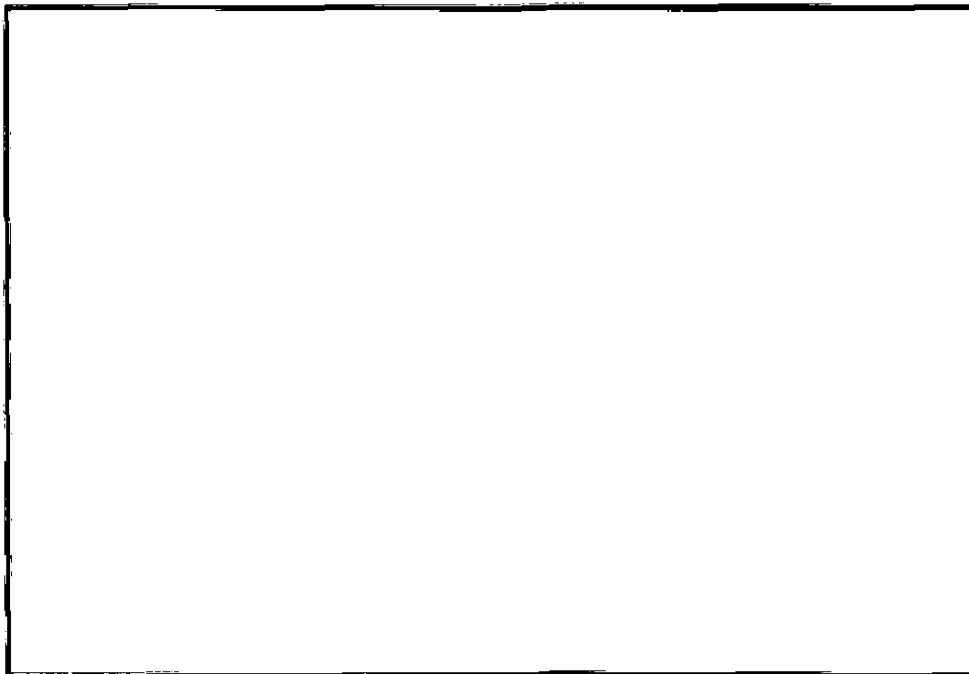
2020-F06 (01-11-15)

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$443.000
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ 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 efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: Tarjeta de Propietarios

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: HECTOR GÓMEZ MEJÍA

FIRMA:

Hector Gómez Mejía

C.C. 22720 de Bogotá T.P. 19436 del C.S.J.

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

Radicacion : 05007779 65000000
Fecha (AHU): 2005-07-01 17:00:41
Folios: 154
Tramite : 011 PAT-PAIENI 3/3 FASE PAU1 411 PRESEMIAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 56,560
FECHA : JULIO 29 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	34987975	29/07/2005	15,730,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Folio 3 together
proprietor
en

Radicación : 05007779
Fecha (DPO): 2005-07-02 17:00:41
Folios: 154
Trámite : 011 001-PRIME 379 FISE MDC 411 PRESEMI-
Dependencia: 2860 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 56,560
FECHA : JULIO 29 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	34987975	29/07/2005	15,730,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

From the INTERNATIONAL BUREAU

G-40111-WP-PCT

PCT**NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED**

To:

**BAXAM, Deanna
Bristol-Myers Squibb Company
P.O. Box 4000
Princeton, NJ 08543-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUE**

Bafam

H

M

Date of mailing (day/month/year)

16 September 2004 (16.09.2004)

Applicant's or agent's file reference

GY0111

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US2004/006103

International filing date (day/month/year)

27 February 2004 (27.02.2004)

Priority date (day/month/year)

04 March 2003 (04.03.2003)

Applicant

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:



copy of the international application as published by the International Bureau on 16 September 2004 (16.09.2004) under No. WO 2004/078993



copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO

For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

**RECEIVED
BMS PATENT LAW**

SEP 20 2004

Docketed Item _____

Due Date _____

Attorney _____

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Beate Giffo-Schmitt

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 87 20

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 September 2004 (16.09.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/078993 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12Q
(21) International Application Number: PCT/US2004/006103
(22) International Filing Date: 27 February 2004 (27.02.2004)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60/451,842 4 March 2003 (04.03.2003) US

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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

(71) Applicant (for all designated States except US): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; Route 206 and Province Line Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SKONEZNY, Paul, M. [US/US]; 3471 Van Wie Drive East, Baldwinsville, NY 13027 (US). POLITINO, Michael [US/US]; 111 Century Drive, Syracuse, NY 13209 (US). LIU, Sui, W. [US/US]; 4997 Firethorn Circle, Manlius, NY 13104 (US). BOYLE, Alfred, W. [US/US]; 4836 Westfield Drive, Manlius, NY 13104 (US). CHEN, Jason, G. [CN/US]; 4956 Tinderbox Circle, Manlius, NY 13104 (US). STEIN, Gregory, L. [US/US]; 870 Country Route 84, Mallory, NY 13103 (US). FRANCESCHINI, Thomas [US/US]; 8635 Honeycomb Path, Cicero, NY 13039 (US). ANDERSON, Wendy, L. [US/US]; 217 Mexico Point Drive, Mexico, NY 13114 (US).

(74) Agents: BAXAM, Deanna et al.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, 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)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations

Published:

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

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: PROCESS FOR PREPARING DIDEOXYINOSINE USING ADENOSINE DEAMINASE ENZYME

(57) Abstract: A method of making didanosine (ddI) including the steps of: (a) obtaining an enzyme expressing ddA deaminase activity; (b) immobilizing the enzyme onto an insoluble support; (c) contacting the enzyme with a dideoxyadenosine (ddA) solution of at least about 4% weight volume ddA in water for a time and under conditions to produce a ddI solution; and (d) isolating the ddI from the ddI solution. Optionally, the ddI mother liquor is reused in subsequent runs to improve yield.

WO 2004/078993 A2

PROCESS FOR PREPARING DIDEOXYINOSINE
USING ADENOSINE DEAMINASE ENZYME

5 This application claims a benefit of priority from U.S. Provisional Application No. 60/451,842, the entire disclosure of which is herein incorporated by reference.

Field of the Invention

 The present invention relates generally to a method of making 2',3'-dideoxyinosine (ddI) from 2',3'-dideoxyadenosine (ddA), more particularly, the
10 present invention relates to a method of making ddI using adenosine deaminase enzyme (ADA) derived from a human ADA nucleotide sequence.

Description of the Background Art

 Dideoxynucleosides are relatively stable nucleoside analogs. The
15 dideoxynucleoside 2',3'-dideoxyinosine (ddI) has been shown to have useful pharmacological activity as antiviral agents. Hartman, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* 47:647 (1990). In particular, ddI has been shown as useful when used alone or in combination with 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) in the treatment of AIDS. Use of ddI has become increasingly important in light of the development of AZT
20 resistant strains of human immunodeficiency virus.

 Efforts to synthesize dideoxynucleosides in the laboratory have been reported, such as the deoxygenation of nucleosides at the 2' or 3' position. *Chem. Pharm. Bull.*, 22:128 (1974). However, chemical synthesis is difficult due to steric
25 hinderance and the instability of nucleosides under temperature and pH conditions normally required to drive reactions. Furthermore, the starting materials for the synthesis are costly and not available in bulk. To date, it has not been possible to scale up laboratory scale synthesis of dideoxynucleosides to industrial scale commercial production of these compounds.

30 A number of processes are known for industrial scale production of ddI by enzymatic deamination of dideoxyadenosine (ddA) by adenosine deaminase.

Synthesis of ddI by deaminating 2',3'-dideoxyadenosine using bovine adenosine deaminase has been reported. Webb et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 7(2):147-153 (1988). Scale up of a process of synthesizing ddI using bovine adenosine deaminase has also been reported, including optimization of parameters, such as solvents and buffers. *Nucleosides & Nucleotides*, 10(7):1499-1505 (1991).

U.S. Patent No. 5,011,774 to Farina *et al.*, discloses a process in which an anomeric mixture of (D)-2',3'-dideoxyadenosine is reacted with an ADA in a suitable solvent to selectively favor the rate of enzymatic deamination of the more active β -anomer of ddI. The process uses commercially available ADA derived from calf spleen. This process avoids the steps of chromatographic and crystallization techniques necessary to separate out the undesirable α -anomer. However, a possible disadvantage of using this process is the risk of transmission of Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) when bovine sources of the enzyme are used.

U.S. Patent No. 4,970,148 to Yokozaki *et al.* discloses a process in which 2',3'-dideoxyadenosine (ddA) is contacted with a culture solution of a microorganism containing ADA enzymes capable of converting the ddA to ddI. The process uses a culture solution of whole microorganisms, cell homogenates, or products of cells treated with lysozyme, salt, surface active agents, or the like as the source of the ADA. One disadvantage of this method is that the natural source of the enzyme is inherently unstable at a pH in excess of 8 and requires strict pH control. When performed at a pH less than 8, the product ddI is only soluble in very dilute concentrations (<1% weight volume). As a result, the method produces very little ddI per batch. Furthermore, the ddI so derived must undergo extensive purification procedures to remove residual protein contamination in order to obtain the purified ddI product. These purification procedures are costly and can result in loss of product and reduced yields.

Japanese Patent Applications No. 5-219978 to Noguchi *et al.*, discloses a method of producing nucleic acid related substances such as ddI including cloning the gene coding for the appropriate enzyme, constructing an expression vector with

regulatory sequences resulting in high expression of the gene, transforming a microorganism with the expression vector to form a transformant, inducing expression of the cloned gene, and extracting and isolating the enzyme so expressed. The isolated enzyme is then used to produce the desired nucleic-acid-related substance by reaction with a suitable starting material, such as ddA. This method produces a 100 fold increase in the amount of enzyme available for use as compared to the Yokozeki patent. However, the enzymes isolated according to this method are microbial enzymes. As such, at least with respect to the ADA, the enzyme lacks stability at pH values greater than 8. As a result, in order to obtain acceptable yields, the pH must be closely regulated. Furthermore, this method produces a product that is in intimate contact with the ADA. The reaction mixture is contaminated with impurities such as unreacted ddA, nucleic acid by-products as well as the ADA and the product. Consequently, extensive purification methods must be performed in order to isolate the ddI from the reaction mixture. Such purification methods typically require repeated liquid chromatography or thin layer chromatography. These purification procedures are not amenable to commercial scale up.

U.S. Patent No. 4,962,193 to Yokozeki *et al.*, discloses a method of purifying ddI from a process using an enzyme which uses a porous, non-polar resin to adsorb the ddI onto the resin, separating the resin from solution, and fractionally eluting the adsorbed ddI to obtain purified product. However, this method is preceded by treatment to remove proteins and concentrate and filter the solution containing the product prior to the final purification step. As a result, this method can be costly and time consuming.

There is a present need for an industrial scale method of making ddI that provides satisfactory yield without the risk of transmission of TSE or the need to undergo extensive purification procedures to remove residual protein, and that uses an enzyme which is stable over a broad pH range.

Summary of the Invention

The present invention is generally directed to a method of making ddI by contacting ddA with an enzyme having ddA deaminase activity, which is immobilized on an insoluble support. The present invention provides a method of making
5 didanosine (ddI) including the steps of: (a) obtaining an enzyme expressing ddA deaminase activity; (b) immobilizing the enzyme onto an insoluble support; (c) contacting the enzyme with a dideoxyadenosine (ddA) solution of at least about 4% weight volume ddA in water for a time and under conditions to produce a ddI solution; and (d) isolating the ddI from the ddI solution. Optionally, the resulting ddI
10 mother liquor is reused in subsequent runs to improve yield.

Detailed Description of the Invention

The present invention is directed to methods of making ddI from ddA in a cost effective and reliable manner which avoids the shortcomings of the prior art methods.
15

Previous methods of preparing ddI from ddA involve using commercially available ADA, such as bovine ADA (available from Sigma) or ADA derived from growing *E. coli* transformed with microbial ADA. The methods involve admixture of the enzyme in solution with ddA to convert the ddA to ddI. Next, the ddI must be
20 removed from a solution containing a variety of contaminants, including the enzyme. This requires substantial purification and separation to obtain ddI from the contaminated reaction mixture.

In contrast to these prior art methods, the present invention uses ADA, or
25 other enzyme capable of deaminating ddA, in an immobilized state. The immobilization assists in improving stability of the enzyme in the reaction mixture. More importantly, the immobilization allows for easy separation of the ddI final product from the reaction mixture because a main contaminant, namely the enzyme, remains immobilized on an insoluble support.

30

The invention further provides a new source of ADA. In a preferred embodiment of the invention, ddI is made from ddA using ADA derived from

growing organisms transformed with human ADA or conservative derivatives thereof. One advantage of the present method is that human ADA is more stable than microbial ADA over a broader pH range. When the reaction can be performed at a pH in excess of about 8 the ddA remains stable and conversion efficiency to ddI is improved. An additional advantage is that the ddI remains in solution at these pH's much more readily than at a pH of less than about 8. The characteristic of improved solubility of the product ddI at high pH (>8) helps to enable reaction at higher concentrations, and thus provide improved yields of ddI.

10 The inventive methods use human ADA enzyme or other enzyme having ddA deaminase capability, that has been immobilized onto an insoluble support. The present invention takes useful advantage of the improved stability afforded the enzyme which results from such immobilization. As a result, the reaction of ddA to ddI can proceed at pH ranges that typically denature or otherwise interfere with the activity of the enzyme. Additionally, immobilization of the ADA imparts a convenient characteristic to the ADA, namely the ability to separate the enzyme from the reaction product by simple filtration methods.

Preparing Adenosine Deaminase (ADA)

20 The ADA of particular interest in the present invention is human ADA or a conservative variant thereof, having amino acid sequence SEQ ID NO:1 (Genbank Accession number gil14043373). The human version of ADA was selected due to its superior structural stability to that of microbial origin. In particular, the human ADA maintains significant activity in a relatively wide pH and range as compared to microbial ADA. Furthermore, the human ADA is more resistant to degradation at elevated temperatures as compared to that of microbial origin. The DNA sequence of the human ADA is published as a cDNA sequence derived from human mRNA which is a 1,533 base sequence. See, Gwendolyn, S. *et al.*, *Mol. and Cellular Biology*, 4(9):1712-1717 (1984).

30 The published sequence, or certain conservative variations thereof, may be used to code for and obtain the desired ADA. SEQ ID NO:2 (Genbank Accession

number gil14043372) is the published human cDNA sequence. Desirably, especially when using *E. coli* as the host, SEQ ID NO:3 (Genbank Accession number gil140433732) is used. SEQ ID NO:3 is a conservative variant of the published human cDNA in which codon preference substitutions have been made for arginine, glycine, leucine, isoleucine and proline. As the genetic code is degenerated, these codon substitutions do not result in an alteration of the amino acids coded for by the sequence. Rather, the substitution improves recognition of the codons by *E. coli*. The following codon preference substitutions may be used:

10

Table 1 - Codon Preference Substitutions

Amino Acid	Mammalian Codon	Substitute Codon
Arginine	AGG	CGT
"	AGG	CGC
"	CGG	CGC
"	CGG	CGT
"	AGA	CGC
Glycine	GGA	GGT
"	GGG	GGT
"	GGG	GGC
Isoleucine	ATA	ATT
Leucine	TTA	CTG
"	CTA	CTC
"	CTC	CTG
"	CTT	CTG
Proline	CCC	CCG
"	CCA	CCG
"	CCT	CCG
"	CCA	CCG

15 The invention further includes use of sequences including other minor modifications, and all naturally occurring alleles, of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:1 that result in enzymes which have substantially equivalent activity. Modifications may be deliberate, as by site-directed mutagenesis, or may be spontaneous mutations. Alleles may be from any species. Preferred alleles are of
20 human origin. The invention includes use of all of these polypeptides so long as the activity of the enzyme in deaminating ddA is retained.

For example, the invention also includes conservative variations or equivalent variants of SEQ ID NO:1. The terms "conservative variation" and "equivalent variant" as used herein denote the replacement of amino acids by other amino acids that have similar chemical and biological properties, or that are generally considered equivalent.

For example, it is known in the art to substitute amino acids in a sequence with equivalent amino acids, i.e. conservative variations. Groups of amino acids normally considered to be equivalent are:

10

Ala (A), Ser (S), Thr (T), Pro (P), Gly (G);

Asn (N), Asp (D), Glu (E), Gln (Q);

His (H), Arg (R), Lys (K);

Met (M), Leu (L), Ile (I), Val (V); and

15

Phe (F), Tyr (Y), Trp (W).

Substitutions, additions, and/or deletions in the enzyme sequences may be made as long as the function of the ADA used in the methods of the invention is maintained. Equivalent enzymes will normally have substantially the same amino acid sequence as the native enzyme. An amino acid sequence that is substantially the same as another sequence, but that differs from the other sequence by means of one or more substitutions, additions and/or deletions, is considered to be an equivalent sequence, equivalent variant or conservative variation. Preferably, less than 25%, more preferably less than 10%, of the number of amino acid residues in a sequence are substituted for, added to, or deleted from the proteins of the invention.

The human ADA can be prepared by methods known in the art. Such methods include biological synthesis and chemical synthesis. In biological synthesis, the enzyme may be isolated directly from cells. Alternatively, it is known to prepare the enzyme by providing DNA that encodes the enzyme, amplifying or cloning the DNA, expressing the DNA in a suitable host, and harvesting the enzyme. For example, the enzyme may be translated either directly or indirectly from a cDNA encoding the

30

enzyme amino acid sequence. In chemical synthesis, the four bases are used as raw materials to assemble the known amino acid sequence.

A. Obtaining the Nucleic Acid Sequence which Codes for ADA

5 The DNA encoding the ADA may be derived from an appropriate cDNA library by methods known in the art. See, for example, Gwendolyn, S. *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 4(9):1712-1717 (1984), the entirety of which is herein incorporated by reference. The sequence has been assigned GenBank Accession No. GI: 14043372.

10

Generally, the entire DNA strand or additional fragments of the DNA can be isolated by using a known DNA or a fragment thereof as a probe. To do so, restriction fragments from a genomic or cDNA library may be identified by Southern hybridization using labeled oligonucleotide probes. For example, DNA encoding the enzyme can be isolated from human homogenated tissue by using a fragment of the known sequence to prepare one or more oligonucleotide probes. The probe is labeled and used to screen a genomic or cDNA library in a suitable vector, such as phage lambda. The cDNA library may be prepared from mRNA by known methods, such as those described in Gubler and Hoffman, *Gene*, 25:263-270 (1983). Oligonucleotide probes can be used to screen cDNA libraries from different tissues. The oligonucleotide probe should be labeled so that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. These methods are well known in the art. The DNA isolated is sequenced, and the sequence used to prepare additional oligonucleotide probes. This procedure may be repeated to obtain overlapping fragments until a complete open reading frame is produced.

15
20
25

Methods for DNA amplification and cloning are well known in the art. See, for example, Sambrook and Russel, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001), the entirety of which is herein incorporated by reference. It is convenient to amplify the clones in the lambda-gt10 or lambda-gt11 vectors using lambda-gt10 or lambda-gt11-specific oligomers as the amplimers (available from Clontech, Palo Alto, CA). Other amplification procedures

30

that are well known in the art such as ligase chain reaction (LCR), Repair Chain Reaction (RCR), and PCR oligonucleotide ligation assay (PCR-OLA) can also be used to amplify the nucleic acids of the invention.

5 As an alternative to the aforementioned biological synthesis of the gene, it is possible to chemically synthesize the gene, based on the reported DNA sequence using methods known in the art. Such methods include those described in "Modern machine-aided methods of oligonucleotide synthesis", Brown T and Dorcas, J.S., In Oligonucleotide and Analogues a Practical Approach, Ed. F. Eckstem, IRL Press, 10 Oxford UK (1995), the entirety of which is herein incorporated by reference. DNA can also be synthesized by preparing overlapping double-stranded oligonucleotides, filling in the gaps, and ligating the ends together. See, generally, Sambrook *et al.*, and Glover, D.M. and Hames, B.D., eds. Cloning, 2nd Ed., Vols. 1-4, IRL Press, Oxford, UK (1995).

15

In the event there is any concern regarding potential viral contamination related to human sources of DNA, such as for compliance with regulatory requirements, then the chemical synthesis method of obtaining the DNA is preferred.

20 B. Expressing the ADA

The recombinant DNA molecules, obtained as described above, contain polynucleotide sequences encoding human ADA. This recombinant DNA may be cloned in a suitable host cell and expressed by methods well known in the art. Generally, the cloned gene is provided with expression vectors which direct 25 expression of the enzyme in an appropriate host cell. The enzyme may be then be recovered from the host cell. See, Sambrook *et al.* (2001), for methods relating to the manufacture and manipulation of nucleic acids.

The amplified or cloned DNA can be expressed in a suitable vector, preferably 30 an expression vector, by methods known in the art. See, generally, Sambrook *et al.* (2001). Expression vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operably linked. Expression vectors of utility in recombinant DNA

techniques are often in the form of plasmids. However, the invention may include other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses, and the like), which serve equivalent functions.

Preferably, the expression vector is a plasmid, as disclosed in U.S. Patent No.

5 6,068,991, the entirety of which is herein incorporated by reference.

Vector DNA, preferably in the form of expression vectors including regulatory sequences, can be introduced into prokaryotic or eukaryotic host cells via conventional transformation or transfection techniques. As used herein, the terms
10 "transformation" and "transfection" are intended to refer to a variety of art-recognized techniques for introducing foreign nucleic acid into a host cell, including calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, liposome mediated transfection (lipofection), or electroporation. Suitable methods for transforming or transfecting host cells can be found in Sambrook, *et al.* (*supra*), and
15 other laboratory manuals.

The expression vectors preferably contain at least one expression control sequence that is operatively linked to the DNA sequence or fragment to be expressed. The control sequence is selected on the basis of the host cells to be used for
20 expression and inserted in the vector in order to control and to regulate the expression of the cloned DNA sequence.

Within a recombinant expression vector, "operably linked" is intended to mean that the nucleotide sequence of interest is linked to the regulatory sequence(s) in a
25 manner which allows for expression of the nucleotide sequence (e.g., in an *in vitro* transcription/translation system or in a host cell when the vector is introduced into the host cell).

The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers
30 and other expression control elements (e.g., polyadenylation signals). Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Regulatory

sequences include those which direct constitutive expression of a nucleotide sequence in many types of host cells and those which direct expression of the nucleotide sequence only in certain host cells (e.g., tissue-specific regulatory sequences).

5 Examples of useful expression control sequences are the *lac* system, the *trp* system, the *tac* system, the *trc* system, major operator and promoter regions of phage lambda, the control region of fd coat protein, the glycolytic promoters of yeast, e.g., the promoter for 3-phosphoglycerate kinase, the promoters of yeast acid phosphatase, (e.g., Pho5), the promoters of the yeast alpha-mating factors, and promoters derived
10 from polyoma, adenovirus, retrovirus, and simian virus, e.g., the early and late promoters or SV40, and other sequences known to control the expression of genes of prokaryotic or eukaryotic cells and their viruses or combinations thereof.

 Examples of suitable inducible non-fusion *E. coli* expression vectors include
15 regulatory sequences such as pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) and pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods to Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990)). Target gene expression from the pTrc vector relies on host RNA polymerase transcription from a hybrid *trp-lac* fusion promoter. Target gene expression from the pET 11d vector relies on transcription
20 from a T7 *gnl0-lac* fusion promoter mediated by a co-expressed viral RNA polymerase (T7 *gnl*). This viral polymerase is supplied by host strains BL21(DE3) or HMS174(DE3) from a resident lambda prophage harboring a T7 *gnl* gene under the transcriptional control of the *lacUV 5* promoter.

25 Suitable host cells can be any prokaryotic (e.g., *E. coli*) or eukaryotic cell (e.g., insect cells, yeast or mammalian cells). Some suitable prokaryotic hosts include, for example, *E. coli*, such as *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* DH5 α , *E. coli* X2282, *E. coli* DH1, and *E. coli* MRC1, *E. coli* BL21, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., such as *B. subtilis*, and *Streptomyces* sp. Suitable eukaryotic cells
30 include yeasts and other fungi, insect, animal cells, such as COS cells and CHO cells, human cells and plant cells in tissue culture. Preferably, the host cell is *E. coli*.

It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, and the like. The expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce ADA,
5 including fusion proteins or peptides, encoded by nucleic acids as described herein.

Often, in fusion expression vectors, a proteolytic cleavage site is introduced at the junction of the fusion moiety and the recombinant protein to enable separation of the recombinant protein from the fusion moiety subsequent to purification of the
10 fusion protein. Such enzymes, and their cognate recognition sequences, include Factor Xa, thrombin and enterokinase. Typical fusion expression vectors include pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL, (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) which fuse glutathione S-transferase (GST), maltose E binding protein, or protein A, respectively,
15 to the target recombinant protein.

One strategy to maximize recombinant protein expression in *E. coli* is to express the protein in a host bacteria with an impaired capacity to proteolytically cleave the recombinant protein (Gottesman, Gene Expression Technology: Methods
20 in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) pp. 119-128). Another strategy is to alter the nucleic acid sequence of the nucleic acid to be inserted into an expression vector so that the individual codons for each amino acid are those preferentially utilized in *E. coli* (Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Such alteration of nucleic acid sequences of the invention can be carried out
25 by standard DNA synthesis techniques or site-specific mutagenesis.

The cells are grown under conditions well known in the art. Expression of the cloned gene is induced to express large amounts of the enzyme. Preferably, an *E. coli* expression vector is used including the *lac* system promoter system. Expression of
30 ADA is preferably induced using IPTG.

C. Isolation and Purification of ADA

Generally, enzymes can be isolated from a solubilized cell fraction by standard methods. Some suitable methods include precipitation and liquid chromatographic protocols such as ion exchange, hydrophobic interaction, and gel filtration. See, for example, Methods Enzymol. - Guide to Protein Chemistry, Deutscher, Ed., Section VII pp. 182-309 (1990); and Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, New York (1987), which are herein incorporated by reference.

Alternatively, purified material is obtained by separating the enzyme on preparative SDS-PAGE gels, slicing out the band of interest and electroeluting the protein from the polyacrylamide matrix by methods known in the art. The detergent SDS is removed from the protein by known methods, such as by dialysis or the use of a suitable column, such as the Extracti-Gel column from Pierce. Mixtures of enzymes can be separated by, for example, SDS-PAGE in accordance with the method of Laemmli, *Nature* 227:680-685 (1970). Such methods are well known in the art.

There are no particular limitations to the method of purifying the protein so long as undesirable contamination is effectively removed. An economical method is to break down the cells by passing the fermentation broth through a microfluidizer to release the enzyme from the cells. Addition of a filter aid and a floccing agent (e.g., PEI, available from VWR International, South Plainfield, NJ) to the stirred broth renders the contaminants such as proteins and other cellular debris insoluble. A suitable filter aid is CELFTE (available from World Minerals, Inc., Santa Barbara, CA). The soluble enzyme may then be removed from the broth by filtration with an appropriately sized filter. Desirably, the filter will allow the soluble active enzyme to pass through while allowing insoluble fractions of cellular proteins and other contaminants to be retained by the filter. The enzyme can then be concentrated in solution using an ultrafilter. A 30,000 molecular weight cut off (MWCO) filter is useful for this purpose.

30

Assay ADA Activity

The enzyme so derived should be assayed for activity. As used herein, a unit (U) of enzymatic activity is that amount of enzyme which will deaminate 1 μ mol of ddA per minute at 37°C. Desirably, the final enzyme titer is from about 650-750

5 U/ml. The assay may be performed by adding enzyme to a 2.4% solution of ddA at 37°C. The reaction is allowed to proceed for 15 min while gently stirring.

Tetrahydrofuran is added to stop the reaction. A sample is taken and run on HPLC to determine the amount of ddI formed.

10 **Immobilizing ADA**

Once the enzyme is purified, it is desirable to treat the enzyme solution with an appropriate buffer to a pH of about 7.3 to about 7.6. There are no particular limitations to the type of buffer used, although phosphate buffer is preferred.

Desirably, the solution is diluted with buffer to an activity of from about 250 to about
15 350 U/ml.

The purified enzyme is first immobilized onto a support that is insoluble in the reaction solution before reaction with ddA. There are no particular limitations as to the type of support used so long as the enzyme may be immobilized thereon. In
20 general, the aforementioned dilute solution of buffered enzyme is added to a solution containing an insoluble support, some of which require activation by an activating agent such as a crosslinking reagent. The crosslinking reagent serves to covalently bond the ADA to the support via an amine group on the ADA.

25 The support remains insoluble, and maintains the enzyme insoluble in the reaction solution, during the course of the reaction. Desirably, the support is a solid resin material having a diameter of about 250-600 microns. Suitable supports include, for example, IPS-400 (available from U.O.P., Des Plaines, IA) or EUPERGIT (available from Rohm America Inc, Piscataway, NJ).

30

There are no particular limitations to the crosslinking agent as long as it covalently attaches the enzyme to the support. Selection of crosslinking agents will

depend on the support selected and will be readily apparent to those having skill in the art. Suitable combinations of resin support and crosslinking agents are Celite and glutaraldehyde, IPS-400 and glutaraldehyde, Sepharose and CNBr and resin supports functionalized with either primary amines or carboxyls and carbodiimides. Other
5 appropriate combinations of solid and crosslinking reagents will be apparent to those having ordinary skill in the art.

The immobilization of enzyme onto the support may be performed in a batch or continuous process. A batch process may be performed, for example, by mixing
10 the buffered enzyme solution with activated support for a number of hours. The immobilized enzyme is then collected using a simple filtration technique. The particle retention size will be determined by the size of the solid support. For use with IPS-400, a filter having a particle size retention of from about 20 μm to about 30 μm is useful. Vacuum may be applied to speed recovery, however the support should
15 not be dried.

Alternatively, the activated support can be collected on a filter with particle retention size sufficient to retain the solid support. The buffered enzyme solution is then passed over the support. The enzyme mother liquor from the filtration will be
20 passed through the filter repeatedly to maximize immobilization of the enzyme. In a continuous process, the solid support may be slurried and poured into a chromatography column. After recovery the immobilized enzyme is rinsed with water to remove any impurities or unbound enzyme. Preferably, a titer of the immobilized enzyme is at least about 40U.

25

Reacting ddA with ADA

The immobilized ADA is then admixed with a ddA solution to obtain ddI. During reaction of ddA to ddI, ammonia is generated. Since ddA is added to the enzyme in more concentrated solutions than in the prior art, the ammonia byproduct
5 in the mixture can cause the pH to be elevated in a range of from about 9.2 to about 9.5. Use of microbial ADA or unbound ADA under these conditions is not expected to proceed to completion because the enzyme will become inactivated at these elevated pH's. However, use of the human version of the ADA immobilized on a solid support diminishes such degradation. As a result, the ADA retains activity and
10 the reaction proceeds at a faster, more productive pace, than has heretofore been possible.

The reaction is performed at a temperature of from about 20°C to about 50°C. Desirably, the reaction is maintained at a temperature of about 25-30°C. The reaction
15 can be performed at lower temperatures, however this will result in a longer reaction time. Performing the reaction at temperatures in excess of about 50°C can result in impairment of enzymatic activity and/or denaturing of the enzyme.

Commercially available ddA (available from Ajinomoto, Tokyo, Japan) is
20 added to the immobilized ADA in water in a batch or continuous bulk process. The reaction may proceed using concentrations of ddA well above those used in methods in which the ADA is not immobilized. An acceptable range of concentration of ddA in the reaction solution is from about 1% to about 15%. Desirably, a solution of about 4% to 10% of ddA, more desirably a solution of about 5-6% ddA in water is added to
25 the immobilized ADA. The reaction is allowed to proceed under conditions and for a time so that until about 1% or less of the ddA remains.

In a batch process, the ddA will be added to a suspension of immobilized ADA in water and allowed to react. Complete reaction should take about 5 to 8
30 hours. Once completed, the immobilized ADA can be recovered for reuse by filtration followed by washing with water. Furthermore, the mother liquor, after removal of ddI product, can be reused to maximize yield.

10

In a continuous process, a ddA solution may be added to a column packed with immobilized ADA. Desirably, the height to diameter ratio will be about 6, although the ratio is not critical. The ddA solution will be added at a rate and for a time so that about 1% or less of the ddA remains. Complete reaction should take about 120 hours. The flow rate will be dependent on the size of the column, concentration of ddA, and temperature of the reaction. Alternatively, a continuous process may be used in which the ddA solution is recycled through the packed column. The ddA solution will be recycled at a rate and for a time so that about 1% or less of the ddA remains. The flow rate will be dependent on the size of the column, concentration of ddA, and temperature of the reaction. Selection of the rate of introduction of ddA solution will be readily apparent to those of skill in the art.

Recovering ddI

After reacting the ddA to ddI, the ddI is present in solution in the form of an ammonium salt at high pH (>8). In the recovery step, the ddI is removed from solution. This is achieved by crystallizing the ddI out of solution. A simple distillation process may be used to drive off ammonia, a side product of reaction and produce the free acid form of ddI. The distillation can be performed sequentially with a first distillation bringing the solution to a concentration of about 10-12% (based on initial ddA) followed by addition of water and further distillation until the concentration again reaches about 10-12% and the pH of the ddI slurry is less than about 8. The suspension may then be cooled to about 0-5°C and held for at least one hour.

The ddI can be filtered and the cake washed with acetone. The solids may then be dried to a constant weight, for example under vacuum at about 45-50°C. Desirably, the reaction mother liquor may be retained for reuse in the batch or continuous processes reacting ddA to ddI. Additionally, the aqueous wash may also be reused.

Yields of about 82% may be obtained without any recycling. However, when the reaction mother liquor is recycled, yields can be increased to about 96-99%. The resulting ddi is greater than 99% pure.

5 The following Examples are intended to show the practice of the invention and are not intended to restrict the scope of the present invention. All percentages are in weight/volume unless otherwise indicated.

The entire disclosure of each document cited (including patents, patent applications, journal articles, abstracts, laboratory manuals, books, Genbank Accession numbers, SWISS-PROT Accession numbers, or other disclosures) in the Background of the Invention, Detailed Description, Brief Description of the Figures, and Examples is hereby incorporated herein by reference in its entirety. Further, the hard copy of the Sequence Listing submitted herewith, in addition to its corresponding Computer Readable Form, are incorporated herein by reference in their entireties.

Example 1

Preparation of recombinant *E. coli* transformed with a human adenosine deaminase (ADA) gene

E. coli expression plasmid, pBMS2000, was digested with restriction enzymes, BspHI and BamHI, and fractionated on 0.7% agarose gel. The fragment corresponding to the 4.5 Kb was excised from the gel, eluted, concentrated by ethanol precipitation. The synthetic human ADA DNA was excised from the plasmid containing the gene coding for the human ADA gene with the restriction enzymes, Nco I and BamHI. The NcoI-Bam HI fragment containing the synthetic human ADA gene was ligated to the 4.5Kb fragment of pBMS2000 obtained by digestion with the restriction enzymes, BspHI and BamHI. The ligated DNA was transformed into *E. coli* host, BL21. The transformed cells were plated onto Lauria Broth agar plates supplemented with 30µg of neomycin sulfate. Restriction enzyme analysis was performed on some of the colonies as well as SDS-PAGE analysis. One of the

colonies with the correct restriction analysis and the enzymatic activity was selected to be carried forth.

Example 2

**Fermentation of recombinant *E. coli* containing
the synthetic human adenosine deaminase gene**

Fermentation Medium Formulations

Seed medium (per 100 ml)

Reagent	Amount
Soytone	1 g
Yeast extract	0.5 g
NaCl	0.16 g
Neomycin sulfate (657mg/g)	2.0 mg

Base medium (per liter)

Reagent	Amount
K ₂ HPO ₄	14 g
Citric acid	2 g
Yeast extract	3.2 g
NaCl	1.6 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.2 g
Neomycin Sulfate	18 mg
Glycerol	3.4 ml
PPG	0.2 ml

Feed medium (per liter)

Reagent	Amount
Cerelose	200 g
Yeast extract	100 g
Neomycin sulfate	18 mg

PH Control - Base

Reagent	Amount
Concentrated NH ₄ OH	250 ml
H ₂ O	750 ml

PH Control - Acid

Reagent	Amount
85 % Phosphoric acid	200 ml
Water	800 ml

A. Preparation of seed stock

0.2ml of thawed recombinant *E. coli* is inoculated into a 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of the seed medium as described above. This is incubated by shaking the flask in a gyratory incubator at 300 rpm at 28°C for 24 hours to prepare an inoculum.

B. Fermentation

50 ml of the inoculum is inoculated into a 5 liter fermenter having a 1 liter working volume. Operating conditions are: a temperature of 28°C; 1000 rpm agitation; aeration of 1 vvm; dissolved oxygen (DO) setting is recorded and defined at 100%; pH controlled with NH₄OH and phosphoric acid to pH 6.8 to 7.2.

2 liters of the feed medium is prepared as follows. Ramp feeding is initiated after 6 hours using a feeding rate of 5 ml/hr increasing at 1.2 ml/hr/hr. The cells are allowed to grow for 24 hours with monitoring. Air flow, feed rate, and temperature are adjusted as required to control DO to greater than or equal to 20% of the initial setting. The temperature of the culture is then decreased to 16°C. The cells are induced with isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) to the final concentration of 80 μ g/ml between 16-18 hours post-inoculation. The optical density at 600 nm is between 20-30. Monitoring and feeding is continued for 40-48 total hours or until the feed is utilized. The broth contains 84 units/ml of solution. (1 unit (U) = 1 μ mol of ddA deaminated/min at 37 °C).

Example 3

**Isolation and immobilization of the human ADA
from the recombinant *E. coli* fermentation**

10 L of fermentation broth is passed through a microfluidizer (M-110Y model, available from Microfluidics, Newton, MA). Operating pressure is at 12,000-20,000 psi until at least 90% of the activity is released from the cell. Activity is measured by taking a portion of the microfluidized broth, centrifuging the sample, and measuring the activity in the supernatant portion. The amount of activity in the supernatant

represents the amount of activity released. Normally one pass through the microfluidizer is required.

5 To 10 L of well-stirred microfluidized broth, is added 1.5 kg of CELITE (final concentration 15% w/v). Then, 0.30 L of 10 % aqueous polyethyleneimine (PEI) (final concentration 0.3% v/v) is added. This is stirred for at least 30 minutes then filter to remove the insolubles. The cake is washed with 3.0-4.0 L of water.

10 The clarified filtrate is ultrafiltrated through a 30,000 MWCO filter cassette (Pellicon 2 unit, polyethersulfone low protein binding cassette, 0.5 m² filter area, available from Millipore, Bedford, MA) to a final enzyme titer of between 650-750 U/ml. The sample is diluted with 1.25 L of 50 mM phosphate buffer pH 7.3-7.6 (to an enzyme activity of 250-350 U/ml).

15 To 550g IPS-400 protein immobilization support, is added 2.75 L of 2.5% glutaraldehyde. This is gently stirred at room temperature for 2 hours and decanted or filtered onto a size 60 mesh filter. The activated support is washed 10 times with 4 L water.

20 To the diluted enzyme solution (~0.95L) is added 1.10 kg activated IPS-400 immobilization support and gently stirred for 2 hours at 20-25 °C. The immobilized enzyme is collected on a filter having an effective pore size sufficient to retain the immobilization support and washed with 5 volumes of water.

25 Alternatively, the IPS-400 is slurried in tap water and collected on a Buchner funnel fitted with fast flow filter paper with 20 to 30 µm particle size retention (grade 604 or 415). Vacuum is applied to remove excess water but the support is not dried. The diluted enzyme is added to the resin, vacuum (20" Hg) is applied and the mother liquor collected. Vacuum is stopped, the mother liquor sampled (pass #1) for activity
30 then added back to the support and vacuum is reapplied. This is repeated four more

times for a total of five passes over the IPS-400. After the 5th pass, 1.5 L of water is added to the resin and vacuum applied to wash the immobilized enzyme.

5 As another alternative, the IPS-400 is slurried in tap water and poured into a chromatography column. The bed is allowed to settle, then water is passed through the column (up flow) to rinse the support. The diluted enzyme solution is pumped through the column (1 to 25 ml/min.). After addition of the enzyme, 1.5 L of water is pumped over the column to wash the immobilized enzyme.

10 The immobilized enzyme assays show an enzymatic activity of ~100U/g. (1 unit = 1 μ mol of ddA deaminated/min at 37°C).

Example 4

15 **Preparation of ddI from ddA using the recombinant human ADA
immobilized enzyme (batch)**

100.0 g ddA is added to 1900 ml of water at 30 °C (mother liquor from previous runs can also be used). After the ddA has been added (complete dissolution is not necessary), 4000 U of immobilized rec human adenosine deaminase is added.

20 The reaction is maintained at 30 °C while stirring. The reaction is complete (approximately 5-8 hours) when the level of residual ddA is less than or equal to 1% of the original amount of ddA added. The enzyme solids are removed by filtration (20-30 μ m media) and the enzyme cake is washed with 100 ml water. The used enzyme is held as a wet cake at 0-5 °C (for up to 72 hours) and can be recycled to

25 another batch. The ddI solution is filtered through a CUNO filtration pad (0.4 to 1 micron), then through 0.2 micron filter media.

Example 5**Preparation of ddI from ddA using the recombinant human ADA
immobilized enzyme (continuous column)**

5 A column (h/d ratio=6) is slurry packed with 380 U of immobilized rec human adenosine deaminase with water. The column is washed with 30 mM of NH_4OH to pH 9.5 then with water to pH 6.5-7.5. While maintaining the temperature at 20 °C, a 4 % solution of ddA in water is passed through the column at a rate of 7.2 ml/min. for 120 hours. The effluent from the column is at pH 9.2-9.5 and contains >99% ddI with
10 <1% ddA remaining. The resulting ddI solution is filtered through a CUNO pad and a 0.2 μ filter before final isolation.

Example 6**Preparation of ddI from ddA using the recombinant human ADA
15 immobilized enzyme (recycle column)**

 A column (h/d ratio=2.7) is slurry packed with 1000 U of immobilized rec human adenosine deaminase with water. 25.0 g of ddA is dissolved in 475 ml of water (or a mother liquor from previous batch, diluted with water to 475 ml) at 30 °C
20 in a 3-neck round bottom flask equipped with a mechanical stirrer. The ddA solution is circulated at 30 °C through the enzyme column at ~50ml/min (circulation speed can be varied as necessary).

 The reaction is complete (approximately 3-9.5 hours) when the level of
25 residual ddA is less than or equal to 1 % of the original amount of ddA added by HPLC analysis. The column is then rinsed with 25 ml of water and can be held at 0-5 °C (for up to 72 hours) for reuse. The resulting ddI solution is filtered through a CUNO pad and a 0.2 μm filter before final isolation.

Example 7**Isolation of ddI**

The ddI solution is distilled under vacuum at an internal batch temperature of 20-40 °C. The distillation is stopped when the concentration of ddI reaches 10-12 % w/v based on initial ddA. Typically the pH is 8.1-8.3 at this point. Additional water is added and distillation is then continued until the concentration again reaches 10-12 %, and the pH of the ddI slurry is less than 8 (typically 7.8-7.9). The ddI suspension is cooled to 0-5 °C and held for at least 1 hour. The cold slurry is filtered and the cake is washed with 0-5 °C water. The mother liquor and aqueous wash can be retained for recycling in another batch.

The cake is washed with 0-5°C acetone. The solids are dried under vacuum at 45-50°C to a constant weight. Yields of ~82 % for the first run and 96-99 % for four subsequent runs (>96 % overall) are expected with mother liquor recycling. The resulting ddI is >99 % pure.

Comparative Example 1**Comparison of *E. coli* ADA activity and recombinant human immobilized ADA**

Microbial ADA from recombinant *E. coli* was partially purified and isolated as an ammonium sulfate suspension. *E. coli* fermentation broth (42U ADA/mL, 2 L) was centrifuged and the cell pellet was collected and washed with 1 L 100 mM phosphate buffer pH 7.5. The cells were again centrifuged and resuspended in 2 L of the above buffer plus 20% glycerol. The cells were passed once through a microfluidizer. Cell debris was removed by centrifugation and the resulting supernatant was concentrated by ultrafiltration through a 30,000 MWCO cassette. The enzyme was concentrated to a final titer of 390U/mL. Ammonium sulfate was added to a 50% saturation, the resulting precipitate was collected by centrifugation and re-suspended in 100 ml deionized water. The final titer of the slurry was 740U/mL; the protein content of the slurry was ~75 mg/mL.

The following Table describes the conversion of a 52-60g/L solution of ddA in water to ddI using the microbial adenosine deaminase as described above versus an example using the recombinant human ADA immobilized enzyme following the general procedure in Example 4. As can be seen from the results of Table 2, the recombinant human immobilized enzyme is significantly more stable than microbial enzymes and allows for the completion of the reaction with less units of enzyme and in a short period of time.

Table 2 - Comparative Yields of ddA from *E. coli* Versus Recombinant Human ADA

Source of ADA	Enzymatic Activity (U/g ddA)	Reaction Temperature (°C)	Reaction Time (hours)	Conversion o ddA to ddI (%)
<i>E. coli</i> (NH ₄) ₂ SO ₄ suspension	87.5	40	16	16
<i>E. coli</i> (NH ₄) ₂ SO ₄ suspension	125	37	24	26
Recombinant human immobilized ADA	40	30	4.5	100
Recombinant human immobilized ADA	40	40	1.5	100

Thus, while there have been described what are presently believed to be the preferred embodiments of the present invention, other and further embodiments, modifications, and improvements will be known to those skilled in the art, and it is intended to include all such further embodiments, modifications, and improvements and come within the true scope of the claims as set forth below.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of making didanosine (ddI) comprising the steps of:
 - (a) obtaining an enzyme expressing ddA deaminase activity;
 - 5 (b) immobilizing the enzyme onto an insoluble support;
 - (c) contacting the enzyme with a dideoxyadenosine (ddA) solution of at least about 1% weight volume ddA in water for a time and under conditions to produce a ddI solution; and
 - (d) isolating the ddI from the ddI solution.
- 10 2. The method of claim 1, wherein the ddA solution in the contacting step is from about 2% to about 10% weight volume ddA in water.
3. The method of claim 1, wherein a pH during the contacting step is from about
15 8.0 to about 9.5.
4. The method of claim 3, wherein substantially all of the ddI resists precipitation out of the ddI solution in the contacting step.
- 20 5. The method of claim 1, wherein the insoluble support is functionalized to allow attachment of the enzyme thereto.
6. The method of claim 5, wherein the attachment of the enzyme to the insoluble support is achieved using an activating agent.
- 25 7. The method according to claim 1, wherein the enzyme is human adenosine deaminase (ADA).
8. The method of claim 7, wherein the ADA has the amino acid sequence of SEQ
30 ID NO:1, or conservative variations thereof.
9. The method of claim 7, wherein the ADA is coded for by a nucleotide having SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, or conservative variations thereof.

10. The method according to claim 1, wherein the obtaining step includes expressing human adenosine deaminase (ADA) or a conservative variant thereof in a transformed organism and isolating the ADA from the organism.
- 5 11. The method of claim 10, wherein the transformed organism is *E. coli*.
12. The method of claim 10, wherein the insoluble support is functionalized to allow attachment of the enzyme thereto.
- 10 13. The method of claim 12, wherein attachment of the enzyme to the insoluble support is achieved using an activating agent.
14. The method of claim 10, wherein an activity of the enzyme immobilized on the insoluble support is at least about 40 U/g.
- 15 15. The method of claim 10, wherein a pH during the contacting step is from about 7.5 to about 9.5.
16. The method of claim 10, wherein said contacting step is a continuous process performed using a packed column.
- 20 17. The method of claim 10, wherein the ddA solution in the contacting step is from about 4% to about 15% weight volume ddA in water.
- 25 18. The method of claim 17, wherein the ddA solution is from about 5% to about 8% weight volume ddA in water.
19. The method of claim 10, wherein the isolating step includes sequentially distilling the ddI solution and adding water until a ddI slurry in aqueous mother liquor is obtained and the pH is less than about 8.
- 30 20. The method of claim 10, further comprising the steps of:

- (a) retaining a reaction mother liquor after the isolating step; and
- (b) repeating the contacting step at least once using the reaction mother liquor to prepare the ddA solution; and
- (c) repeating the isolating step at least once.

5

21. The method of claim 20, wherein the isolating step produces a yield of at least about 96% ddI that is at least about 99% pure.

SEQUENCE LISTING

<110> Skonezny, Paul M.
Politino, Michael
Liu, Suo-Win
Alfred, Boyle
Chen, Jason
Stein, Gregory
Franceschini, Thomas
Anderson, Wendy

<120> Process for Preparing Dideoxyinosine Using Adenosine Deaminase Enzyme

<130> GY0111 PCT

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 363

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(363)

<223> gi 14043373

<400> 1

Met Ala Gln Thr Pro Ala Phe Asp Lys Pro Lys Val Glu Leu His Val
1 5 10 15

His Leu Asp Gly Ser Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg
20 25 30

Arg Arg Gly Ile Ala Leu Pro Ala Asn Thr Ala Glu Gly Leu Leu Asn
35 40 45

Val Ile Gly Met Asp Lys Pro Leu Thr Leu Pro Asp Phe Leu Ala Lys
50 55 60

Phe Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Ile Ala Gly Cys Arg Glu Ala Ile Lys
65 70 75 80

Arg Ile Ala Tyr Glu Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
85 90 95

Tyr Val Glu Val Arg Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys Val

100					105					110						
Glu	Pro	Ile	Pro	Trp	Asn	Gln	Ala	Glu	Gly	Asp	Leu	Thr	Pro	Asp	Glu	
115					120					125						
Val	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Gln	Gly	Leu	Gln	Glu	Gly	Glu	Arg	Asp	Phe	
130					135					140						
Gly	Val	Lys	Ala	Arg	Ser	Ile	Leu	Cys	Cys	Met	Arg	His	Gln	Pro	Asn	
145					150					155					160	
Trp	Ser	Pro	Lys	Val	Val	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	Tyr	Gln	Gln	Gln	Thr	
165					170					175						
Val	Val	Ala	Ile	Asp	Leu	Ala	Gly	Asp	Glu	Thr	Ile	Pro	Gly	Ser	Ser	
180					185					190						
Leu	Leu	Pro	Gly	His	Val	Gln	Ala	Tyr	Gln	Glu	Ala	Val	Lys	Ser	Gly	
195					200					205						
Ile	His	Arg	Thr	Val	His	Ala	Gly	Glu	Val	Gly	Ser	Ala	Glu	Val	Val	
210					215					220						
Lys	Glu	Ala	Val	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Glu	Arg	Leu	Gly	His	Gly	Tyr	
225					230					235					240	
His	Thr	Leu	Glu	Asp	Gln	Ala	Leu	Tyr	Asn	Arg	Leu	Arg	Gln	Glu	Asn	
245					250					255						
Met	His	Phe	Glu	Ile	Cys	Pro	Trp	Ser	Ser	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ala	Trp	
260					265					270						
Lys	Pro	Asp	Thr	Glu	His	Ala	Val	Ile	Arg	Leu	Lys	Asn	Asp	Gln	Ala	
275					280					285						
Asn	Tyr	Ser	Leu	Asn	Thr	Asp	Asp	Pro	Leu	Ile	Phe	Lys	Ser	Thr	Leu	
290					295					300						
Asp	Thr	Asp	Tyr	Gln	Met	Thr	Lys	Arg	Asp	Met	Gly	Phe	Thr	Glu	Glu	
305					310					315					320	
Glu	Phe	Lys	Arg	Leu	Asn	Ile	Asn	Ala	Ala	Lys	Ser	Ser	Phe	Leu	Pro	
325					330					335						

21

Glu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Leu Asp Leu Leu Tyr Lys Ala Tyr Gly
340 345 350

Met Pro Pro Ser Ala Ser Ala Gly Gln Asn Leu
355 360

<210> 2
<211> 1559
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> gi 14043372

<400> 2
ggcacgagggc gtggccggcc gcggccaccg ctggccccag ggaaagccga gcggccaccg 60
agccggcaga gaccaccga gcggcgggcg agggagcagc gccggggcgc acgagggcac 120
catggccccag acgcccgcct tcgacaagcc caaagtagaa ctgcatgtcc acctagacgg 180
atccatcaag cctgaanacca tcttatacta tggcaggagg agagggatcg cctcccagc 240
taacacagca gaggggctgc tgaacgtcat tggcatggac aagccgctca cccttcaga 300
cttcctggcc aagtttgact actacatgcc tgctatcgcg ggctgccggg aggctatcaa 360
aaggatcgcc tatgagtttg tagagatgaa ggccaagag gccgtggtgt atgtggaggt 420
gcggtacagt ccgcacctgc tggccaactc caaagtggag ccaatcccct ggaaccaggc 480
tgaaggggac ctcaccccag acgaggtggt gggccctagt ggccagggcc tgcaggaggg 540
ggagcgagac ttcgggggtca agggccggtc catcctgtgc tgcattgcgc accagcccaa 600
ctgggtcccc aaggtggtgg agctgtgtaa gaagtaccag cagcagaccg tggtagccat 660
tgacctggct ggagatgaga ccatcccagg aagcagcctc ttgcctggac atgtccaggc 720
ctaccaggag gctgtgaaga gcggcattca ccgtactgtc cacgccgggg aggtgggctc 780
ggccgaagta gtaaaagagg ctgtggacat actcaagaca gagcggctgg gacacggcta 840
ccacaccctg gaagaccagg ccctttataa caggctgcgg caggaaaaca tgcacttcga 900
gatctgcccc tggtcagct acctcactgg tgcttggag ccggacacgg agcatgcagt 960
cattcggtc aaaaatgacc aggttaacta ctcgctcaac acagatgacc cgctcatctt 1020
caagtccacc ctggacactg attaccagat gaccaaacgg gacatgggct ttactgaaga 1080

```

ggagttttaa aggctgaaca tcaatgcggc caaatctagt ttctctccag aagatgaaaa 1140
gagggagctt ctcgacctgc tctataaagc ctatgggatg ccaccttcag cctctgcagg 1200
gcagaacctc tgaagacgcc actcctccaa gccttcaccc tgtggagtca ccccaactct 1260
gtggggctga gcaacatddd tacatdddtt ccttccaaga agaccatgat ctcaatagtc 1320
agttactgat gctcctgaac cctatgtgtc catttctgca cacacgtata cctcggcagt 1380
gccgcgtcac ttctctgatt atgtgccctg gccagggacc agcgcccttg cacatgggca 1440
tggttgaatc tgaaaccttc cttctgtggc aacttgtact gaaaatctgg tgctcaataa 1500
agaagcccat ggctgggtggc atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1559

```

```

<210> 3
<211> 1103
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Sequence variant of gi 14043372

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)
<223> NCO I restriction site

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1098)..(1103)
<223> BAM HI restriction site

```

```

<400> 3
ccatggccca gacgccggcc ttcgacaagc cgaagtaga actgcatgtc cacctggacg 60
gttccatcaa gccggaaacc atcctgtact atggccgtcg tcgcggtatc gccctgccgg 120
ctaacacagc agaggggtctg ctgaacgtca ttggcatgga caagccgtg accctgccgg 180
acttctgtgc caagtttgac tactacatgc ctgctatcgc gggctgccgt gaggctatca 240
aacgtatcgc ctatgagttt gtagagatga aggccaaaga gggcgtggtg tatgtggagg 300
tgcgtacag tccgcacctg ctggccaact ccaaagtgga gccaatcccg tggaaccagg 360
ctgaagggga cctcaccocg gacgaggtgg tagccctcgt gggccagggc ctgcaggagg 420
gtgagcgtga cttcggcgtc aaggcccgtc ccatcctgtg ctgcatgcgc caccagccga 480
actggtcccc gaaggtggtg gagctgtgta agaagtacca gcagcagacc gtggtggcca 540
ttgacctggc tgggtgatgag accatcccag gcagcagcct cttgccgggt catgtccagg 600

```

cctaccagga ggctgtgaag agcggcattc accgtactgt ccacgccggt gaggtgggct 660
cggccgaagt agtaaaagag gctgtggaca ttctcaagac agagcgcctg ggtcacggct 720
accacacccct ggaagaccag gccctctata accgtctgcg ccaggaaaac atgcacttcg 780
agatctgccc gtggtccagc tacctcactg gtgcctggaa gccggacacg gagcatgcag 840
tcattcgccct caaaaatgac caggctaact actcgtcaa cacagatgac ccgctcatct 900
tcaagtccac cctggacact gattaccaga tgaccaaacg tgacatgggc ttactgaag 960
aggagtttaa acgtctgaac atcaatgcgg ccaaatctag ttctctcca gaagatgaaa 1020
agcgcgagct gctcgacctg ctctataaag cctatggcat gccaccgtca gcctctgcag 1080
gtcagaacct ctgataagga tcc 1103

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual

Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional

16 Septiembre 2004 (16.09.2004)

(10) Número de Publicación Internacional:

WO 2004/078993 A2

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes²: C12Q

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2004/006103

(22) Fecha de Presentación Internacional:

27 Febrero 2004 (27.02.2004)

(25) Lenguaje de presentación:

Inglés

(26) Lenguaje de Publicación:

Inglés

(30) Fecha de Prioridad:

60/451,842

4 Marzo 2003 (04.03.2003)

US

(71) Solicitante (para todos los estados designados excepto US):
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; Route 206 and
Province Line Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(72) Inventores; y

(73) Inventores/Solicitantes (para US únicamente): SKONEZNY,
Paul, M. [US/US]; 3471 Van Wie Drive East, Baldwinsville, NY
13027 (US). POLITINO, Michael [US/US]; 111 Century Drive,
Syracuse, NY 13209 (US). LIU, Suo, W. [US/US]; 4997 Firethorn
Circle, Manlius, NY 13104 (US). BOYLE, Alfred, W. [US/US]; 4836
Westfield Drive, Manlius, NY 13104 (US). CHEN, Jason, G.
[CN/US]; 4956 Tinderbox Circle, Manlius, NY 13104 (US). STEIN,
Gregory, L. [US/US]; 870 Country Route 84, Mallory, NY 13103
(US). FRANCESCHINI, Thomas [US/US]; 8635 Honeycomb Path,
Cicero, NY 13039 (US). ANDERSON, Wendy, L. [US/US]; 217
Mexico Point Drive, Mexico, NY 13114 (US).

(74) Agente: BAXAM, Deanna, et al; Bristol-Myers Squibb Company,
P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(81) Estados Designados (a menos que se indique de otra manera, para
cada tipo de protección nacional disponible): 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, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique de otra manera,
para cada tipo de protección regional disponible): Patente ARIPO
(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Patente
Euroasiática (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, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Declaraciones bajo la Regla 4.17:

- como el derecho del solicitante para aplicar y sea otorgada una
patente (Regla 4.17(ii) para las siguientes designaciones 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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW. Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Patente Euroasiática (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, CE, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- como el derecho del solicitante para reivindicar la prioridad de
la primera solicitud (Regla 4.17(iii) para todas las
designaciones

Publicada

- sin el reporte de búsqueda internacional y ser publicada en
la recepción del reporte

Para códigos de dos letras y otras abreviaciones, referirse a las
"Notas de dirección sobre códigos y abreviaciones" que aparecen
al inicio de cada publicación regular de la Gaceta del PCT.

(54) Título: PROCESO PARA PREPARAR DIDESOXIINOSINA USANDO ENZIMA DE ADENOSINA DESAMINASA

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método para elaborar didanosina (ddI) que incluye las etapas de: (a) obtener una
enzima que expresa actividad desaminasa ddA; (b) inmovilizar la enzima en un soporte insoluble; (c) poner en contacto la enzima
con una solución de didesoxiadenosina (ddA) por al menos aproximadamente 4% en peso de volumen de ddA en agua, por un tiempo
y bajo condiciones para producir una solución de ddI; y (d) aislar la ddI de la solución de ddI. Opcionalmente, el licor madre de ddI
es reutilizado en corridas subsecuentes para mejorar el rendimiento.

PROCESO PARA PREPARAR DIDESOXIINOSINA USANDO ENZIMA DE
ADENOSINA DESAMINASA

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere de manera general,
a un método para elaborar 2',3'-didesoxiinosina (ddI) a
partir de 2',3'-didesoxiadenosina (ddA), más particularmente,
la presente invención se refiere a un método para elaborar
ddI usando enzima adenosina desaminasa (ADA) derivada de la
10 secuencia de nucleótido ADA humana.

Antecedentes de la Invención

Los didesoxinucleósidos son análogos de nucleósido
relativamente estables. La 2',3'-didesoxiinoxina de
didesoxinucleósido (ddI) ha mostrado tener actividad
15 farmacológica útil como agentes antivirales. Hartman, et al.,
Clin. Pharmacol. Ther. 47:647 (1990). En particular, la ddI
ha sido mostrada útil cuando se usa sola o en combinación con
3'-azido-2',3'-didesoxitimidina (AZT) en el tratamiento del
SIDA. El uso de ddI ha llegado a ser incrementadamente
20 importante en vista del desarrollo de cepas resistentes a AZT
del virus de inmunodeficiencia humana.

Se han reportado esfuerzos por sintetizar los
didesoxinucleósidos en el laboratorio, tales como la
desoxigenación de nucleósidos en la posición 2' ó 3'. *Chem.*
25 *Pharm. Bull.*, 22:128 (1974). Sin embargo, la síntesis

química es difícil debido a la obstaculización estérica y a la inestabilidad de los nucleósidos bajo condiciones de temperatura y pH normalmente requeridas para conducir reacciones. Además, los materiales de partida para las
5 síntesis son costosos y no están disponibles en volumen. A la fecha, no ha sido posible aumentar progresivamente la síntesis a escala de laboratorio de didesoxinucleósidos para producción comercial a escala industrial de estos compuestos.

10 Se conocen un número de procesos para producción a escala industrial para ddI por desaminación enzimática de didesoxiadenosina (ddA) por adenosina desaminasa. La síntesis de ddI desaminando 2',3'-didesoxiadenosina usando adenosina desaminasa de bovino ha sido reportada. Webb et
15 al., *Nucleosides & Nucleotides*, 7(2):147-153 (1988). El aumento progresivo de un proceso para sintetizar ddI usando adenosina desaminasa de bovino también ha sido reportado, incluyendo la optimización de parámetros, tales como solventes y amortiguadores. *Nucleosides & Nucleotides*,
20 10(7):1499-1505 (1991).

La Patente Estadounidense No. 5,011,774 por Farina et al., describe un proceso en el cual una mezcla anomérica de (D)-2',3'-didesoxiadenosina se hace reaccionar con una ADA en un solvente adecuado para permitir selectivamente la
25 velocidad de desaminación enzimática de β -anómero de ddI más

activo. El proceso usa ADA comercialmente disponible derivado de bazo de ternera. Este proceso evita las etapas de técnicas cromatográficas y cristalización necesarias para separar el α -anómero indeseable. Sin embargo, una posible desventaja de
5 usar este proceso es el riesgo de transmisión de Encefalopatía Espongiforme Transmisible (EET), cuando las fuentes bovino de la enzima son usadas.

La Patente Estadounidense No. 4,970,148 por Yokozeki et al., describe un proceso en el cual 2',3'-
10 didesoxiadenosina (ddA) se pone en contacto con una solución de cultivo de un microorganismo que contiene enzimas de ADA capaces de convertir la ddA a ddI. El proceso usa una solución de cultivo de microorganismos completos, homogenados celulares, o productos de células tratadas con lisozima, sal,
15 agentes activos de la superficie o similares, como la fuente de ADA. Una desventaja de este método es que la fuente natural de la enzima es inherentemente inestable a un pH en exceso de 8 y requiere estricto control de pH. Cuando se realiza a un pH de menos de 8, el producto
20 ddI es solamente soluble en concentraciones muy dilutas (<1% volumen en peso). Como un resultado, el método produce muy poca ddI por lote. Además, la ddI así derivada debe someterse a procedimientos de purificación extensivos para remover la contaminación de proteína residual
25 para obtener el producto ddI purificado. Estos procedimientos

de purificación son costosos y pueden resultar en pérdida de producto y rendimientos reducidos.

Las Solicitudes de Patente Japonesas Nos. 5-219978 por Noguchi et al., describen un método para producir sustancias relacionadas con ácido nucleico tales como ddI que incluyen clonación del gen que codifica para la enzima apropiada, construcción de un vector de expresión con secuencias regulatorias que resultan en alta expresión del gen, transformación de un microorganismo con el vector de expresión para formar un transformante, induciendo la expresión del gen clonado y extrayendo y aislando la enzima así expresada. La enzima aislada es entonces usada para producir la sustancia relacionada con el ácido nucleico deseado por reacción con un material de partida adecuado tal como ddA. Este método produce un incremento de 100 veces en la cantidad de la enzima disponible para uso comparada con la patente de Yokozeki. Sin embargo, las enzimas aisladas de conformidad con este método son enzimas microbianas. Como tal, al menos con respecto a ADA, la enzima carece de estabilidad a valores de pH mayores de 8. Como un resultado, para obtener rendimientos aceptables, el pH debe ser estrechamente regulado. Además, este método produce un producto que está en contacto íntimo con la ADA. La mezcla de reacción se contamina con impurezas tales como ddA sin

reaccionar, derivados de ácido nucleico, así como también la ADA y el producto. Consecuentemente, métodos de purificación extensivos deben ser realizados para aislar la ddI a partir de la mezcla de reacción. Tales métodos de purificación típicamente requieren cromatografía líquida repetida o cromatografía de capa delgada. Estos procedimientos de purificación no son favorables al aumento progresivo comercial.

La Patente Estadounidense No. 4,962,193 por Yokosezi et al., describe un método para purificar ddI a partir de un proceso usando una enzima la cual usa una resina no polar, porosa, para adsorber la ddI en la resina, separar la resina de la solución y eluir de manera fraccional la ddI adsorbido para obtener el producto purificado. Sin embargo, este método está precedido por el tratamiento para remover proteínas y concentrados y filtrar la solución que contiene el producto previo a la etapa de purificación final. Como un resultado, este método puede ser costoso y consumidor de tiempo.

Existe una necesidad actual de un método a escala industrial para elaborar ddI que proporciona rendimiento satisfactorio sin el riesgo de transmisión de EET o la necesidad de someterse a procedimientos de purificación extensivos para remover la proteína residual, y que usa una enzima la cual es estable sobre un intervalo de pH amplio.

Sumario de la Invención

La presente invención se dirige de manera general a un método para elaborar ddI poniendo en contacto ddA con una enzima que tiene actividad de desaminasa de ddA, la cual es movilizada en un soporte insoluble. La presente invención proporciona un método para elaborar didanosina (ddI) que incluye las etapas de: (a) obtener una enzima que expresa actividad de desaminasa de ddA; (b) inmovilizar la enzima en un soporte insoluble; (c) poner en contacto la enzima con una solución de didesoxiadenosina (ddA) de al menos aproximadamente 4% en volumen en peso de ddA en agua por un tiempo y bajo condiciones para producir una solución de ddI; y (d) aislar la ddI de la solución ddI. Opcionalmente, el licor madre de ddI resultante es reutilizado en las corridas subsecuentes para mejorar el rendimiento.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se dirige a métodos para elaborar ddI a partir de ddA en una manera efectiva de costo y confiable, la cual evita las desventajas de los métodos de la técnica anterior.

Los métodos previos para preparar ddI a partir de ddA, involucran usar ADA comercialmente disponible, tal como ADA bovino (disponible de Sigma) o ADA derivada de crecimiento de *E. coli* transformado con ADA microbiana. Los métodos involucran mezclas de la enzima en solución con ddA

para convertir la ddA a ddI. Después, la ddI debe ser removida de una solución que contiene una variedad de contaminantes, que incluyen la enzima. Esto requiere purificación sustancial y separación para obtener ddI a
5 partir de la mezcla de reacción contaminada.

Contrario con estos métodos de la técnica anterior, la presente invención usa ADA, u otra enzima capaz de desaminar ddA en un estado inmovilizado. La inmovilización asiste en el mejoramiento de la estabilidad de la enzima en
10 la mezcla de reacción. De manera más importante, la inmovilización permite la fácil separación del producto final ddI a partir de la mezcla de reacción debido a que un contaminante principal, es decir, la enzima, permanece inmovilizada en un soporte insoluble.

15 La invención además proporciona una nueva fuente de ADA. En una modalidad preferida de la invención, la ddI se hace de ddA usando ADA derivada de organismos en crecimiento transformados con ADA humana o derivados conservativos de los mismos. Una ventaja del presente método es que la ADA humana
20 es más estable que la ADA microbiana durante un intervalo de pH más amplio. Cuando la reacción puede ser realizada a un pH en exceso de aproximadamente 8, la ddA permanece estable y la eficiencia de conversión a ddI es mejorada. Una ventaja adicional es que la ddI permanece en solución a estos pH
25 mucho más fácil que a un pH de menos de aproximadamente 8. La

característica de solubilidad mejorada del producto ddI a pH alto (>8) ayuda a permitir la reacción a concentraciones superiores, y de este modo proporciona rendimientos mejorados de ddI.

5 Los métodos inventivos usan enzima ADA humana u otra enzima que tiene capacidad de desaminasa de ddA, que ha sido inmovilizada sobre un soporte insoluble. La presente invención toma ventaja útil de la estabilidad mejorada proporcionada a la enzima, la cual resulta de tal
10 inmovilización. Como un resultado, la reacción de ddA a ddI puede proceder a intervalos de pH que típicamente se desnaturan o de otro modo, interfieren con la actividad de la enzima. Adicionalmente, la inmovilización de la ADA imparte una característica conveniente con la ADA, es decir, la
15 habilidad para separar la enzima del producto de reacción por métodos de filtración simples.

Preparación de Adenosina Desaminasa (ADA)

La ADA de interés particular en la presente invención, es la ADA humana o una variante conservativa de la
20 misma, que tiene la secuencia de aminoácido SEC ID NO.1 (Número de Acceso de Genbank gill14043373). La versión humana de ADA se seleccionó debido a su estabilidad estructural a aquella de origen microbiano. En particular, la ADA humana mantiene actividad significativa en un pH relativamente amplio
25 y varía comparado con la ADA microbiana. Además, la ADA

humana es más resistente a la degradación a temperaturas elevadas, comparada con aquél de origen microbiano. La secuencia de ADN de la ADA humana se publica como una secuencia de ADNc derivada de ARNm humano el cual es una
5 secuencia de 1,533 bases. Véase, Gwendolyn, S. et al., *Mol. and. Cellular Biology*, 4(9):1712-1717 (1984).

La secuencia publicada o ciertas variaciones conservativas de la misma, pueden ser usadas para codificar y obtener la ADA deseada. La SEC ID NO.2 (Número de Acceso de
10 Genbank gill14043372) es la secuencia de ADNc humana publicada. Deseablemente, especialmente cuando se usa *E. coli* como el hospedero, se usa la SEC ID NO.3 (Número de Acceso de Genbank gill140433732). La SEC ID NO. 3 es una variante conservativa del ADNc humano publicado, en el cual, se han
15 elaborado las sustituciones de preferencia de codón para arginina, glicina, leucina, isoleucina y prolina. Como el código genético es degenerado, estas sustituciones de codón no resultan en una alteración de los aminoácidos codificados por la secuencia. Preferentemente, la sustitución mejora el
20 reconocimiento de los codones por *E. coli*. Las siguientes sustituciones de preferencia de codón pueden ser usadas:

Tabla 1- Sustitución de Preferencia de Codón

Amino Ácido	Codón de Mamífero	Codón Sustituto
Arginina	AGG	CGT
"	AGG	CGC
"	CGG	CGC
"	CGG	CGT
"	AGA	CGC
Glicina	GGA	GGT
"	GGG	GGT
"	GGG	GGC
Isoleucina	ATA	ATT
Leucina	TTA	CTG
"	CTA	CTC
"	CTC	CTG
"	CTT	CTG
Prolina	CCC	CCG
"	CCA	CCG
"	CCT	CCG
"	CCA	CCG

La invención además incluye el uso de secuencias que incluyen las otras modificaciones menores, y todos los alelos que se originan naturalmente de la secuencia de aminoácido expuesta en la SEC ID NO.1, que resulta en enzimas las cuales tienen actividad substancialmente equivalente. Las enzimas pueden ser deliberadas, como por mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser mutaciones espontáneas. Los alelos pueden ser formados de cualquier especie. Los alelos preferidos son de origen humano. La invención incluye uso de todos estos polipéptidos tan pronto como la actividad de la enzima en la desaminación de ddA se retenga.

Por ejemplo, la invención también incluye variaciones conservativas o variantes equivalentes de la SEC

ID NO.1. Los términos "variación conservativa" y "variante equivalente" como se usan en este documento, denotan el reemplazo de aminoácidos por otros aminoácidos que tienen propiedades biológicas y químicas similares, o que son
5 generalmente considerados equivalentes.

Por ejemplo, se conoce, en la técnica sustituir aminoácidos en una secuencia con aminoácidos equivalentes, es decir, variaciones conservativas. Los grupos de aminoácidos normalmente considerados por ser equivalentes son:

10 Ala (A), Ser (S), Thr (T), Pro (P), Gly (G);
Asn (N), Asp (D), Glu (E), Gln (Q);
His (H), Arg (R), Lys (K);
Met (M), Leu (L), Ile (I), Val (V); y
Phe (F), Tyr (Y), Trp (W).

15 Se pueden hacer sustituciones, adiciones y/o supresiones en las secuencias enzimáticas, tan pronto como la función de la ADA usada en los métodos de la invención se mantenga. Las enzimas equivalentes normalmente tendrán sustancialmente la misma secuencia de aminoácido como la
20 enzima nativa. Una secuencia de aminoácido que es sustancialmente la misma como otra secuencia, pero que difiere de la otra secuencia por medio de una o más sustituciones, adiciones y/o supresiones, es considerada por ser una secuencia equivalente, variante equivalente o
25 variación conservativa. Preferiblemente, menos de 25%, más

preferiblemente menos de 10%, del número de los residuos de aminoácido en una secuencia son sustituidos por, agregados a, o suprimidos de las proteínas de la invención.

La ADA humana puede ser preparada por métodos conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen síntesis biológica y síntesis química. En la síntesis biológica, la enzima puede ser aislada directamente de las células. Alternativamente, se conoce preparar la enzima proporcionando ADN que codifica la enzima, amplificar o clonar el ADN, expresando el ADN en un hospedero adecuado y cosechar la enzima. Por ejemplo, la enzima puede ser traducida ya sea directamente o indirectamente a partir de ADNc que codifica la secuencia de aminoácido de la enzima. En síntesis química, las cuatro bases son usadas como materias primas parecidas a la secuencia de aminoácido conocida.

A. Obtención de la Secuencia de Acido Nucleico la cual Codifica para ADA

El ADN que codifica la ADA puede ser derivado de una biblioteca de ADNc apropiada por métodos conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Gwendolyn, S. et al., Molecular and Cellular Biology, 4(9):1712-1717 (1984), la totalidad del cual está en este documento incorporada por referencia. La secuencia ha sido asignada el No. de Acceso de Genbank GI: 14043372.

De manera general, la hebra de ADN completa o fragmentos adicionales del ADN pueden ser aislados usando un ADN conocido o un fragmento del mismo como una sonda. Para hacer esto, fragmentos de restricción de una biblioteca de 5 ADNc o genómica pueden ser identificados por hibridación Southern usando sondas de oligonucleótidos etiquetadas. Por ejemplo, el ADN que codifica la enzima puede ser aislado de tejido homogenado humano usando un fragmento de la secuencia conocida para preparar una o más sondas de oligonucleótido. La sonda se 10 etiqueta y usa para seleccionar una biblioteca de ADNc o genómica en un vector adecuado, tal como un fago lambda. La biblioteca de ADNc puede ser preparada de ARNm por métodos conocidos, tales como aquellos descritos en Gluber and Hoffman, Gene, 25:263-270 (1983). Las sondas de oligonucleótido pueden ser usadas para seleccionar 15 bibliotecas de ADNc a partir de diferentes tejidos. La sonda de oligonucleótido debe ser etiquetada de manera que pueda ser detectada después de la hibridación al ADN en la biblioteca siendo seleccionada. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. El ADN aislado es secuenciado y la 20 secuencia usada para preparar sondas de oligonucleótidos adicionales. Este procedimiento puede ser repetido para obtener fragmentos traslapantes hasta que se produce una estructura lectora abierta completa.

Los métodos para amplificación y clonación de ADN 25 son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo,

Sambrook and Russel, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3era. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001), la totalidad del cual está en este documento incorporada por referencia. Es conveniente amplificar los clones en los
5 vectores lambda-gt10 o lambda-gt11 usando oligómeros específicos de lambda-gt10 o lambda-gt11 como los amplímeros (disponible de Clontech, Palo Alto, CA). Otros procedimientos de amplificación que son bien conocidos en la técnica tales como reacción en cadena de la ligasa (RCL), Reacción en
10 Cadena de Reparación (RCR) y ensayo de ligación de oligonucleótido por RCP (RCP-ELO), pueden también ser usados para amplificar los ácidos nucleicos de la invención.

Como una alternativa a la síntesis biológica mencionada anteriormente del gen, es posible sintetizar
15 químicamente el gen, basado en la secuencia de ADN reportada usando métodos conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen aquellos descritos en "Modern machine-aided methods of oligonucleotide synthesis", Brown T and Dorcas, J.S., En Oligonucleotide and Analogues a Practica Approach, Ed. F.
20 Eckstern, IRL, Press, Oxford UK (1995), la totalidad del cual está en este documento incorporado por referencia. El ADN puede también ser sintetizado preparando oligonucleótidos de doble hebra traslapantes, llenados en las hendiduras, y ligando los otros extremos. Véase de manera general, Sambrook
25 et al., y Glover, D.M. and Hames, B.D. eds. Cloning, 2da.

Ed., Vols. 1-4, IRL Press, Oxford, UK (1995).

En el caso de que exista alguna preocupación con respecto a la contaminación viral potencial relacionada a fuentes humanas de ADN, tales como para cumplir con los
5 requerimientos regulatorios, entonces se prefiere el método de síntesis química para obtener el ADN.

B. Expresando la ADA

Las moléculas de ADN recombinantes, obtenidas como se describe anteriormente, contienen secuencias de
10 polinucleótido que codifican la ADA humana. Este ADN recombinante puede ser clonado en una célula hospedera adecuada y expresado por métodos bien conocidos en el arte. De manera general, el gen clonado se proporciona con vectores de expresión los cuales dirigen la expresión de la enzima en
15 una célula hospedera apropiada. La enzima puede entonces ser recuperada de la célula hospedera. Véase, Sambrook et al., (2001) para métodos que se refieren a la manufactura y manipulación de ácidos nucleicos.

El ADN clonado o amplificado puede ser expresado en
20 un vector adecuado, preferiblemente un vector de expresión por métodos conocidos en la técnica. Véase, de manera general, Sambrook et al., (2001). Los vectores de expresión son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están operablemente ligados. Los vectores de expresión de
25 utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo,

en la forma de plásmidos. Sin embargo, la invención puede incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectivos de replicación, adenovirus y similares), los cuales sirven 5 funciones equivalentes. Preferiblemente, el vector de expresión es un plásmido, como se describe en la Patente Estadounidense No. 6,068,991, la totalidad de la cual está incorporada en este documento por referencia.

El vector de ADN, preferiblemente en la forma de 10 vectores de expresión que incluyen secuencias regulatorias, puede ser introducido en células hospederas procarióticas o eucarióticas vía técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usa en este documento, los términos "transformación" y "transfección" están propuestos para 15 referirse a una variedad de técnicas reconocidas en el arte para introducir ácido nucleico extraño en una célula hospedera, que incluye fosfato de calcio o co-precipitación de cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposoma (lipofección), o 20 electroporación. Métodos adecuados para transformar o transfectar células hospederas se pueden encontrar en Sambrook et al., (supra), y otros manuales de laboratorio.

Los vectores de expresión preferiblemente contienen al menos, una secuencia de control de expresión que está 25 operativamente ligada a la secuencia o fragmento de ADN a ser

expresado. La secuencia de control se selecciona en base a las células hospederas a ser usadas para expresión e insertadas en el vector para control y regular la expresión de la secuencia de ADN clonada.

5 Dentro de un vector de expresión recombinante, "operablemente ligado", está propuesto por significar que la secuencia de nucleótido de interés está ligada a la(s) secuencia(s) regulatoria(s) en una manera la cual permite la expresión de la secuencia de oligonucleótido (por ejemplo, en un
10 sistema de transcripción/traducción *in vitro*, o en una célula hospedera cuando el vector es introducido en la célula hospedera).

El término "secuencia regulatoria" está propuesto para incluir promotores, mejoradores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de
15 poliadenilación). Tales secuencias regulatorias se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las secuencias regulatorias incluyen aquellas las cuales dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótido en
20 muchos tipos de células hospederas y aquellas las cuales dirigen la expresión de la secuencia de nucleótido solamente en ciertas células hospederas (por ejemplo, secuencias regulatorias específicas del tejido).

Ejemplos de secuencias de control de expresión
25 útiles son el sistema lac, el sistema trp, el sistema tac, el

sistema trc, regiones promotoras y operadoras principales del fago lambda, la región de control de la proteína revestida fd, los promotores glicolíticos de levadura, por ejemplo, el promotor para la 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de fosfatasa ácida de levadura, (por ejemplo, Pho5), los promotores de los factores alfa-igualación de levadura y los promotores derivados de poliovirus, adenovirus, retrovirus y virus de simio, por ejemplo, los promotores temprano y tardío o SV40, y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de las células procarióticas o eucarióticas y sus virus o combinaciones de los mismos.

Ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* de fusión no inducible adecuados incluyen, secuencias regulatorias tales como pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) y pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods to Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990)). La expresión del gen objetivo a partir del vector pTrc confía en la transcripción de la polimerasa de ARN hospedera a partir de un promotor de fusión trp-lac. La expresión del gen objetivo a partir del vector pET 11d confía en la transcripción de un promotor de fusión T7 gnl0-lac mediado por una polimerasa de ARN viral co-expresada (T7 gnl). La polimerasa viral es suministrada por cepas hospederas BL21(DE3) o HMS174(DE3) a partir de un profago lambda residente que porta un gen T7 gnl bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.

42

Las células hospederas adecuadas pueden ser cualquier célula procariótica (por ejemplo, *E. coli*) o eucariótica (por ejemplo, células de insecto, células de levadura o mamífero). Algunos hospederos procarióticos
5 adecuados incluyen, por ejemplo, *E. coli* tal como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* DH5 α , *E. coli* X2282, *E. coli* DHI y *E. coli* MRC1, *E. coli* BL21, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., tales como *B. subtilis* y *Streptomyces* sp. Células eucarióticas adecuadas incluyen levaduras y otras
10 células de hongo, insecto, células animales, tales como células COS y células CHO, células humanas y células de plantas en cultivos de tejidos. Preferiblemente, la célula hospedera es *E. coli*.

Se apreciará por aquellos expertos en la técnica,
15 que el diseño del vector de expresión puede depender de tales factores, como la elección de la célula hospedera a ser transformada, el nivel de expresión de la proteína deseada y similares. Los vectores de expresión de la invención pueden ser introducidos en células hospederas para con ello,
20 producir ADA, que incluyen proteínas de fusión o péptidos codificados por ácidos nucleicos como se describe en este documento.

A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de desdoblamiento proteolítico en la
25 unión de la porción de fusión y la proteína recombinante para

permitir la separación de la proteína recombinante de la proteína de fusión subsecuente a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognato, incluyen, el Factor Xa, trombina y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen, pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1998) Gene 67:31-40), pMAL, (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), los cuales fusionan glutational S-transferasa (GST), proteína de enlace a la maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante objetivo.

Una estrategia para maximizar la expresión de proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria hospedera con una capacidad deteriorada para desdoblar proteolíticamente la proteína recombinante (Gottesman, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) pp. 119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico a ser insertado en un vector de expresión, de manera que los codones individuales para cada aminoácido son aquellos utilizados preferencialmente en *E. coli* (Wada et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118). Tal alteración de secuencias de ácido nucleico de la invención se puede llevar a cabo por técnicas de síntesis de ADN estándar o mutagénesis específica del sitio.

Las células se hacen crecer bajo condiciones bien conocidas en la técnica. La expresión del gen clonado se induce para expresar grandes cantidades de la enzima. Preferiblemente, un vector de expresión *E. coli* es usado incluyendo el sistema promotor del sistema lac. La expresión de ADA es preferiblemente inducida usando IPTG.

C. Aislamiento y Purificación de ADA

De manera general, las enzimas pueden ser aisladas a partir de una fracción celular solubilizada por métodos estándares. Algunos métodos adecuados incluyen precipitación y protocolos cromatográficos líquidos tales como intercambio iónico, interacción hidrofóbica y filtración en gel. Véase por ejemplo, Methods Enzymol. -Guide to Protein Chemistry. Deutscher, Ed., Sección VII pp. 183-309 (1990); y Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, New York (1987), las cuales están incorporadas en este documento por referencia.

Alternativamente, el material purificado se obtiene separando la enzima en geles de SDS-PAGE preparativos, dividiendo la banda de interés y electroeluyendo la proteína de la matriz de poliacrilamida por métodos conocidos en la técnica. El SDS detergente se remueve de la proteína por métodos conocidos, tal como por diálisis o el uso de una columna adecuada, tal como la columna Extracti-Gel de Pierce. Las mezclas de enzimas pueden ser separadas mediante por ejemplo, SDS-PAGE de conformidad con el método de Laemmli,

Nature 227:680-685 (1970). Tales métodos son bien conocidos en la técnica.

No existen limitaciones particulares al método de purificar la proteína tan pronto como la contaminación indeseable sea efectivamente removida. Un método económico es analizar las células pasando el caldo de fermentación a través de un microfluidizador para liberar la enzima de las células. La adición de un filtro auxiliar y un agente de floculación (por ejemplo, PEI, disponible de VWR International, South Plainfield, NJ) al caldo agitado, proporciona los contaminantes tales como proteínas y otros desechos celulares insolubles. Un filtro adecuado es CELITE (disponible de World Minerals, Inc., Santa Barbara, CA). La enzima soluble puede entonces ser removida del caldo por filtración con un filtro apropiadamente dimensionado. Deseablemente, el filtro permitirá a la enzima soluble activa pasar mientras permite a las fracciones insolubles de proteínas celulares y otros contaminantes, ser retenidos por el filtro. La enzima puede entonces ser concentrada en solución usando un ultrafiltro. Un filtro de corte de 30,000 peso molecular (MWCO) es útil para este propósito.

Ensayo de Actividad ADA

La enzima así derivada debe ser sometida a ensayo para determinar la actividad. Como se usa en este documento, una unidad (U) de actividad enzimática es aquella cantidad de

enzima la cual desaminará 1 μmol de ddA por minuto a 37°C. Deseablemente, el titulador de enzima final es desde aproximadamente 650-750 U/ml. El ensayo puede ser realizado agregando la enzima a una solución al 2.4% de ddA a 37°C. La
5 reacción se deja proceder por 15 minutos mientras se agita suavemente. Se agrega tetrahidrofurano para detener la reacción. Una muestra se toma y se corre en CLAR para determinar la cantidad de ddI formada.

ADA Inmovilizante

10 Una vez que la enzima es purificada, es deseable tratar la solución enzimática con un amortiguador apropiado a un pH de aproximadamente 7.3 hasta aproximadamente 7.6. No existen limitaciones particulares al tipo de amortiguador usado, aunque se prefiere el amortiguador de fosfato.
15 Deseablemente, la solución se diluye con amortiguador a una actividad desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 350 U/ml.

La enzima purificada es primero inmovilizada en un soporte que es insoluble en la solución de reacción antes de
20 la reacción con ddA. No existen limitaciones particulares para el tipo de soporte usado tan pronto como la enzima puede ser inmovilizada en este. En general, la solución diluta mencionada anteriormente de la enzima amortiguada, es agregada a una solución que contiene un soporte insoluble,
25 algunos de los cuales requieren activación, mediante

activación de un agente tal como un reactivo de reticulación. El reactivo de reticulación sirve para enlazar covalentemente la ADA al soporte vía un grupo amina en la ADA.

El soporte permanece insoluble y mantiene la enzima soluble en la solución de reacción, durante el curso de la reacción. Deseablemente, el soporte es un material de resina sólido que tiene un diámetro de aproximadamente 250-600 micrones. Soportes adecuados incluyen, por ejemplo, IPS-400 (disponible de U.O.P., Des Plaines, IA) o EUPERGIT (disponible de Rohm America Inc., Piscataway, NJ).

No existen limitaciones particulares al agente de reticulación tan pronto como alcance covalentemente la enzima al soporte. La selección de agentes de reticulación dependerá del soporte seleccionado y será fácilmente aparente para aquellos que tienen habilidad en la técnica. Combinaciones adecuadas de soporte de resina y agentes de reticulación son Celite y glutaraldehído, IPS-400 y glutaraldehído, Sepharosa y CNBr y soportes de resina funcionalizados con ya sea aminas primarias o carboxilo y carbodiimidas. Otras combinaciones apropiadas de sólidos y reactivos de reticulación serán aparentes para aquellos que tienen habilidad ordinaria en la técnica.

La inmovilización de la enzima sobre el soporte se puede realizar en un proceso por lotes o continuo. Un proceso por lotes se puede realizar por ejemplo, mezclando la

solución de enzima amortiguada con un soporte activado por un número de horas. La enzima inmovilizada es entonces colectada usando una técnica de filtración simple. El tamaño de retención de partícula será determinado por el tamaño del soporte sólido. Para uso con IPS-400, un filtro que tiene una retención de tamaño de partícula desde aproximadamente 20 μm hasta aproximadamente 30 μm es útil. El vacío puede ser aplicado para recuperar la velocidad, sin embargo, el soporte no debe ser secado.

Alternativamente, el soporte activado puede ser colectado en un filtro con un tamaño de retención de partícula suficiente para retener el soporte sólido. La solución de enzima amortiguada se pasa entonces sobre el soporte. El licor madre de la enzima a partir de la filtración, se pasará a través del filtro repetidamente para maximizar la inmovilización de la enzima. En un proceso continuo, el soporte sólido puede ser formado en suspensión y vertido en una columna de cromatografía. Después de recuperar la enzima inmovilizada, es enjuagado con agua para remover cualquier impureza o enzima no ligada. Preferiblemente, un titulador de la enzima inmovilizada es al menos, aproximadamente 40U.

Reacción ddA con ADA

La ADA inmovilizada es entonces mezclada con una solución de ddA para obtener ddI. Durante la reacción de ddA

a ddI, se genera amoníaco. Puesto que se agrega ddA a la enzima en soluciones más concentradas que en la técnica anterior, el producto de amoníaco en la mezcla puede causar que el pH se eleve en el intervalo desde aproximadamente 9.2 hasta aproximadamente 0.5. El uso de ADA o ADA no ligada bajo estas condiciones no se espera proceda para terminación, debido a que la enzima será inactivada en estos pH elevados. Sin embargo, el uso de la versión humana de la ADA inmovilizada en un soporte sólido, disminuye tal degradación.

10 Como un resultado, la ADA retiene actividad y la reacción procede a un espacio más productivo, más rápido, que lo que ha sido hasta ahora posible.

La reacción se realiza a una temperatura desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 50°C.

15 Deseablemente, la reacción se mantiene a una temperatura de aproximadamente 25-30°C. La reacción puede ser realizada a temperaturas inferiores, sin embargo, esto resultará en un tiempo de reacción prolongado. Realizando la reacción a temperaturas en exceso de aproximadamente 50°C, puede

20 resultar en deterioro de la actividad enzimática y/o desnaturalizar la enzima.

Se agrega la ddA comercialmente disponible (disponible de Ajinomoto, Tokio, Japón) a la ADA inmovilizada en agua en un lote o proceso voluminoso continuo. La reacción

25 puede proceder usando concentraciones de ddA también arriba

de aquellas usados en los métodos en los cuales la ADA no está inmovilizada. Un intervalo aceptable de concentración de ddA en la solución de reacción es desde aproximadamente 1% hasta aproximadamente 15%. Deseablemente, una solución de

5 aproximadamente 4% hasta 10% de ddA, más deseablemente una solución de aproximadamente 5-6% de ddA en agua se agrega a la ADA inmovilizada. La reacción se deja proceder bajo condiciones y por un tiempo de manera que permanece hasta aproximadamente 1% o menos de la ddA.

10 En un proceso por lotes, la ddA será agregada a una suspensión de ADA inmovilizada en agua y se deja reaccionar. La reacción completa debe tomar aproximadamente 5 hasta 8 horas. Una vez contemplada, la ADA inmovilizada puede ser recuperada para reutilizarse por filtración, seguida por

15 lavado con agua. Además, el licor madre, después de la remoción del producto ddI, puede ser reutilizado para maximizar el rendimiento.

En un proceso continuo, una solución ddA puede ser agregada a una columna envasa con ADA inmovilizada.

20 Deseablemente, la altura a la proporción del diámetro será aproximadamente 6, aunque la relación no es crítica. La solución de ddA será agregada a una velocidad y a un tiempo de manera que aproximadamente 1% o menos de ddA permanece. La reacción completa debe tomar aproximadamente 12 horas. La

25 velocidad de flujo dependerá del tiempo de la columna,

concentración de ddA, y temperatura de la reacción. Alternativamente, un proceso continuo puede ser usado, en el cual, la solución de ddA es reciclada a través de la columna envasada. La solución ddA será reciclada a una velocidad y por un tiempo, de manera que aproximadamente 1% o menos del ddA permanecerá. La velocidad de flujo dependerá del tamaño de la columna, concentración de ddA, y temperatura de la reacción. La selección de la velocidad de introducción de la solución ddA será fácilmente aparente para aquellos expertos en la técnica.

Recuperación de ddI

Después de reaccionar el ddA con ddI, la ddI está presente en solución en la forma de una sal de amonio a un pH alto (>8). En la etapa de recuperación, la ddI se remueve de la solución. Esto se logra por cristalización de ddI fuera de la solución. Un proceso de destilación simple puede ser usado para accionar el amoníaco, un producto lateral de la reacción y producir la forma de ácido libre de ddI. La destilación puede ser realizada secuencialmente con una primera destilación llevando la solución a una concentración de aproximadamente 10-12% (basado en el ddA inicial), seguido por la adición de agua y destilación adicional hasta que la concentración alcanza nuevamente aproximadamente 10-12% y el pH de la suspensión

52

ddI es menor de aproximadamente 8. La suspensión puede entonces ser enfriada a aproximadamente 0-5°C y mantenida por al menos una hora.

La ddI puede ser filtrada y la pasta lavada con acetona. Los sólidos pueden entonces ser secados a un peso constante por ejemplo, bajo vacío a aproximadamente 45-50°C. Deseablemente, el licor madre de la reacción puede ser retenido para reutilizarlo en el lote o proceso continuo alcanzando ddA a ddI. Adicionalmente, el lavado acuoso puede también ser reutilizado.

Los rendimientos de aproximadamente 82% se pueden obtener sin algún reciclaje. Sin embargo, cuando el licor madre de la reacción es reciclado, los rendimientos pueden ser incrementados a aproximadamente 96-99%. La ddI resultante es mayor que 99% puro.

Los siguientes Ejemplos están propuestos para mostrar la práctica de la invención y no están propuestos para restringir el ámbito de la presente invención. Todos los porcentajes están en peso/volumen a menos que se indique de otro modo.

La descripción completa de cada documento citado (que incluye patentes, solicitudes de patentes, artículos de periódicos, resúmenes, manuales de laboratorio, libros, números de Acceso Genbank, números de acceso SWISS-PROT, u otras descripciones) en el Antecedentes de la Invención,

Descripción Detallada, Breve Descripción de las Figuras y Ejemplos, están con ello incorporados por referencia en su totalidad. Además, las copias duras del Listado de Secuencia proporcionadas junto con estas, en adición a su Forma Legible por Computadora correspondiente, están incorporadas en este documento por referencia en sus totalidades.

Ejemplo 1

Preparación de *E. coli* recombinante transformado con un gen de adenosina desaminasa humana (ADA)

10 Se digirió pBMS2000, del plásmido de expresión *E. coli*, con enzimas de restricción, BspHI y BamHI y se fraccionó en gel de agarosa al 0.7%. El fragmento correspondiente a 4.5 Kb se escindió del gel, eluyó, concentró por precipitación de etanol. El ADN de ADA humana
15 sintética fue escindido del plásmido que contiene el gen que codifica para el gen ADA humana con las enzimas de restricción Nco I y BamHI. El fragmento NcoI-Bam HI que contiene el gen de ADA humana sintética se ligó al fragmento de 4.5 Kb de pBMS2000 obtenido por digestión con las enzimas
20 de restricción, BspHI y BamHI. El ADN ligado se transformó en *E. coli* hospedero, BL21. Las células transformadas fueron plaqueadas en placas de agar de Caldo Lauria suplementadas con 30 µg de sulfato de neomicina. El análisis de la enzima de restricción fue realizado en algunas de las colonias, así
25 como también análisis de SDS-PAGE. Una de las colonias con el

análisis de enzima de restricción y la actividad enzimática se seleccionó para ser llevado a cabo.

Ejemplo 2

Fermentación de *E. coli* recombinante que contiene el gen

5 desaminasa de adenosina humana sintética

Formulaciones de Medio de Fermentación

Medio Sembrado (por 100 ml)

10

Reactivo	Cantidad
Soytona	1 g
Extracto de levadura	0.05 g
NaCl	0.16 g
Sulfato de neomicina (657 mg/g)	2.0 mg

Medio Base (por litro)

15

20

25

Reactivo	Cantidad
K ₂ HPO ₄	14 g
Ácido cítrico	2 g
Extracto de levadura	3.2 g
NaCl	1.6 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	2.2 g
Sulfato de neomicina	18 mg
Glicerol	3.4 ml
PPG	0.2 ml

Medio de Alimentación (por litro)

Reactivo	Cantidad
Cerelose	200 g
Extracto de levadura	100 g
Sulfato de neomicina	18 g

5

Control de pH -Base

Reactivo	Cantidad
NH ₄ OH	250 ml
H ₂ O	750 ml

10

Control de pH - Ácido

Reactivo	Cantidad
Ácido fosfórico al 85%	200 ml
Agua	800 ml

15

A. Preparación de solución sembrada

0.2 ml de *E. coli* recombinante descongelado se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contiene 100 ml del medio de siembra como se describe anteriormente. Este se incubó sacudiendo el matraz en un incubador giratorio a 300 rpm a 28°C por 24 horas para preparar un inóculo.

20

B. Fermentación

50 ml del inóculo se inocularon en un fermentador de 5 litros que tienen un volumen de trabajo de 1 litro. Las

25

condiciones de operación son: una temperatura de 28°C; agitación de 1000 rpm; aceleración de 1 vvm; el oxígeno disuelto (DO) ajustado se registra y define a 100%; pH controlado con NH₄OH y ácido fosfórico a pH 6.8 a 7.2.

5 2 Litros del medio de alimentación se prepararon como sigue. La alimentación Ramp se inició después de 6 horas usando una velocidad de alimentación de 5 ml/hor incrementando a 1.2 ml/hr/hr. Las células se dejan crecer por 24 horas con monitoreo. Se ajusta el flujo de aire, velocidad
10 de alimentación y temperaturas como se requieren para controlar DO o mayor que o igual a 20% del ajuste inicial. La temperatura de cultivo es entonces incrementada a 16°C. Las células son inducidas con β -D-tiogalactosida de isopropilo (IPTG) a la concentración final de 80 μ g/ml entre 16-18 horas
15 posteriores a la inoculación. La densidad óptica a 600 nm es entre 20-30. El monitoreo y alimentación se continua por 40-48 horas totales o hasta que la alimentación es utilizada. El caldo contiene 84 unidades/ml de solución. (1 unidad (U) = 1 μ mol de ddA desaminada/min a 37°C.

20

Ejemplo 3

Aislamiento e inmovilización de ADA humana a partir de la fermentación *E. coli* recombinante

10 L de caldo de fermentación se pasan a través de un microfluidizador (modelo M-110Y, disponible de
25 Microfluidics, Newton, MA). La presión de operación es a

12,000-20,000 psi hasta que al menos 90% de la actividad se libera de la célula. La actividad es medida tomando una porción del caldo microfluidizado, centrifugando la muestra, y midiendo la actividad en la porción
5 sobrenadante. La cantidad de actividad en el sobrenadante representa la cantidad de actividad liberada. Normalmente se requiere un paso a través del microfluidizador.

A 10 L del caldo microfluidizado bien
10 agitado, se agregan 1.5 kg de CELITE (concentración final 15% en p/p). Después, se agregan 0.30 L de polietilenimina acuosa al 10% (PEI) (concentración final 0.3% v/v). Esta se agita por al menos, 30 minutos, después se filtra para remover los insolubles. La pasta es
15 lavada con 3.0-4.0 L de agua.

Lo filtrado clarificado es ultrafiltrado a través de un casete de filtro MWCO 30,000 (Pellicon 2 unidades, casete de enlace de proteína baja de poliéter sulfona, área de filtro de 0.5 m², disponible de Millipore, Bedford, MA) a
20 un titulador de enzima final de entre 650-750 U/ml. La muestra es diluida con 1.25 L de 50 mM de amortiguador de fosfato a pH 7.3-7.6 (a una actividad enzimática de 250-350 U/ml).

A 550 g de soporte de inmovilización de proteína
25 IPS-400, se agrega 2.75 L de 2.5% de glutaraldehído. Este se

agita suavemente a temperatura ambiente por 2 horas y se decanta o filtra en un filtro de tamaño de malla 60. El soporte activado se lava 10 veces con 4 L de agua.

5 A una solución de enzima diluida (~0.95L), se agrega 1.10 kg de soporte de inmovilización IPS-400 activado y se agita uniformemente por 2 horas a 20-25°C. La enzima inmovilizada es colectada en un filtro que tiene un tamaño de poro efectivo suficiente para retener el soporte de inmovilización y se lava con 5 volúmenes de agua.

10 Alternativamente, el IPS-400 es formado en suspensión en agua corriente y colectado en un embudo Buchner fijo con papel filtro de flujo rápido con 20 a 30 μ m de retención de tamaño de partícula (grado 604 o 415). Se aplicó vacío para remover el exceso de agua, pero el soporte
15 no se secó. La enzima diluida se agrega a la resina, se aplica vacío (20" de Hg) (50.8 cm de Hg) y se colecta el licor madre. Se detiene el vacío, el licor madre se muestrea (paso #1) para determinar la actividad y después se agrega nuevamente al soporte y se reaplica vacío. Esto se repite
20 cuatro veces más por un total de cinco pasos sobre el IPS-400. Después del 5to. paso, se agrega 1.5 L de agua a la resina y se aplica vacío para lavar la enzima inmovilizada.

25 Como otra alternativa, el IPS-400 es formado en suspensión en agua corriente y se vierte en una columna de cromatografía. El lecho se deja reposar, después se pasa agua

a través de la columna (flujo ascendente) para enjuagar el soporte. La solución de la enzima diluida es bombeada a través de la columna (1 a 25 ml/min). Después de la adición de la enzima, se bombean 1.5 L de agua sobre la columna para
5 lavar la enzima inmovilizada.

El ensayo de enzima inmovilizada muestra una actividad enzimática de ~100U/g (1 unidad = 1 μ mol de ddA desaminada/min a 37°C).

Ejemplo 4

10 **Preparación de ddI a partir de ddA usando la enzima inmovilizada ADA humana recombinante (lote)**

Se agregan 100.0 g de ddA a 1900 ml de agua a 30°C (licor madre de corridas previas puede también ser usado). Después que se ha agregado el ddA (no es necesaria la
15 disolución completa), se agregan 4000 U de la desaminasa de adenosina humana rec inmovilizada. La reacción se mantiene a 30°C mientras se agita. La reacción se completa (aproximadamente 5-8 horas) cuando el nivel de ddA residual es menos de o igual a 1% de la cantidad original de ddA
20 agregada. Los sólidos enzimáticos son removidos por filtración (20-30 μ m de medio) y la pasta enzimática se lava con 100 ml de agua. La enzima usada se mantiene como una pasta húmeda a 0-5°C (por hasta 72 horas) y puede ser reciclada a otro lote. Las soluciones de ddI se filtran a
25 través de una almohadilla de filtración CUNO (0.4 a 1

micrón), después a través de un medio de filtro de 0.2 micrones.

Ejemplo 5

Preparación de ddI a partir de ddA usando la enzima

5 **inmovilizada ADA humana recombinante (columna continua)**

Una columna (relación h/d = 6) es formada en suspensión envasada con 380 U de adenosina desaminasa humana rec inmovilizada con agua. La columna se lava con 30 mM de NH₄OH a pH 9.5, después con agua a pH 6.5-7.5. Mientras se
10 mantiene la temperatura a 20°C, una solución al 4% de ddA en agua se pasa a través de la columna a una velocidad de 7.2 ml/min. por 120 horas. El efluente de la columna está a pH 9.2-9.5 y contiene >99% ddI con <1% de ddA restante. La solución ddI resultante se filtra
15 a través de una almohadilla CUNO y un filtro de 0.2 μ antes del aislamiento final.

Ejemplo 6

Preparación de ddI a partir de ddA usando la enzima

inmovilizada ADA humana recombinante (columna recirculada)

20 Una columna (relación h/d = 2.7) es formada en suspensión envasada con 1000 U de adenosina desaminasa humana rec inmovilizada con agua. 25.0 g de ddA se disuelven en 475 ml de agua (o un licor madre de lotes previos, diluidos con agua a 475 ml) a 30°C en un matraz de fondo redondo de 3
25 cuellos, equipado con un agitador mecánico. La solución ddA

se circula a 30°C a través de la columna enzimática a ~50 mL/min (la velocidad de circulación puede ser variada como sea necesario).

La reacción se completa (aproximadamente 3-9.5 horas) cuando el nivel de ddA residual es menos de o igual a 1% de la cantidad original de ddA agregada por análisis de CLAR. La columna es entonces enjuagada con 25 ml de agua y puede ser mantenida a 0-5 °C (por hasta 72 horas) para reutilización. La solución ddI resultante se filtra a través de una almohadilla CUNO y filtro de 0.2 µm antes del aislamiento final.

Ejemplo 7

Aislamiento de ddI

La solución ddI es destilada bajo vacío a una temperatura de lote interno de 20-40°C. La destilación se detuvo cuando la concentración de ddI alcanzó 10-12% p/v basado en el ddA iniciado. Típicamente, el pH es 8.1-8.3 a este punto. Se agrega agua adicional y la destilación entonces se continúa hasta que la concentración nuevamente alcanza 10-12 %, y el pH de la suspensión ddI es menos de 8 (típicamente, 7.8-7.9). La suspensión ddI se enfría a 0-5°C y se mantiene por al menos, 1 hora. La suspensión fría se filtró y la pasta se lavó con agua a 0-5°C. El licor madre y el lavado acuoso se pueden retener para reciclaje en otro lote.

La pasta se lava con 0-5°C de acetona. Los sólidos se secan bajo vacío a 45-50°C a un peso constante. Los rendimientos de ~82% de la primera corrida y 96-99% para cuatro corridas subsecuentes (>96% total) se esperan con el 5 reciclaje de licor madre. La ddI resultante es >99% pura.

Ejemplo Comparativo 1

Comparación de la actividad ADA de *E. coli* y ADA inmovilizada humana recombinante

ADA microbiano de *E. coli* recombinante se purificó 10 parcialmente y aisló como una suspensión de sulfato de amonio. Se centrifugó el caldo de fermentación *E. coli* (42U ADA/mL, 2L) y la pellet celular se colectó y se lavó con 1 L 100 M de amortiguador de fosfato a pH 7.5. Las células fueron nuevamente centrifugadas y resuspendidas en 2 L del 15 amortiguador anterior más 20% de glicerol. Las células se pasaron una vez a través de un microfluidizador. Los desechos celulares fueron removidos por centrifugación y el sobrenadante resultante se concentró por ultrafiltración a través de un casete MWCO de 30,000. La enzima se concentró a 20 un titulador final de 390 U/ml. Se agregó sulfato de amonio a una saturación de 50%, lo precipitado resultante se colectó por centrifugación y se resuspendió en 100 ml de agua desionizada. El titulador final de la suspensión fue 740 U/ml; el contenido de proteína de la suspensión fue ~ 75 25 mg/ml.

La siguiente tabla describe la conversión de una solución de 52-60 g/L de ddA en agua a ddI usando la desaminasa de adenosina microbiana como se describe anteriormente contra un ejemplo usando la enzima inmovilizada

5 ADA humana recombinante siguiendo el procedimiento general en el Ejemplo 4. Como se puede ver de los resultados de la Tabla 2, la enzima inmovilizada humana recombinante es significativamente más estable que las enzimas microbianas y permite la terminación de la reacción con unidades menos de

10 enzima y en un periodo corto de tiempo.

Tabla 2. Rendimientos comparativos de ddA a partir de E. coli contra ADA Humana Recombinante

15	Recurso de ADA	Actividad Enzimática (U/d ddA)	Temperatura de Reacción (°C)	Tiempo de Reacción (horas)	Conversión o ddA a ddI (%)
	E. coli Suspensión (NH ₄) ₂ SO ₄	87.5	40	16	16
	E. coli Suspensión (NH ₄) ₂ SO ₄	125	37	24	26
20	ADA inmovilizada humana recombinante	40	30	4.5	100
	ADA inmovilizada humana recombinante	40	40	1.5	100

De este modo, mientras se ha descrito que actualmente se cree son modalidades preferidas de la invención, otras modalidades y adicionales, mejoramientos y modificaciones serán conocidos por aquellos expertos en la técnica y se entiende que incluyen todas de tales modalidades, modificaciones y mejoramientos y entran dentro del ámbito verdadero de las reivindicaciones como se expone abajo.

REIVINDICACIONES

1. Método para elaborar didanosina (ddI) caracterizado por que comprende las etapas de:

5 (a) obtener una enzima que expresa actividad desaminasa ddA;

(b) inmovilizar la enzima en un soporte insoluble;

(c) poner en contacto la enzima con una
10 solución de didesoxiadenosina (ddA) de al menos aproximadamente 1% en peso de volumen ddA en agua por un tiempo y bajo condiciones para producir una solución ddI; y

(d) aislar la ddI a partir de la solución de
15 ddI.

2. Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la solución ddA en la etapa de contacto es desde aproximadamente 2% hasta aproximadamente 10% en peso de volumen de ddA en
20 agua.

3. Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque un pH durante la etapa de contacto es desde aproximadamente 8.0 hasta aproximadamente 9.5.

25 4. Método de conformidad con la

reivindicación 3, caracterizado porque sustancialmente toda la precipitación resiste ddi fuera de la solución ddi en la etapa de contacto.

5. Método de conformidad con la
5 reivindicación 1, caracterizado porque el soporte insoluble es funcionalizado para permitir la unión de la enzima en este.

6. Método de conformidad con la
reivindicación 5, caracterizado porque la unión de la
10 enzima al soporte insoluble se logra usando un agente de activación.

7. Método de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizado porque la enzima es adenosina desaminasa humana (ADA).

15 8. Método de conformidad con la
reivindicación 7, caracterizado porque la ADA tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO.1, o variaciones conservativas de la misma.

9. Método de conformidad con la
20 reivindicación 7, caracterizado porque la ADA se codifica por un nucleótido que tiene la SEC ID NO.2, SEC ID NO.3, o variaciones conservativas de la misma.

10. Método de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de
25 obtención incluye expresar adenosina desaminasa humana

(ADA) o una variante conservativa de la misma en un organismo transformado y aislar la ADA del organismo.

11. Método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el organismos transformado es el *E. coli*.

12. Método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el soporte insoluble es funcionalizado para permitir la unión de la enzima a este.

10 13. Método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la unión de la enzima al soporte insoluble se logra usando un agente de activación.

15 14. Método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque una actividad de la enzima inmovilizada en el soporte insoluble es al menos, aproximadamente 40 U/g.

20 15. Método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque un pH durante la etapa de contacto es desde aproximadamente 7.5 hasta aproximadamente 9.5.

25 16. Método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque dicha etapa de contacto es un proceso continuo realizado usando una columna envasada.

17. Método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la solución de ddA en la etapa de contacto es desde aproximadamente 4% hasta aproximadamente 15% del volumen en peso de ddA en agua.

18. Método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque la solución de ddA es desde aproximadamente 5% hasta aproximadamente 8% en peso del volumen de ddA en agua.

19. Método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la etapa de aislamiento incluye destilar secuencialmente la solución de ddI y agregar agua hasta que una suspensión de ddI en licor madre acuoso se obtiene y el pH es menos de aproximadamente 8.

20. Método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque además comprende las etapas de:

(a) retener un licor madre de reacción después de la etapa de aislamiento;

(b) repetir la etapa de contacto al menos una vez usando el licor madre de reacción para preparar la solución de ddA; y

(c) repetir la etapa de aislamiento al menos una vez.

69

21. Método de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque la etapa de aislamiento produce un rendimiento de al menos aproximadamente 96% de ddi que es al menos aproximadamente 99% puro.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para elaborar didanosina (ddI) que incluye las etapas de: (a) 5 obtener una enzima que expresa actividad desaminasa ddA; (b) inmovilizar la enzima en un soporte insoluble; (c) poner en contacto la enzima con una solución de didesoxiadenosina (ddA) por al menos aproximadamente 4% en peso de volumen de ddA en agua, por un tiempo y bajo condiciones para producir 10 una solución de ddI; y (d) aislar la ddI de la solución de ddI. Opcionalmente, el licor madre de ddI es reutilizado en corridas subsecuentes para mejorar el rendimiento.

LISTADO DE SECUENCIA

<110> Skonesny, Paul M.
 Politino, Michael
 Liu, Suo-Win
 Alfred, Boyle
 Chen, Jason
 Stein, Gregory
 Franceschini, Thomas
 Anderson, Wendy

<120> PROCESO PARA PREPARAR DIDESOXIINOSINA USANDO ENZIMA DE ADENOSINA

<130> GY0111 PCT

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 363

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICA_MISC

<222> (1)..(363)

<223> gi 14043373

<400> 1

Met Ala Gln Thr Pro Ala Phe Asp Lys Pro Lys Val Glu Leu His Val
 1 5 10 15

His Leu Asp Gly Ser Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg
 20 25 30

Arg Arg Gly Ile Ala Leu Pro Ala Asn Thr Ala Glu Gly Leu Leu Asn
 35 40 45

Val Ile Gly Met Asp Lys Pro Leu Thr Leu Pro Asp Phe Leu Ala Lys
 50 55 60

Phe Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Ile Ala Gly Cys Arg Glu Ala Ile Lys
 65 70 75 80

Arg Ile Ala Tyr Glu Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
 85 90 95

Tyr Val Glu Val Arg Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys Val

100						105						110					
Glu	Pro	Ile	Pro	Trp	Asn	Gln	Ala	Glu	Gly	Asp	Leu	Thr	Pro	Asp	Glu		
		115					120					125					
Val	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Gln	Gly	Leu	Gln	Glu	Gly	Glu	Arg	Asp	Phe		
	130					135					140						
Gly	Val	Lys	Ala	Arg	Ser	Ile	Leu	Cys	Cys	Met	Arg	His	Gln	Pro	Asn		
145					150					155					160		
Trp	Ser	Pro	Lys	Val	Val	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	Tyr	Gln	Gln	Gln	Thr		
				165					170					175			
Val	Val	Ala	Ile	Asp	Leu	Ala	Gly	Asp	Glu	Thr	Ile	Pro	Gly	Ser	Ser		
			180					185					190				
Leu	Leu	Pro	Gly	His	Val	Gln	Ala	Tyr	Gln	Glu	Ala	Val	Lys	Ser	Gly		
		195					200					205					
Ile	His	Arg	Thr	Val	His	Ala	Gly	Glu	Val	Gly	Ser	Ala	Glu	Val	Val		
	210					215					220						
Lys	Glu	Ala	Val	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Glu	Arg	Leu	Gly	His	Gly	Tyr		
225					230					235					240		
His	Thr	Leu	Glu	Asp	Gln	Ala	Leu	Tyr	Asn	Arg	Leu	Arg	Gln	Glu	Asn		
				245					250					255			
Met	His	Phe	Glu	Ile	Cys	Pro	Trp	Ser	Ser	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ala	Trp		
			260					265					270				
Lys	Pro	Asp	Thr	Glu	His	Ala	Val	Ile	Arg	Leu	Lys	Asn	Asp	Gln	Ala		
		275					280					285					
Asn	Tyr	Ser	Leu	Asn	Thr	Asp	Asp	Pro	Leu	Ile	Phe	Lys	Ser	Thr	Leu		
	290					295					300						
Asp	Thr	Asp	Tyr	Gln	Met	Thr	Lys	Arg	Asp	Met	Gly	Phe	Thr	Glu	Glu		
305					310					315				320			
Glu	Phe	Lys	Arg	Leu	Asn	Ile	Asn	Ala	Ala	Lys	Ser	Ser	Phe	Leu	Pro		
				325				330						335			

73

Glu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Leu Asp Leu Leu Tyr Lys Ala Tyr Gly
340 345 350

Met Pro Pro Ser Ala Ser Ala Gly Gln Asn Leu
355 360

<210> 2
<211> 1559
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> caractéristica_misc
<223> gi 14043372

<400> 2
ggcaccgaggc gtggccggcc gggccaccg ctggcccccag ggaagccga gggccaccg 60
agccggcaga gaccaccga gggcgggcg agggagcagc gccggggcg acgagggcac 120
catggcccag acggccgcct tcgacaagc caaagtagaa ctgcatgtcc acctagacgg 180
atccatcaag cctgaaacca tcttatacta tggcaggagg agagggatcg cctcccagc 240
taacacagca ggggggctgc tgaacgtcat tggcatggac aagccgctca cccttcaga 300
cttcctggcc aagtttgact actacatgcc tgctatcgcg ggctgccggg aggtatcaa 360
aaggatcgcc tatgagtttg tagagatgaa ggccaaagag ggcggtgtgt atgtggagg 420
gcggtacagt ccgcacctgc tggccaactc caaagtggag ccaatccctt ggaaccaggc 480
tgaaggggac ctcacccag acgaggtggt gggccctagt ggcagggcc tcgaggagg 540
ggagcgagac ttcggggtca aggccgggtc catcctgtgc tgcattggcc accagcccaa 600
ctgggtcccc aaggtggtgg agctgtgtaa gaagtaccag cagcagaccg tggtagccat 660
tgacctggct ggagatgaga ccatcccagg aagcagcctc ttgcctggac atgtccaggc 720
ctaccaggag gctgtgaaga gggcattca ccgtactgtc gacggcgggg aggtgggctc 780
ggccgaagta gtanaagagg ctgtggacat actcaagaca gagcggtctg gacacggcta 840
ccacaccctg gaagaccagg ccttttataa caggctgcgg caggaaaaca tgcacttcga 900
gatctgcccc tgggtccagct acctcactgg tgcctggaag ccggacacgg agcatgcagt 960
cattcggtc aaaaatgacc aggttaacta ctgctcaac acagatgacc cgtcatctt 1020
caagtccacc ctggacactg attaccagat gaccaaacgg gacatgggct ttactgaaga 1080

74

ggagttttaa aggctgaaca tcaatgcggc caaatctagt ttctctccag aagatgaaa 1140
gagggagctt ctgcacctgc tctataaagc ctatgggatg ccaccttcag cctctgcagg 1200
gcagaacctc tgaagacgcc actcctccaa gccttcaccc tgtggagtca ccccaactct 1260
gtggggctga gcaacatttt tacattttatt ccttccaaga agaccatgat ctcaatagtc 1320
agttactgat gctcctgaac cctatgtgtc catttctgca cacacgtata cctcggcatg 1380
gccgcgtcac ttctctgatt atgtgccttg gccagggacc agcgcccttg cacatgggca 1440
tggttgaatc tgaaccctc cttctgtggc aacttgtact gaaatcttg tgetcaataa 1500
agaagcccat ggctgggtggc atgcacaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1559

<210> 3
<211> 1103
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Variante de secuencia de gi 14043372

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(6)
<223> sitio de restricción NCO I

<220>
<221> característica_misc
<222> (1098)..(1103)
<223> sitio de restricción BAM HI

<400> 3
coatggccca gacgccggcc ttcgacaagc cgaagtaga actgcatgtc caoctggacg 60
gttccatcaa gccggaaacc atcctgtact atggccgtcg ttgggggtatc gccctgccgg 120
ctaacacagc agagggctct ctgaacgtca ttggcatgga caagccgctg accctgccgg 180
acttcctggc caagtttgac tactacatgc ctgctatcgc gggctgccgt gaggctatca 240
aacgtatcgc ctatgagttt gtagagatga aggccaaaga gggcgtgggtg tatgtggagg 300
tgcgctacag tccgcacctg ctggccaact ccaagtgga gccaatcccg tggaaaccagg 360
ctgaagggga cctcaccocg gacgaggttg tagccctcgt gggccagggc ctgcaggagg 420
gtgagcgtga cttcggcgtc aagggccgct ccacccctgt ctgcatgcgc caccagccga 480
actggcccc gaaggtggtg gagctgtgta agaagtacca gcagcagacc gtgggtggcca 540
ttgacctggc tggatgatgag accatcccag gcagcagcct cttgccgggt catgtccagg 600

75

cctaccagga ggctgtgaag agcggcattc accgtactgt ccacgccggt gaggtgggct	660
cggccgaagt agtaaaagag gctgtggaca ttctcaagac agagcgctg ggtcacggt	720
accacacctt ggaagaccag gccctctata accgtctgcg ccaggaaaac atgcacttcg	780
agatctgcc gtggtcagc tacctcactg gtgcctggaa gcaggacacg gagcatgcag	840
tcattcgctt caaaaatgac caggctaact actcgctcaa cacagatgac ccgctcatct	900
tcaagtccac cctggacact gattaccaga tgaccaaacy tgacatgggc tttactgaag	960
aggagtttaa acgtctgaac atcaatgcgg ccaaatctag ttccctccca gaagatgaaa	1020
agcgcgagct gctcgacctg ctctataaag cctatggcat gccacgctca gcctctgcag	1080
gtcagaacct ctgataagga tcc	1103

PATENT COOPERATION TREATY GY0111-WO-PCT

com 7.6

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

RECEIVED
BMS PATENT LAW
BAXAM, Deanna
Bristol-Myers Squibb Company
P.O. Box 4000
Princeton, NJ 08543-4000
United States

JUN 09 2004

Due Date

Attorney

IMPORTANT NOTIFICATION

Date of mailing (day/month/year) 25 May 2004 (25.05.2004)	
Applicant's or agent's file reference GY0111	
International application No. PCT/US2004/006103	International filing date (day/month/year) 27 February 2004 (27.02.2004)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 04 March 2003 (04.03.2003)
Applicant BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
04 Marc 2003 (04.03.2003)	60/451,842	US	17 May 2004 (17.05.2004)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.87.20

Authorized officer

Martine THEVENOT

Telephone No. (41-22) 338 9615

From the INTERNATIONAL BUREAU

G-Y0111 - WO-PCT

Bureau 77

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

RECEIVED

BAXAM, Deanna
Bristol-Myers Squibb Company
P.O. Box 4000
Princeton, NJ 08543-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

BMS PATENT LAW

OCT 15 2004

Mey

Docketed Item

Due Date

Attorney

Date of mailing (day/month/year)

07 October 2004 (07.10.2004)

Applicant's or agent's file reference

GY0111

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US2004/006103

International filing date (day/month/year)

27 February 2004 (27.02.2004)

Priority date (day/month/year)

04 March 2003 (04.03.2003)

Applicant

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY et al

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does apply, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).
2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
16 September 2004 (16.09.2004)

CH

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

FI, LU, SE, TZ, UG, ZM

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 20 MONTHS from the priority date.

In practice, time limits other than the 20-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For regular updates on the applicable time limits (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Beate Giffö-Schmitt

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 87 20

GY0111

1/9

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/ROH01 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.150)
0-5	Petition The undersigned requests that the present International application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	GY0111
I	Title of Invention	PROCESS FOR PREPARING DIDEOXYINOSINE USING ADENOSINE DEAMINASE ENZYME
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name:	BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
II-5	Address:	Route 206 and Province Line Road Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	609-252-4014
II-9	Facsimile No.	609-252-4526
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	SKONEZNY, Paul, M.
III-1-5	Address:	3471 Van Wie Drive East Baldwinsville, New York 13027 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

79

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

II-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	POLITINO, Michael
III-2-5	Address:	111 Century Drive Syracuse, New York 13209 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
II-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	LIU, Suo, W.
III-3-5	Address:	4997 Firethorn Circle Manlius, New York 13104 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
II-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is:	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	BOYLE, Alfred, W.
III-4-5	Address:	4836 Westfield Drive Manlius, New York 13104 United States of America
III-4-6	State of nationality	US
III-4-7	State of residence	US
II-5	Applicant and/or inventor	
III-5-1	This person is:	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	CHEN, Jason, G.
III-5-5	Address:	4956 Tinderbox Circle Manlius, New York 13104 United States of America
III-5-6	State of nationality	CN
III-5-7	State of residence	US

80

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-6	Applicant and/or inventor	
III-6-1	This person is:	applicant and inventor
III-6-2	Applicant for	US only
III-6-4	Name (LAST, First)	STEIN, Gregory, L.
III-6-5	Address:	870 Country Route 84 Mallory, New York 13103 United States of America
III-6-6	State of nationality	US
III-6-7	State of residence	US
III-7	Applicant and/or inventor	
III-7-1	This person is:	applicant and inventor
III-7-2	Applicant for	US only
III-7-4	Name (LAST, First)	FRANCESCHINI, Thomas
III-7-5	Address:	8635 Honeycomb Path Cicero, New York 13039 United States of America
III-7-6	State of nationality	US
III-7-7	State of residence	US
III-8	Applicant and/or inventor	
III-8-1	This person is:	applicant and inventor
III-8-2	Applicant for	US only
III-8-4	Name (LAST, First)	ANDERSON, Wendy, L.
III-8-5	Address:	217 Mexico Point Drive Mexico, New York 13114 United States of America
III-8-6	State of nationality	US
III-8-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities etc:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	BAXAM, Deanna
IV-1-2	Address:	Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	609-252-4014
IV-1-4	Facsimile No.	609-252-4526
IV-1-5	Agent's registration No.	45,266
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IV-2-1	Name(s)	first named agent O'BRIEN, Maureen (42,043); GOLIAN, Paul, D. (42,591); BABAJKO, Suzanne; BELFIELD, Jing (45,914); BOGIE, Terence (44,544); BUCHHOLZ, Briana (39,123); D'AMICO, Stephen (46,652); DAVIS, Stephen (26,693); DUNCAN, Laurelee (44,096); DUNCAN, Sammy (46,675); GIBBONS, Maureen (44,121); KILCOYNE, John (33,100); KLEIN, Christopher (34,363); KORSEN, Elliott (32,705); LAMERDIN, John (44,858); LANGE, Keith (44,201); PEIST, Kenneth (45,006); PROVOOST, Jonathan (44,292); RODNEY, Burton (22,076); SHER, Audrey (39,024); VANATTEN, Mary, K. (39,408); WINSLOW, Anastasia (40,875); ALGIERI, Aldo (31,697); DUBOFF, Samuel (25,969); EPPERSON, James (52,867); MAKUJINA, Shah (41,174); RYAN, Richard (30,491); VOLLES, Warren, K. (33,810)
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	04 March 2003 (04.03.2003)
VI-1-2	Number	60/451,842
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

82

VB-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)	
VII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	1	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	1	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)). In a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(iv)		an assignment from SKONEZNY Paul, M. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1(iv)		an assignment from POLITINO Michael to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1(iv)		an assignment from LIU Suo, W. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1(iv)		an assignment from BOYLE Alfred, W. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1(iv)		an assignment from CHEN Jason, G. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1(iv)		an assignment from STEIN Gregory, L. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1(iv)		an assignment from FRANCESCHINI Thomas to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1(iv)		an assignment from ANDERSON Wendy, L. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1(ix)	This declaration is made for the purpose of:	all designations except the designation of the United States of America

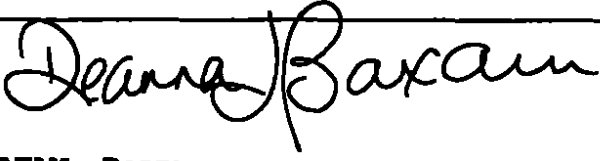
PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(II) and 51bis.1(a)(II)) Name:	in relation to this international application BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY is entitled to claim priority of earlier application No. 60/451,842 by virtue of the following:
VIII-3-1(iv)		an assignment from SKONEZNY Paul, M. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1(iv)		an assignment from POLITINO Michael to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1(iv)		an assignment from LIU Suo, W. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1(iv)		an assignment from BOYLE Alfred, W. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1(iv)		an assignment from CHEN Jason, G. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1(iv)		an assignment from STEIN Gregory, L. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1(iv)		an assignment from FRANCESCHINI Thomas to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1(iv)		an assignment from ANDERSON Wendy, L. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 21 August 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1(ix)	This declaration is made for the purpose of:	all designations

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	9	-
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	25	-
IX-3	Claims	3	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	0	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	38	
IX-8a	Sequence listing part of description filed in computer readable form in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(II))	5	-
IX-7	TOTAL	43	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-10	Original general power of attorney	✓	-
IX-16(A)	Sequence listing in computer readable form:		
IX-16(A)-(I)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-18	other:	Certification	
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name:	BAXAM, Deanna	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

86

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US
10-6	Transmitted of search copy delayed until search fee is paid	

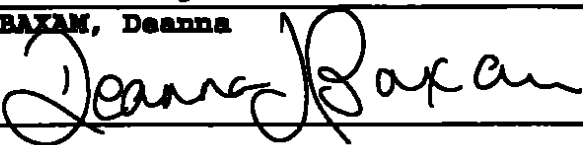
FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

Original (for SUBMISSION)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only		
0-1	International Application No.		
0-2	Date stamp of the receiving Office		
0-4	Form PCT/RO/101 (Annex)		
0-4-1	PCT Fee Calculation Sheet Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.150)	
0-9	Applicant's or agent's file reference	GY0111	
2	Applicant	BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY	
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier	Total amounts (USD)
12-1	Transmittal fee T	⇒	300
12-2-1	Search fee S	⇒	1000
12-2-2	International search to be carried out by	US	
12-3	International filing fee (first 30 sheets) I1	1035	
12-4	Remaining sheets	13	
12-5	Additional amount (A)11		
12-6	Total additional amount I2	143	
12-7	I1 + I2 =	1178	
12-12	EASY Filing reduction R	-74	
12-13	Total international filing fee (I-R) I	⇒	1104
12-14	Fee for priority document		
	Number of priority documents requested	1	
12-15	Fee per document (A)20		
12-16	Total priority document fee: P	⇒	20
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+I+P)	⇒	2424
12-19	Mode of payment	authorization to charge deposit account	
12-20	Deposit account instructions		
	The receiving Office	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)	
12-20-1	Authorization to charge the total fees indicated above.	✓	
12-20-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	✓	
12-20-3	Authorization to charge the fee for priority document.	✓	
12-21	Deposit account No.	19-3880	
12-22	Date	26 February 2004 (26.02.2004)	
12-23	Name and signature	BAXAM, Deanna 	



PCT POWER OF ATTORNEY

Paper Copy (NOT for submission)

0-1	PCT Power of Attorney (for an international application filed under the Patent Cooperation Treaty) (PCT Rule 20.4)	
0-1-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.150)

PCT POWER OF ATTORNEY

Paper Copy (NOT for submission)

1	The undersigned applicant(s)	BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
1-1-1	hereby appoints (appoint) the following person	BAXAM, Deanna Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-2	hereby appoints (appoint) the following person	O'BRIEN, Maureen Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-3	hereby appoints (appoint) the following person	GOLIAN, Paul, D. Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-4	hereby appoints (appoint) the following person	BABAJKO, Suzanne Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-5	hereby appoints (appoint) the following person	BELFIELD, Jing Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-6	hereby appoints (appoint) the following person	BOGIE, Terence Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-7	hereby appoints (appoint) the following person	BUCHHOLZ, Briana Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-8	hereby appoints (appoint) the following person	D'AMICO, Stephan Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-9	hereby appoints (appoint) the following person	DAVIS, Stephen Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-10	hereby appoints (appoint) the following person	DUNCAN, Laurelee Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America

PCT POWER OF ATTORNEY

Paper Copy (NOT for submission)

1-1-11	hereby appoints (appoint) the following person	DUNCAN, Sammy Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-12	hereby appoints (appoint) the following person	GIBBONS, Maureen Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-13	hereby appoints (appoint) the following person	KILCOYNE, John Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-14	hereby appoints (appoint) the following person	KLEIN, Christopher Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-15	hereby appoints (appoint) the following person	KORSEN, Elliott Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-16	hereby appoints (appoint) the following person	LAMERDIN, John Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-17	hereby appoints (appoint) the following person	LANGE, Keith Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-18	hereby appoints (appoint) the following person	PEIST, Kenneth Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-19	hereby appoints (appoint) the following person	PROVOOST, Jonathan Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-20	hereby appoints (appoint) the following person	RODNEY, Burton Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-21	hereby appoints (appoint) the following person	SHER, Audrey Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America

PCT POWER OF ATTORNEY

Paper Copy (NOT for submission)

a1

1-1-22	hereby appoints (appoint) the following person	VANATTEN, Mary, K. Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-23	hereby appoints (appoint) the following person	WINSLOW, Anastasia Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-24	hereby appoints (appoint) the following person	ALGIERI, Aldo Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-25	hereby appoints (appoint) the following person	DUBOFF, Samuel Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-26	hereby appoints (appoint) the following person	EPPERSON, James Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-27	hereby appoints (appoint) the following person	MAKUJINA, Shah Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-28	hereby appoints (appoint) the following person	RYAN, Richard Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-1-29	hereby appoints (appoint) the following person	VOLLES, Warren, K. Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America
1-2	as	agent
1-3	to represent the undersigned before	all the competent International Authorities
1-4	In connection with the International application identified below:	
1-4-1	Title of Invention	PROCESS FOR PREPARING DIDEOXYINOSINE USING ADENOSINE DEAMINASE ENZYME
1-4-2	Applicant's or agent's file reference	GY0111
1-4-3	International application number (if already available)	
1-4-4	filed with the following Office as receiving Office	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
1-5	and to make or receive payments on behalf of the undersigned	

PCT POWER OF ATTORNEY

Paper Copy (NOT for submission)

92

2-1	Signature of applicant, agent or common representative	
2-1-1	Name:	BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
2-1-2	Name of signatory	Stephen B. Davis
2-1-3	Capacity	Sr. Patent Counsel
3	Date	05 February 2004 (05.02.2004)

23

CERTIFICATION

The undersigned, being the Executive Vice President and General Counsel of Bristol-Myers Squibb Company, hereby designates:

Suzanne Babajko
Stephen B. Davis
John M. Kilcoyne
Christopher Klein
Richard Ryan

(a) to present to the Patent, Trademark, Copyright and similar Government Offices of all countries or to any competent authority, all original, divisional, continuation and reissue applications, petitions and request in the name of Bristol-Myers Squibb Company and its subsidiary companies, for letters patent for inventions, utility models, industrial models and designs and improvements or additions thereof, trademarks and copyrights; (b) to initial and prosecute oppositions and appeals; (c) to appear before all officers duly authorized, all Ministers, Bureaus, Clerk's Offices and Commissions or Commissioners that may be necessary; (d) to sign and approve on behalf of this corporation all documents and powers of attorney which judgment of the authorized individuals may be necessary or desirable to carry out the powers hereby conferred; (e) to request all proceedings; (f) to pay over or withdraw all taxes, obtain receipts therefor and give discharge; (g) to withdraw applications and all documents relating thereto; (h) to commence proceedings against infringers and assure the defense in infringement actions; and (i) generally to do all that in the judgment of the authorized individual may be necessary to secure granting of the privileges above-mentioned.

IN WITNESS WHEREOF, I have placed my hand and caused the seal of the Company to be affixed hereto on this 8th day of APRIL 2003.



John L. McGoldrick
Executive Vice President
and General Counsel



Secretary

94

PCT PETITORIO

Original (para ADMISION)

0	Para uso de la oficina receptora solamente	
0-1	Solicitud Internacional No.	
0-2	Fecha Internacional de registro	
0-3	Nombre de la oficina receptora y solicitud Internacional ante el PCT	
0-4	Petición ante el PCT forma-PCT/RO/101	
0-4-1	Preparada usando	PCT-SAFE [modelo EASY] Versión 3.50 (Estructura 0002.150)
0-5	Petición El abajo firmante requiere que la presente solicitud Internacional sea procesada de acuerdo al Tratado Internacional en Materia de Patentes	
0-6	Oficina receptora (especificada por el solicitante)	Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos (USPTO) (RO/US)
0-7	Clave de referencia del archivo del agente o solicitante	GY0111
I	Título de la invención	PROCESO PARA PREPARAR DIDESOXIINOSINA USANDO ENZIMA DE ADEÑOSINA DESAMINASA
II	Solicitante	
II-1	Esta persona es:	Solicitante solamente
II-2	Solicitante para	Todos los estados designados excepto US
II-4	Nombre	BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
II-5	Dirección	Route 206 y Province Line Road Princeton, New Jersey 08543-4000 Estados Unidos de América
II-6	Estado de nacionalidad	US
II-7	Estado de residencia	US
II-8	No. Tel.	609-252-4014
II-9	No. Facsimil	609-252-4526
III-1	Solicitante y/o inventor	
III-1-1	Esta persona es:	Solicitante e inventor
III-1-2	Solicitante para:	US solamente
III-1-4	Nombre (ULTIMO, Primero)	SKONEZNY, Paul, M.
III-1-5	Dirección:	3471 Van Wire Drive East Baldwinsville, New York 13027 Estados Unidos de América
III-1-6	Estado de nacionalidad	US
III-1-7	Estado de residencia	US

PCT PETITORIO

Original (para ADMISION)

III-2	Solicitante y/o inventor	
III-2-1	Esta persona es:	Solicitante e inventor
III-2-2	Solicitante para	US Solamente
III-2-4	Nombre (ULTIMO, Primero)	POLITINO, Michael
III-2-5	Dirección:	111 Century Drive Syracuse, New York 13209 Estados Unidos de América
III-2-6	Estado de nacionalidad	US
III-2-7	Estado de residencia	US
III-3	Solicitante y/o inventor	
III-3-1	Esta persona es:	Solicitante e inventor
III-3-2	Solicitante para	US Solamente
III-3-4	Nombre (ULTIMO, Primero)	LIU, Suo, W.
III-3-5	Dirección:	4997 Firethorn Circle Manlius, New York 13104 Estados Unidos de América
III-3-6	Estado de nacionalidad	US
III-3-7	Estado de residencia	US
III-4	Solicitante y/o inventor	
III-4-1	Esta persona es:	Solicitante e inventor
III-4-2	Solicitante para	US Solamente
III-4-4	Nombre (ULTIMO, Primero)	BOYLE, Alfred, W.
III-4-5	Dirección:	4836 Westfield Drive Manlius, New York 13104 Estados Unidos de América
III-4-6	Estado de nacionalidad	US
III-4-7	Estado de residencia	US
III-5	Solicitante y/o inventor	
III-5-1	Esta persona es:	Solicitante e inventor
III-5-2	Solicitante para	US Solamente
III-5-4	Nombre (ULTIMO, Primero)	CHEN, Jason, G.
III-5-5	Dirección:	4956 Tinderbox Circle Manlius, New York 13104 Estados Unidos de América
III-5-6	Estado de nacionalidad	CN
III-5-7	Estado de residencia	US

PCT PETITORIO

Original (para ADMISION)

III-6	Solicitante y/o inventor	
III-6-1	Esta persona es:	Solicitante e Inventor
III-6-2	Solicitante para	US Solamente
III-6-4	Nombre (ULTIMO, Primero)	STEIN, Gregory, L.
III-6-5	Dirección:	870 Country Route 84 Mallory, New York 13103 Estados Unidos de América
III-6-6	Estado de nacionalidad	US
III-6-7	Estado de residencia	US
III-7	Solicitante y/o inventor	
III-7-1	Esta persona es:	Solicitante e Inventor
III-7-2	Solicitante para	US Solamente
III-7-4	Nombre (ULTIMO, Primero)	FRANCESCHINI, Thomas
III-7-5	Dirección:	8635 Honeycomb Path Cicero, New York 13039 Estados Unidos de América
III-7-6	Estado de nacionalidad	US
III-7-7	Estado de residencia	US
III-8	Solicitante y/o inventor	
III-8-1	Esta persona es:	Solicitante e Inventor
III-8-2	Solicitante para	US Solamente
III-8-4	Nombre (ULTIMO, Primero)	ANDERSON, Wendy, L.
III-8-5	Dirección:	217 México Point Drive Mexico, New York 13133 Estados Unidos de América
III-8-6	Estado de nacionalidad	US
III-8-7	Estado de residencia	US
IV-1	Agente o representante común o dirección para correspondencia La persona identificada posteriormente es por es/ha sido apuntado para actuar en beneficio del(los) solicitante(s) ante las Autoridades Internacionales competentes como:	
IV-1-1	Nombre:	Agente
IV-1-2	Dirección:	BAXAM, Deanna Bristol-Myers Squibb Company P.O. Box 4000 Princeton, New Jersey 08543-400 Estados Unidos de América
IV-1-3	Teléfono No:	609-252-4014
IV-1-4	Facsimil No.:	609-252-4526
IV-1-6	No. de registro de agente	45,226
IV-2	Agentes adicionales	Agentes adicionales con la misma dirección como el primer agente nombrado

PCT PETITORIO

Original (para ADMISION)- Impreso 18.12.2003 03:24:17 PM

IV-2-1	Nombre(s)	O'BRIEN, Maureen (42,043); GOLIAN, Paul, D. (42,591); BABAJKO, Suzanne; BELFIELD, Jing (45,914); BOGIE, Terence (44,544); BÜCHHOLZ, Briana (39,123); D'AMICO, Stephen (46,652); DAVIS, Stephen (26,693); DUNCAN, Laurelee (44,096); DUNCAN, Sammy (46,675); GIBBONS, Maureen (44,121); KILCOYNE, John (33,100); KLEIN, Christopher (34,363); KORSEN, Elliott (32,705); LAMERDIN, John (44,858); LANGE, Keith (44,201); PEIST, Kenneth (45,006); PROVOOST, Jonathan (44,292); RODNEY, Burton (22,076); SEER, Audrey (39,024); VANATTEN, Mary, K. (39,408); WIHSLOW, Anastasia (40,875); ALGIERI, Aldo (31,697); DUBOFF, Samuel (25,969); EPPERSON, James (52,867); MAKUJINA, Shah (41,174); RYAN, Richard (30,491); VOLLES, Warren, K. (33,810)
V	DESIGNACIONES	
V-1	La presentación de esta petición constituye bajo la Regla 4.9(a), la designación de todos los Estados Contratantes encontrados por el PCT en la fecha de presentación internacional, para otorgar cada tipo de protección disponible y, donde es aplicable, para otorgar patente regionales tanto como nacional.	
VI-1	Prioridad reivindicada de la primera solicitud nacional	
VI-1-1	Fecha de presentación	04 Marzo 2003 (04.03.2003)
VI-1-2	Número	60/451,842
VI-1-3	País	US
V-2	Petición de documentos de prioridad La oficina receptora requiere para preparar y transmitir a la Oficina Internacional una copia certificada de la primera solicitud identificada como los puntos	VI-1

PCT PETITORIO

Original (para ADMISION)

VII-1	Selección de la Autoridad de Búsqueda Internacional		
VIII	Declaraciones	Número de declaraciones	
VIII-1	Declaración para la identidad del inventor	-	
VIII-2	Declaración de derecho al solicitante, como para la fecha de presentación internacional, para aplicar y ser otorgada una patente	1	
VIII-3	Declaración de derecho al solicitante, como para fecha de presentación internacional, para reivindicar la prioridad de la primera solicitud	1	
VIII-4	Declaración del inventor (únicamente para el propósito de la designación de los Estados Unidos de América	-	
VIII-5	Declaración como descripciones no perjudiciales o excepciones para carencia de novedad	-	

PCT PETIT RIO

Original (para ADMISION)

VIII-2-1	Declaración: Derecho para aplicar para y ser otorgada una patente Declaración de derecho al solicitante, como a la fecha de presentación internacional, para aplicar para y ser otorgada una patente (Reglas 4.17(II) y 51bis.1(a)(II)), en el caso donde la declaración bajo la Regla 4.17(iv) no es parodiada: Nombre (ULTIMO, Primero)	En relación a esta solicitud internacional BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY da derecho para aplicar por y ser otorgada una patente por virtud de lo siguiente
VIII-2-1-(iv)		una cesión de SKONEZNY Paul, M. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1-(iv)		una cesión de POLITINO Michael a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1-(iv)		una cesión de LIU Suo, W. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1-(iv)		una cesión de BOYLE Alfred, W. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1-(iv)		una cesión de CHEN Jason, G. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1-(iv)		una cesión de STEIN Gregory, L. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1-(iv)		una cesión de FRANCESCHINI Thomas a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1-(iv)		una cesión de ANDERSON Wendy, L. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-2-1-(ix)		Todas las designaciones excepto la designación de los Estados Unidos de América

PCT PETITORIO

Original (para ADMISION)

VIII-3-1	Declaración: Derecho para reivindicar prioridad Declaración de derecho al solicitante, como a la fecha de presentación internacional, para reivindicar la prioridad de la primera solicitud especificada abajo, donde el solicitante no es el solicitante el cual presentó la primera solicitud o donde el nombre del solicitante ha cambiado puesto que la presentación de la primera solicitud (Reglas 4.17(III) y 51bis.1(a)(III)) Nombre:	En relación a esta solicitud internacional BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY da derecho para reivindicar la prioridad de la primera solicitud No. 60/451,842 por virtud de lo siguiente:
VIII-3-1-(iv)		una cesión de SKONEZNY Paul, M. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1-(iv)		una cesión de POLITINO Michael a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1-(iv)		una cesión de LIU Suo, W. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1-(iv)		una cesión de BOYLE Alfred, W. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1-(iv)		una cesión de CHEN Jason, G. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1-(iv)		una cesión de STEIN Gregory, L. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1-(iv)		una cesión de FRANCESCHINI Thomas a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1-(iv)		una cesión de ANDERSON Wendy, L. a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechada el 21 de Agosto de 2003 (21.08.2003)
VIII-3-1-(ix)		Todas las designaciones excepto la designación de los Estados Unidos de América

PCT PETITORI

Original (para ADMISION)

IX	Lista de verificación	Número de hojas	Archivos electrónicos relacionados
IX-1	Solicitud	9	-
IX-2	Descripción	25	-
IX-3	Reivindicaciones	3	-
IX-4	Resumen	1	✓
IX-5	Dibujos	0	-
IX-7a	Número sub-total de páginas	38	
IX-8a	Parte del listado de secuencia presentada en forma legible en computadora en adición a lo presentado en forma de documento (bajo la sección 801(a)(ii))	5	
IX-7	TOTAL	43	
	Artículos anexos	Papel o documento(s) unidos	Campos electrónicos unidos
IX-8	Hoja de calculo de honorarios	✓	-
IX-10	Original del poder general de abogado	✓	
IX-16(A)	Listado de secuencia en forma legible en computadora:		
IX-16(A)-(ii)	Copias adicionales incluyendo, donde es aplicable, la copia para propósito de búsqueda internacional bajo la Regla 13ter	-	1 disquete
IX-17	Disco de PCT-EASY disquete	-	✓
IX-18	Otro:	certificación	
IX-19	Figura de dibujos los cuales serán acompañantes del resumen		
IX-20	Idioma de registro de la solicitud internacional	Inglés	
X-1	Firma del solicitante, agente o representante común	(rúbrica)	
X-1-1	Nombre:	BAXAM, Deanna	
X-1-2	Nombre del firmante:		
X-1-3	Puesto		

PCT PETITORI

Original (para ADMISION)

PARA LA OFICINA RECEPTORA SOLAMENTE

10-1	Fecha de la recepción del contenido de la aplicación Internacional	
10-2	Dibujos	
10-2-1	Recibidos	
10-2-2	No recibidos	
10-3	Fecha corregida de la recepción actual debido a recepción última pero a tiempo de papeles o dibujos que completan el contenido de la aplicación Internacional	
10-4	Fecha de la recepción a tiempo de las correcciones requeridas bajo el Artículo 11(2) del PCT	
10-5	Autoridad de Búsqueda Internacional	ISA/US
10-6	Transmisión de la copia de búsqueda retrasada hasta que los honorarios estén pagados	

PARA USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL SOLAMENTE

11-1	Fecha de la recepción de la copia del documento por la Oficina Internacional	
------	--	--

APOSTILLE

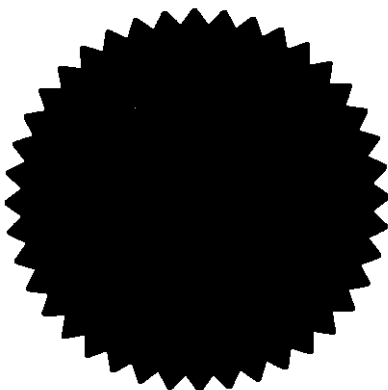
(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

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

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 4TH DAY OF AUGUST 2005
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A234532
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE

John E McCormac

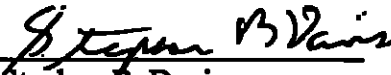


60 104

GY0111

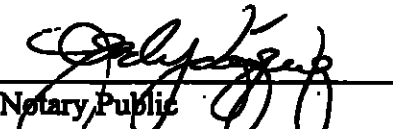
AFFIDAVIT

I, Stephen B. Davis, Senior Patent Counsel, Patent Department –
Bristol-Myers Squibb Company do hereby certify that this document is a notarized true
and accurate copy of the original assignment signed by the inventors.


Stephen B. Davis
Senior Patent Counsel

STATE OF NEW JERSEY)
)
COUNTY OF MERCER) ss.

Subscribed before me on this 3rd day of August, 2005


Notary Public

(SEAL)

EVELYN VAZQUEZ
Notary Public of New Jersey
No. 2106806
My Commission Expires Dec. 8, 2007
Registered in Middlesex County

KB

103



Commissioner for Patents
Washington, DC 20591
www.uspto.gov

APPLICATION NUMBER	FILING DATE	GRP ART UNIT	FIL FEE REC'D	ATTY DOCKET NO	DRAWINGS	TOT CLAIMS	IND CLAIMS
60/451,842 ✓	03/04/2003 ✓		160	GY0111 (PSP)			

CONFIRMATION NO. 6178 ✓

23914
STEPHEN B. DAVIS
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
PATENT DEPARTMENT
P O BOX 4000
PRINCETON, NJ 08543-4000

FILING RECEIPT



00000000009920927

Date Mailed: 04/28/2003 ✓

Receipt is acknowledged of this provisional Patent Application. It will not be examined for patentability and will become abandoned not later than twelve months after its filing date. Be sure to provide the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF APPLICANT, and TITLE OF INVENTION when inquiring about this application. Fees transmitted by check or draft are subject to collection. Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. If an error is noted on this Filing Receipt, please write to the Office of Initial Patent Examination's Filing Receipt Corrections, facsimile number 703-748-9195. Please provide a copy of this Filing Receipt with the changes noted thereon. If you received a "Notice to File Missing Parts" for this application, please submit any corrections to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections (if appropriate).

Applicant(s)

Paul M. Skonezny, Cicero, NY; ✓
Michael Politino, Fayetteville, NY; ✓
Suo W. Liu, Manlius, NY; ✓
Alfred W. Boyle, Manlius, NY; ✓
Jason G. Chen, Manlius, NY; ✓
Gregory L. Stein, Mallory, NY; ✓
Thomas Franceschini, Cicero, NY; ✓
Wendy L. Anderson, Mexico, NY; ✓

RECEIVED
BMS PATENT LAW

MAY 02 2003

Docketed Item FLR
Due Date -
Attorney BAXAM

If Required, Foreign Filing License Granted: 04/28/2003

Projected Publication Date: None, application is not eligible for pre-grant publication

Non-Publication Request: No

Early Publication Request: No

Title

Process for preparing dideoxyinosine using adenosine deaminase enzyme ✓



106
UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D.C. 20231



7000852854

FEBRUARY 11, 2004

PTAS

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
STEPHEN B. DAVIS
PATENT DEPARTMENT
P.O. BOX 4000
PRINCETON, NJ 08543-4000

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, ASSIGNMENT DIVISION, BOX ASSIGNMENTS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C. 20231.

RECORDATION DATE: 02/10/2004

REEL/FRAME: 014322/0484
NUMBER OF PAGES: 7

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:

SKONEZNY, PAUL M.

DOC DATE: 08/21/2003

ASSIGNOR:

POLITINO, MICHAEL

DOC DATE: 08/21/2003

ASSIGNOR:

LIU, SUO W.

DOC DATE: 08/21/2003

ASSIGNOR:

BOYLE, ALFRED W.

DOC DATE: 08/21/2003

ASSIGNOR:

CHEN, JASON G.

DOC DATE: 08/21/2003

ASSIGNOR:

STEIN, GREGORY L.

DOC DATE: 08/21/2003

ASSIGNOR:
FRANCESCHINI, THOMAS

DOC DATE: 08/21/2003

ASSIGNOR:
ANDERSON, WENDY L.

DOC DATE: 08/21/2003

ASSIGNEE:
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
LAWRENCEVILLE-PRINCETON ROAD
PRINCETON, NEW JERSEY 08543-4000

SERIAL NUMBER: 60451842
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 03/04/2003
ISSUE DATE:

ANTIONE ROYALL, EXAMINER
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

107

FEB. 18. 2004 1:34PM

FORM PTO-1288
(Rev. 8-99)ORDINATION COVER SHEET
700065265
PATENTS ONLYU.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office

OMB No. 0551-0011 (exp. 4/04)

GYD111 (PSP)

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

1. Name of conveying party(ies):

Paul M. Stonazny, Michael Polino, Suo W. Liu, Alfred W. Boyle, Jason G. Chen, Gregory L. Stein, Thomas Franceschini, Wendy L. Anderson

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

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

Execution Date: 8/21/03, 8/21/03, 8/21/03, 8/21/03,
8/21/03, 8/21/03, 8/21/03 and 8/21/03.

2. Name and address of receiving party(ies)

Name: Bristol-Myers Squibb Company

Internal Address: _____

Street Address: Lawrenceville-Princeton RoadCity: Princeton State: NJ ZIP: 08543-4000Additional 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)

80/451,842

B. Patent No.(s)

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

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

Name: Stephen B. DavisInternal Address: Bristol-Myers Squibb CompanyPatent DepartmentStreet Address: P.O. Box 4000City: Princeton State: NJ ZIP: 08543-40006. Total number of applications and patents involved: 17. Total fee (\$7 CFR 3.41) \$ 40

- ☐ Enclosed
☒ Authorized to be charged to deposit account and any other additional fees required.

8. Deposit account number:

18-2890 (in the name of Bristol-Myers Squibb Company)

(Attach duplicate copy of this page if paying by deposit account)

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.

Deanna L. Baxam
 Name of Person Signing
 Reg. No. 45,268


 Signature

February 10, 2004
 Date
☐ Certificate of mailing on reverse sideTotal number of pages including cover sheet, attachments, and document: 8Mail documents to be recorded with required cover sheet information to:
Commissioner of Patents & Trademarks, Box Assignments, Washington, D.C. 20231

ASSIGNMENT

We,

Paul M. Skonezny

residing at

~~6151 Wynmoor Drive~~ 3471 VAN WIE DRIVE EAST
~~Cicero, New York 13039~~ BALDWINVILLE, NEW YORK 13027
United States of America

Michael Pollino

residing at

~~5100 Highbridge Street~~ 111 CENTURY DRIVE
~~Apt. 54~~
~~Fayetteville, New York 13068~~ SYRACUSE, NY 1320
United States of America

Suo W. Liu

residing at

4997 Firethorn Circle
Manlius, New York 13104
United States of America

Alfred W. Boyle

residing at

4836 Westfield Drive
Manlius, New York 13104
United States of America

Jason G. Chen

residing at

4956 Tinderbox Circle
Manlius, New York 13104
United States of America

Gregory L. Stein

residing at

870 County Route 84
Mallory, New York 13103
United States of America

Thomas Franceschini

residing at

8635 Honeycomb Path
Cicero, New York 13039
United States of America

Wendy L. Anderson

residing at

217 Mexico Point Drive
Mexico, New York 13114
United States of America,

pursuant to contractual obligations heretofore assumed by us and/or for good and valuable consideration, the receipt and adequacy of which is hereby acknowledged, do hereby sell and assign to Bristol-Myers Squibb Company, a Delaware corporation, having a place of business at Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ 08543-4000, its successors, assigns and legal representatives, all our right, title and interest, which includes the right to and full benefit of such priorities as may now or hereafter be granted to us by local laws or by treaty, including any international convention for the protection of industrial property, in and for all countries of the world, including the United States and its territories and possessions, in and to the invention entitled:

PROCESS FOR PREPARING DIDEOXYINOSINE USING ADENOSINE DEAMINASE ENZYME

Invented by us and described in the provisional United States patent application

Application No. 60/451,842, filed March 4, 2003,

Including said provisional United States patent application and any application claiming priority from said provisional application, filed in any country, and any patents which may be issued and/or granted thereon, and all divisions, continuations, reissues, reexamination certificates and extensions thereof in all countries, the said interest being the entire ownership of said invention and all of said applications, patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates to be held and enjoyed by the said Bristol-Myers Squibb Company and its successors. and assigns to the full end of the terms to which said patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates may be granted and/or issued, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us if this sale, assignment and transfer had not been made; ✓

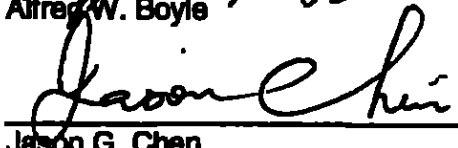
And we hereby agree to communicate to said assignee or its representatives any facts known to us respecting said invention, to testify in any legal proceedings, to sign and/or execute any further documents and/or instruments which may be necessary, lawful and proper in and/or for the filing and/or prosecution of all applications, including divisional, continuation and reissue applications, extensions and reexamination certificates and/or the granting and/or issuance thereof and/or to otherwise secure title to said invention and all of said applications, patents (including reissue patents, extensions and reexamination certificates in said assignee, and in general to do everything possible to aid said assignee, its successors and assigns to obtain and enforce proper protection for said invention in all countries.

Signed this 21 day of August, 2003 by Paul M. Skonezny
Paul M. Skonezny

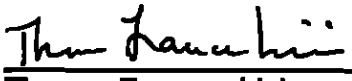
Signed this 21 day of AUGUST, 2003 by Michael Pollino
Michael Pollino

Signed this 21 day of August, 2003 by Suo W. Liu
Suo W. Liu

Signed this 21 day of August, 2003 by 
Alfred W. Boyle

Signed this 21 day of August, 2003 by 
Jason G. Chen

Signed this 21 day of August, 2003 by 
Gregory L. Stein

Signed this 21 day of August, 2003 by 
Thomas Franceschini

Signed this 21 day of August, 2003 by 
Wendy L. Anderson

STATE OF NEW YORK)
COUNTY OF Onondaga) ss.

On this day 21 of August, 2003, before me came Paul Skonezny, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL] PENNY A. HASTINGS
Notary Public, State of New York
No. 4913366
Qualified in Madison County
Commission Expires Nov. 30, 20 05

Penny A. Hastings
Notary Public

STATE OF NEW YORK)
COUNTY OF Onondaga) ss.

On this day 21 of August, 2003, before me came Michael Pollino, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL] PENNY A. HASTINGS
Notary Public, State of New York
No. 4913366
Qualified in Madison County
Commission Expires Nov. 30, 20 05

Penny A. Hastings
Notary Public

STATE OF NEW YORK)
COUNTY OF Onondaga) ss.

On this day 21 of August, 2003, before me came Suo W. Liu, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]
PENNY A. HASTINGS
Notary Public, State of New York
No. 4913366
Qualified in Madison County
Commission Expires Nov. 30, 20 05

Penny A. Hastings
Notary Public

113

STATE OF NEW YORK)
COUNTY OF Onondaga) ss.

On this day 21 of August, 2003, before me came Alfred W. Boyle, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]
PENNY A. HASTINGS
Notary Public, State of New York
No. 4913366
Qualified in Madison County
Commission Expires Nov. 30, 20 05

Penny A. Hastings
Notary Public

STATE OF NEW YORK)
COUNTY OF Onondaga) ss.

On this day 21 of August, 2003, before me came Jason G. Chen, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]
PENNY A. HASTINGS
Notary Public, State of New York
No. 4913366
Qualified in Madison County
Commission Expires Nov. 30, 20 05

Penny A. Hastings
Notary Public

STATE OF NEW YORK)
COUNTY OF Onondaga) ss.

On this day 21 of August, 2003, before me came Gregory L. Stein, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]
PENNY A. HASTINGS
Notary Public, State of New York
No. 4913366
Qualified in Madison County
Commission Expires Nov. 30, 20 05

Penny A. Hastings
Notary Public

STATE OF NEW YORK)
COUNTY OF Onondaga) ss.

On this day 21 of August, 2003, before me came Thomas Franceschini, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]
PENNY A. HASTINGS
Notary Public, State of New York
No. 4913368
Qualified in Madison County
Commission Expires Nov. 30, 20 05

Penny A. Hastings
Notary Public

STATE OF NEW YORK)
COUNTY OF Onondaga) ss.

On this day 21 of August, 2003, before me came Wendy L. Anderson, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]
PENNY A. HASTINGS
Notary Public, State of New York
No. 4913368
Qualified in Madison County
Commission Expires Nov. 30, 20 05

Penny A. Hastings
Notary Public

**TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de cesión de la solicitud de patente a
Bristol-Myers Squibb Company, firmado por los cedentes y el cesionario.**

APOSTILLE

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. **PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**
2. **ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR
EVELYN VAZQUEZ**
3. **ACTUANDO EN CAPACIDAD DE
NOTARIO PÚBLICO DE NEW JERSEY**
4. **LLEVA EL SELLO/TIMBRE DE:
EVELYN VAZQUEZ, NOTARIO**

CERTIFICADO

5. **EN TRENTON, NEW JERSEY**
6. **EL 4 DE AGOSTO DE 2005**
7. **POR: John E. McCormac, CPA, TESORERO DE NEW JERSEY**
8. **NO. A234532**
9. **SELLO/TIMBRE**
10. **FIRMA**

Jonh E. McCormac (firma)

116 .

Declaración Jurada por Escrito

Yo, Stephen B. Davis, Asesor Principal de Patentes, Departamento de Patentes -
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY certifico que esta una copia notariada,
verdadera y precisa de la cesión original firmada por los inventores.

(Firma)

Stephen B. Davis

ESTADO DE NEW JERSEY

)

)

CONDADO DE MERCER

)

ss.

Firmado ante mi este 6 de Enero de 2005

Evelyn Vazquez (Firma)
Notario Público

[Sello]

Hay un sello que dice:

EVELYN VAZQUEZ

Notario Público de New Jersey

No. 2106805

Mi comisión expira el 9 de Diciembre de 2007

Registrado en el Condado de Middlesex

117

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

No. Sol.	Fecha de presentación o de 371(c)	GRP ART UNIDAD	Tarifa de presentación	Número de expediente de abogado	Dibujos	Relv. Tot.	Relv. Ind.
----------	-----------------------------------	----------------	------------------------	---------------------------------	---------	------------	------------

60/451,842 03/04/2003

160

GY0111
(PSP)

23914

STEPHEN B. DAVIS

BISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

DEPARTAMENTO DE PATENTES

CASILLA POSTAL 4000

PRINCETON, NJ 08543-4000

Fecha de envío: 04/28/2003

Se reconoce haber recibido esta Solicitud de Patente regular. Será tenida en consideración en su orden y usted será notificado como resultado del examen. Asegúrese de proporcionar NUMERO DE SOLICITUD DE PATENTE DE LOS ESTADOS UNIDOS, FECHA DE SOLICITUD, NOMBRE DEL SOLICITANTE, y TITULO DE LA INVENCION cuando pregunte por esta solicitud. Las tarifas transmitidas por cheque o letra de cambio están sujetas a cobro. Si nota un error en este Recibo de Presentación, por favor escriba a la Oficina de Corrección de Recibos de Presentación a Examen Inicial de Patentes, número de facsímil 703-746-8195. Por favor proporcione una copia de este Recibo de Presentación con los cambios anotados en el. Si usted recibió un "Nota para Presentar Partes Faltantes" para esta solicitud, por favor presente cualquier corrección a este Recibo de Presentación con su respuesta a la Nota. Cuando la USPTO procese la respuesta a la Nota, la USPTO generará otro Recibo de Presentación incorporando las correcciones solicitadas (de ser apropiado).

Solicitante(s)

Paul M. Skonszny, Cicero, NY;
Micheal Politino, Fayetteville, NY;
Suo W. Liu, Manlius, NY;
Alfred W. Boyle, Manlius, NY;
Jason G. Chen, Manlius, NY;
Gregory L. Stein, Mallory, NY;
Thomas Franceschini, Cicero, NY;
Wendy L. Anderson, Mexico, NY;

De ser requerida, Licencia de Presentación en el Extranjero Concedida: 04/28/2003**Fecha de publicación proyectada:** Ninguna, la solicitud no es elegible para publicación concedida con antelación.**Solicitud de no publicación:** No**Solicitud de publicación temprana:** No**Título:**

Proceso para preparar dideoxinosina usando la enzima adenosin deaminasa

118

11 de febrero de 2004

BISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
STEPHEN B. DAVIS
DEPARTAMENTO DE PATENTES
CASILLA POSTAL 4000
PRINCETON, NJ 08543-4000

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS
INFORME DE GRABACIÓN DE DOCUMENTO DE CESION

EL DOCUMENTO ADJUNTO HA SIDO GRABADO POR LA DIVISI3N DE CESIONES DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS. HAY DISPONIBLE UNA COPIA COMPLETA EN MICROFILME EN EL CUARTE DE B3SQUEDA DE CESIONES EN EL N3MERO DE ROLLO Y CUADRO REFERENCIADOS ABAJO.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACI3N CONTENIDA EN ESTE INFORME. LA INFORMACI3N CONTENIDA EN ESTE INFORME DE GRABACI3N REFLEJA LOS DATOS PRESENTES EN EL SISTEMA DE ASIGNACI3N DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED ENCUENTRA CUALQUIER ERROR O TIENE PREGUNTAS CONCERNIENTES A ESTE INFORME, PUEDE CONTACTAR AL EMPLEADO CUYO NOMBRE APARECE EN ESTE INFORME AL 703-308-9723. POR FAVOR ENV3E LA SOLICITUD DE CORRECCI3N A: OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS, DIVISI3N DE CESIONES, ASIGNACI3N DE CASILLAS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C.20231.

FECHA DE GRABACI3N: 02/10/2004

ROLLO/CUADRO: 014322/0484
N3MERO DE P3GINAS: 7

RESUMEN: CESI3N DE INTER3S DEL CEDENTE (VER DOCUMENTO PARA DETALLES).

CEDENTE: SKONEZNY, PAUL M.	FECHA DE DOC: 08/21/2003
CEDENTE: POLITINO, MICHAEL	FECHA DE DOC: 08/21/2003
CEDENTE: LIU, SUO W.	FECHA DE DOC: 08/21/2003
CEDENTE: BOYLE, ALFRED W.	FECHA DE DOC: 08/21/2003
CEDENTE: CHEN JASON G.	FECHA DE DOC: 08/21/2003
CEDENTE: STEIN, GREGORY L.	FECHA DE DOC: 08/21/2003

119

014322/0484 PAGINA 2

CEDENTE:
FRANCESCHINI, THOMAS

FECHA DE DOC: 08/21/2003

CEDENTE:
ANDERSON, WENDY L.

FECHA DE DOC: 08/21/2003

CESIONARIO:
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
LAWRENCEVILLE-PRINCETON ROAD
PRINCETON, NEW JERSEY 08543-4000

NÚMERO DE SERIE: 60451842
NÚMERO DE PATENTE:

FECHA DE PRESENTACIÓN: 03/04/2003
FECHA DE EMISIÓN:

ANTIONE ROYALL, EXAMINADOR
DIVISIÓN DE CESIONES
OFICINA DE REGISTROS PÚBLICOS

120

FORMULARIO PTO-1585 (Rev. 8-93) OMB No. 0851-0011 (exp. 4/94) TU0059 (PSP)	PORTADA DEL FORMULARIO DE REGISTRO 700028737 SOLO PATENTES	Departamento de Comercio de los Estados Unidos Oficina de Marcas y Patentes			
Al Honorable Comisionado de Marcas y Patentes: por favor registre los documentos originales adjuntos o copias de los mismos.					
1. Nombre de la(s) parte(s) cedente(s): Paul M. Skonezny, Michael Politino, Suo W. Liu, Alfred W. Boyle, Jason G. Chen, Gregory L. Satein, Thomas Franceschini, Wendy L. Anderson Se adjunta(n) nombre(s) adicional(es) de la(s) parte(s) cedente(s) ☐ SI ☒ No	2. Nombre y dirección de la(s) parte(s) que recibe(n) Nombre: <u>Bristol-Myers Squibb Company</u> Dirección Interna: _____ Dirección: <u>Lawrenceville-Princeton Road</u> Ciudad: <u>Princeton</u> Estado: <u>NJ</u> ZIP: <u>08543-4000</u> ¿Se adjunta(n) nombre(s) y dirección(es) adicional(es)? ☐ SI ☒ No				
3. Naturaleza del traspaso: ☒ Cesión ☐ Fusión ☐ Acuerdo de Seguridad ☐ Cambio de Nombre ☐ Otro: _____ Fecha de Ejecución: <u>8/21/03, 8/21/03, 8/21/03, 8/21/03,</u> <u>8/21/03, 8/21/03, 8/21/03 y 8/21/03</u>	4. Número(s) de Solicitud o número(s) de Patente: Si este documento está siendo entregado junto con una nueva solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es: _____ <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> A. Solicitud(es) de Patente No(s). <u>60/451,842</u> </td> <td style="width: 50%;"> B. No(s). de Patente </td> </tr> </table> ¿Se adjuntan números adicionales? ☐ SI ☒ No		A. Solicitud(es) de Patente No(s). <u>60/451,842</u>	B. No(s). de Patente 	
A. Solicitud(es) de Patente No(s). <u>60/451,842</u>	B. No(s). de Patente 				
5. Nombre y dirección de la parte a quien se le debe enviar la correspondencia de los documentos concernientes: Nombre: <u>Stephen B. Davis</u> Dirección Interna: <u>Bristol-Myers Squibb Company</u> <u>Departamento de Patentes</u> Dirección: <u>Apartado Postal 4000</u> Ciudad: <u>Princeton</u> Estado: <u>NJ</u> ZIP: <u>08542-4000</u>	6. Número total de solicitudes y patentes involucradas: <u>1</u> 7. Tarifa Total (37 CFR \$ 40 3.41) ☐ Adjunta ☒ Autorización para ser cargada a una cuenta de depósito y cualquier otra tarifa adicional requerida. 8. Número de cuenta depósito: <u>18-3880 (a nombre de Bristol-Myers Squibb Company)</u> (Anexar copia por duplicado de esta página si se paga por cuenta de depósito)				
NO USAR ESTE ESPACIO					
9. Declaración y firma: Hasta donde se y creo, la información anterior es veraz y correcta y cualquier copia adjunta es una copia veraz del documento original. <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;"> <u>Deanna L. Baxam</u> Nombre del suscrito Reg. No. 45,266 </td> <td style="width: 33%; text-align: center;"> <u>(Firma)</u> Firma </td> <td style="width: 33%; text-align: right;"> <u>febrero 10 de 2004</u> Fecha </td> </tr> </table> ☐ Certificado de envío por el reverso Número total de páginas incluyendo la portada, anexos, y documentos: 8			<u>Deanna L. Baxam</u> Nombre del suscrito Reg. No. 45,266	<u>(Firma)</u> Firma	<u>febrero 10 de 2004</u> Fecha
<u>Deanna L. Baxam</u> Nombre del suscrito Reg. No. 45,266	<u>(Firma)</u> Firma	<u>febrero 10 de 2004</u> Fecha			

121.

CESIÓN

Nosotros,

Paul M. Skonezny	residente en	3471 Van Wie Drive East Baldwinsville, New York 13027 Estados Unidos de América
Micheal Politino	residente en	111 Century Drive Syracude, New York 1320 Estados Unidos de América
Suo W. Liu	residente en	4997 Firethorn Circle Manlius, New York 13104 Estados Unidos de América
Alfred W. Boyle	residente en	4836 Westfield Drive Manlius, New York 13104 Estados Unidos de América
Jason G. Chen	residente en	4956 Tinderbox Circle Manlius, New York 13104 Estados Unidos de América
Gregory L. Stein	residente en	870 County Route 84 Mallory, new York 13103 Estados Unidos de América
Thomas Franceschini	residente en	8635 Honeycomb Path Cicero, New York 13039 Estados Unidos de América
Wendy L. Anderson	residente en	217 Maxico Point Drive Mexico, New York 13114 Estados Unidos de América

en virtud de obligaciones contractuales hasta ahora asumidas por nosotros y/o en buena y valiosa consideración, el recibo y suficiencia del mismo se reconoce aquí, por medio de la presente vendemos y cedemos a Bristol-Myers Squibb Company, una corporación de Delaware, que funciona en Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ 08534-4000, sus sucesores, cedentes y representantes legales, todo nuestro derecho, título e interés, el cual incluye el beneficio correcto y completo de tales prioridades que puedan ser concedidas ahora o en adelante a nosotros por leyes locales o tratados, incluyendo cualquier convenio internacional para la protección de propiedad industrial, en y para todos los países del mundo, incluyendo a los Estados Unidos y sus territorios y posesiones, en y a la invención titulada:

PROCESO PARA PREPARAR DIDEOXINOSINA USANDO LA ENZIMA ADENOSIN DEAMINASA

inventado por nosotros y descrito en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos

Solicitud No. 60/451,842, presentada el 4 de marzo de 2003

incluyendo dicha solicitud de patente no provisional de los Estados Unidos y cualquier solicitud que reivindique prioridad de dicha solicitud provisional, presentada en cualquier país, y cualquier patente que pueda ser emitida y/o otorgada a la misma, y todas las divisiones, continuaciones, reemisiones, certificado de reexaminación y extensiones de la misma en todos los países, dicho interés siendo la propiedad total de dicha invención y de todas dichas solicitudes, patentes (incluyendo patentes reemitidas), extensiones y certificados de reexaminación a ser tenido y disfrutados por Bristol-Myers Squibb Company y sus sucesores y cedentes por la totalidad de los términos que sean concedidos y/o emitidos a dicha patente (incluyendo patentes reemitidas), extensiones, y certificados de reexaminación, tan completa y totalmente como los mismos habrían sido tenidos y disfrutados por nosotros si esta venta, cesión y transferencia no hubiera sido hecha;

Y por la presente acordamos comunicar a dicho cesionario o sus representantes cualquier hecho que conozcamos respecto a esta invención, atestiguar en cualquier proceso legal, firmar y/o ejecutar cualquier documento adicional y/o instrumentos que puedan ser necesarios, legales y apropiados en y/o para la presentación y/o procesamiento de todas las solicitudes, incluyendo solicitudes de división, continuación y reemisión, certificados de extensión y reexaminación y/o concesión y/o emisión de la misma y/o de otro modo asegurar el título de dicha invención y de todas dichas solicitudes, patentes (incluyendo reemisión de patentes, certificados de extensión y reexaminación a dicho cesionario, y en general hacer todo lo posible para ayudar a dicho cesionario, sus sucesores y cesionarios a obtener y hacer cumplir la protección apropiada para dicha invención entonos los países.

Firmado este 21 de agosto de 2003 por

Paul M. Skonezny (Firma)
Paul M. Skonezny

Firmado este 21 de agosto de 2003 por

Michael Politino (Firma)
Michael Politino

Firmado este 21 de agosto de 2003 por

Suo W. Liu (Firma)
Suo W. Liu

Firmado este 21 de agosto de 2003 por	<u>Alfred W. Boyle (Firma)</u> Alfred W. Boyle
Firmado este 21 de agosto de 2003 por	<u>Jason G. Chen (Firma)</u> Jason G. Chen
Firmado este 21 de agosto de 2003 por	<u>Gregory L. Stein (Firma)</u> Gregory L. Stein
Firmado este 21 de agosto de 2003 por	<u>Thomas Franceschini (Firma)</u> Thomas Franceschini
Firmado este 21 de agosto de 2003 por	<u>Wendy L. Anderson(Firma)</u> Wendy L. Anderson

ESTADO DE NEW YORK)
)ss.
CONDADO DE Onandoga)

Este 21 de Agosto de 2003, ante mi vino Paul Skonenzy, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada en, y quien ejecutó la cesión anterior y reconoció que la ejecutó.

[SELLO] Penny A. Hastings (Firma)
Notario Público

PENNY A HASTINGS
Notario Público, Estado de New York
No. 4913368
Calificado en el condado de Madison
La comisión expira noviembre 30 de 2005

ESTADO DE NEW YORK)
)ss.
CONDADO DE Onandoga)

Este 21 de Agosto de 2003, ante mi vino Michael Politino, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada en, y quien ejecutó la cesión anterior y reconoció que la ejecutó.

[SELLO] Penny A. Hastings (Firma)
Notario Público

PENNY A HASTINGS
Notario Público, Estado de New York
No. 4913368
Calificado en el condado de Madison
La comisión expira noviembre 30 de 2005

ESTADO DE NEW YORK)
)ss.
CONDADO DE Onandoga)

Este 21 de Agosto de 2003, ante mi vino Suo W. Liu, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada en, y quien ejecutó la cesión anterior y reconoció que la ejecutó.

[SELLO] Penny A. Hastings (Firma)
Notario Público

PENNY A HASTINGS
Notario Público, Estado de New York
No. 4913368
Calificado en el condado de Madison
La comisión expira noviembre 30 de 2005

ESTADO DE NEW YORK)
)ss.
CONDADO DE Onandoga)

Este 21 de Agosto de 2003, ante mi vino Alfred W. Boyle, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada en, y quien ejecutó la cesión anterior y reconoció que la ejecutó.

[SELLO] Penny A. Hastings (Firma)
Notario Público

PENNY A HASTINGS
Notario Público, Estado de New York
No. 4913366
Calificado en el condado de Madison
La comisión expira noviembre 30 de 2005

ESTADO DE NEW YORK)
)ss.
CONDADO DE Onandoga)

Este 21 de Agosto de 2003, ante mi vino Jason G. Chen, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada en, y quien ejecutó la cesión anterior y reconoció que la ejecutó.

[SELLO] Penny A. Hastings (Firma)
Notario Público

PENNY A HASTINGS
Notario Público, Estado de New York
No. 4913366
Calificado en el condado de Madison
La comisión expira noviembre 30 de 2005

ESTADO DE NEW YORK)
)ss.
CONDADO DE Onandoga)

Este 21 de Agosto de 2003, ante mi vino Gregory L. Stein, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada en, y quien ejecutó la cesión anterior y reconoció que la ejecutó.

[SELLO] Penny A. Hastings (Firma)
Notario Público

PENNY A HASTINGS
Notario Público, Estado de New York
No. 4913366
Calificado en el condado de Madison
La comisión expira noviembre 30 de 2005

ESTADO DE NEW YORK)
)ss.
CONDADO DE Onandoga)

Este 21 de Agosto de 2003, ante mi vino Thomas Franceschini, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada en, y quien ejecutó la cesión anterior y reconoció que la ejecutó.

[SELLO] Penny A. Hastings (Firma)
Notario Público

PENNY A HASTINGS
Notario Público, Estado de New York
No. 4913366
Calificado en el condado de Madison
La comisión expira noviembre 30 de 2005

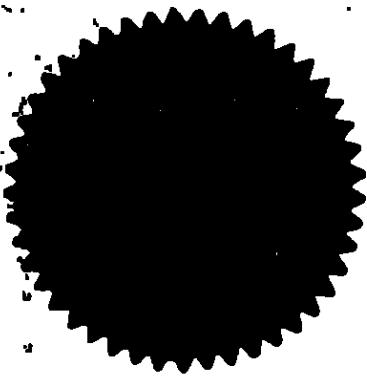
ESTADO DE NEW YORK)
)ss.
CONDADO DE Onandoga)

Este 21 de Agosto de 2003, ante mi vino Wendy L. Anderson, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada en, y quien ejecutó la cesión anterior y reconoció que la ejecutó.

[SELLO] Penny A. Hastings (Firma)
Notario Público

PENNY A HASTINGS
Notario Público, Estado de New York
No. 4913366
Calificado en el condado de Madison
La comisión expira noviembre 30 de 2005

STATE OF NEW JERSEY } ss.
County of Mercer



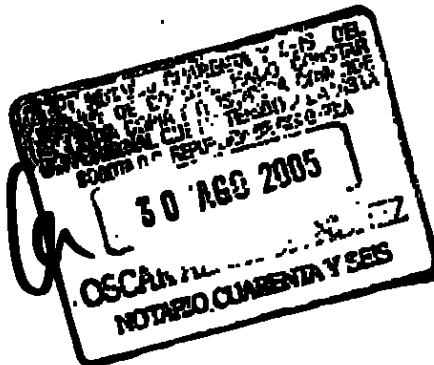
I, CATHERINE DICOSTANZO, Clerk of the County of Mercer,

Do Hereby Certify that *Rene P. Barthone*
Esq., whose name is subscribed to the acknowledgment, proof or affidavit of
the annexed instrument, and thereon written, is and was at the time of
taking the same, a Notary Public in and for said State,
dwelling in said County, commissioned and sworn and duly authorized by
the laws thereof to take the proofs and acknowledgments of deeds or other
instruments of writing, and affidavits to be recorded in said State, and that I
am well acquainted with the handwriting of said official, and verily believe
that the signature is genuine.
Further Certify that impression of Seal of Notaries Public not required by
law be filed in my office.

In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the seal of
said County and Courts, at Trenton this *15th* day of

April A.D. nineteen hundred and *thirty nine*

Catherine DiCOSTANZO Mercer County Clerk.



EL SUSCRITO CONSUL DE COLOMBIA**VISTOS LOS DOCUMENTOS PRESENTADOS POR LOS INTERESADOS****CERTIFICA**

Que el Señor (a), **CATHERINE Dícostanzo Clerck** del condado de Mercer estado de New Jersey, autenticó la firma de la notario(a) publico(a) sr (a). **DIANE C. BARTRAN** del estado de New Jersey, Estados Unidos de América y quien ejercía las funciones antes expresadas, y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos, son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales;

Que la notario(a) antes citada autenticó la firma del señor **STEPHEN B. DAVIS-** quien actua en calidad de Asesor de Patentes de la Compañia **BRIST L-MEYERS SQUIBB COMPANY** sociedad que existe y esta legalmente organizada bajo las leyes del estado de Delaware U.S.A



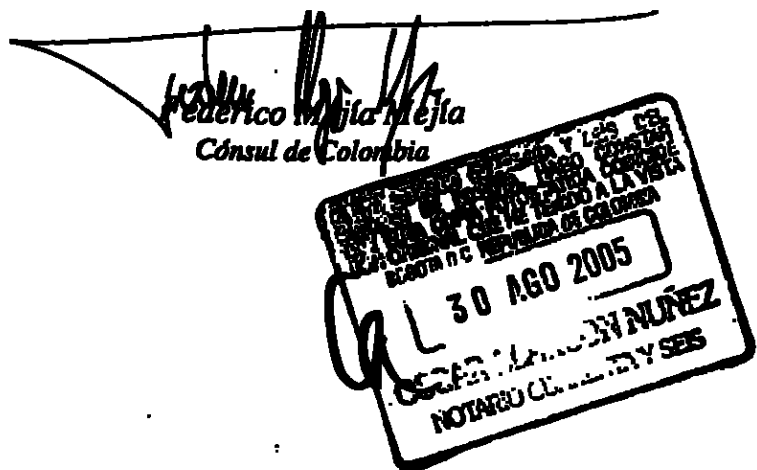
Que ha tenido a la vista los documentos probatorios de los hechos citados y constatados por el notario público y el County Clerck del estado de New Jersey, los cuales forman parte integral del presente documento.

Se expide la presente certificación en cumplimiento de los artículos 259 del Código de Procedimiento Civil y 480 del Código de Comercio y a solicitud del interesado el 20 de Abril de 1999.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD POR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO ADJUNTO.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES.

VALOR CINCUENTA Y SIETE DOLARES US\$57.00 RECIBO No. 200283



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

[Signature]

044498

CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESEMPLEADO
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

[Signature]

99 APR 29 AM 9:43

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.

COPIA NOTARIAL DE LA FIRMA DEL
SEÑOR OSCAR ALAÍCE NUÑEZ
QUE LLEVA CUNA NOTARIAL DEL
AÑO CINCUENTA Y SEIS
REPUBLICA DE COLOMBIA
30 AGO 2005
OSCAR ALAÍCE NUÑEZ
NOTARIO CUARENTA Y SEIS



129



Brigard & Castro

SANTA FE DE BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros)

I (We) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

Domiciliado(s) en

domiciled in
Princeton, New Jersey, USA

Nombre(amos) a: RAMIRO CASTRO DUQUE y/o
HECTOR GOMEZ MEJIA, de Santafé de Bogotá,
Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder
especial, amplio y suficiente, para recibir de las
oficinas y autoridades colombianas administrativas,
judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso,
la obtención de patentes de invención, registros de
marcas, diseños industriales, modelos de utilidad,
registros de nombres comerciales y enseñas, registros
de derechos de autor y contratos sobre los mismos,
obtención de certificados de obtentor de variedades
vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones,
cancelaciones de traspaso, cambios de nombre y/o
domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de
licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir
como demandante o como demandado en cualquier
instancia y recurso ante cualquier juez, corporación,
jefe de policía o autoridad en acciones judiciales,
administrativas y de policía tales como: oposiciones al
registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación
y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas
de la obtención o explotación de licencias; acciones de
competencia desleal; demandas penales; acciones de
indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones
a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos
de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en
otras acciones o medidas similares.

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

Este poder comprende la facultad de ratificar o
confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como
la facultad de desistír, transigir, comprometer, y la de
sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones.
Asimismo nombro(amos) a: RAMIRO CASTRO DUQUE
y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(s) en la
Carrera 7 No. 18-58 Piso 9, mis (nuestros) apoderados
en Colombia, con facultades para recibir notificaciones
y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

Granted and signed in Princeton, New Jersey, USA

el día de 18

this 14th

day of April 1989

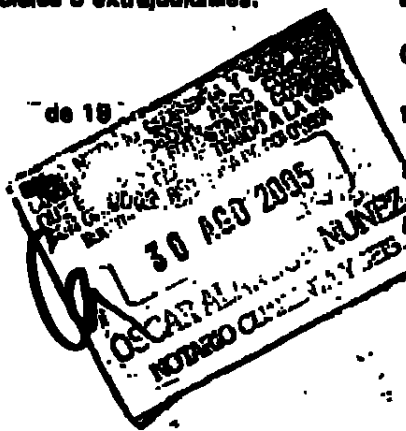
Firma

Signature

Nombre

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

Stephen B. Davis
Stephen B. Davis
Associate Counsel Patents



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

de de
personalmente comparó ante mí

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

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

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista los
libros de la existencia de la sociedad.

Unidade de Ensino

que quien confiere el presente poder es su representante.

Notario Público (señor)

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 14th day of April of 1998
personally appeared before me
Stephen B. Davis
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument who being by me duly
sworn did depose and say that he (she) is the
Associate Counsel Patents
of BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

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

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

State of Delaware
under date of: November 13, 1989

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

Irone C. Burton

Diane G. Bartram Public Notary - Illegal
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires March 8, 2009

**NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON**

hoy de de , compareció(eron)

a quien (es) conozco y me consta que es(son) _____ a (are) known to me and who I attest executed the
 persona(s) firmante(s) del documento que _____ foregoing document and he (they) declared he (they)
 _____ declare(n) que otorgan el _____ the document for the uses and purposes therein
 fines y propósitos que en él se expresan _____ expressed.

On this 14th day of April of 1999
personally appeared before me
Stephen B. Davis

Notario Público (es)

REGISTRACION ANTE CONSUL COLOMBIANO ES REQUERIDA.

OSCAR ALATCON NUNEZ
NOTARIO CUARENTA Y SEIS

Deane C. Bastron

Notary Public (Seal)

Diane C. Bartram
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires March 9, 2000

LEGALIZATION BEFORE COLOMBIAN CONGRESS IS PROPOSED

132

+++++

ANEXOS: El Poder arriba mencionado, Certificaciones Notariales, Certificación de las Firmas Notariales, Certificación del Consulado General de Colombia en New York, Estado de New York, Estados Unidos de América, Autenticación por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.-

+++++

Diane C. Bartram (firmado)

Notario Público

HAY UN SELLO QUE DICE:

Diane C. Bartrem

Notario Público de New Jersey

MI COMISIÓN EXPIRA EL 9 DE MARZO DEL
AÑO 2000

+++++

Diane C. Bartram (firmado)

Notario Público

HAY UN SELLO QUE DICE:

Diane C. Bartram

Notario Público de New Jersey

MI COMISIÓN EXPIRA EL 9 DE MARZO DEL
AÑO 2000

+++++

Diane C. Bartram (firmado)

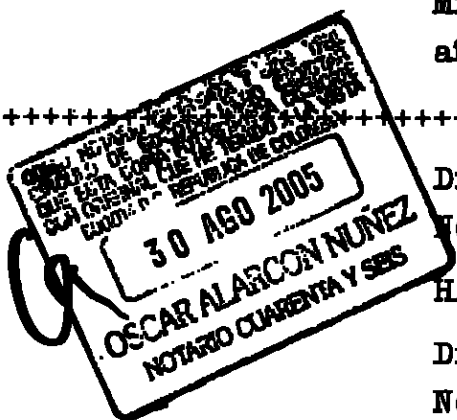
Notario Público

HAY UN SELLO QUE DICE:

Diane C. Bartram

Notario Público de New Jersey

MI COMISIÓN EXPIRA EL 9 DE MARZO DEL
AÑO 2000



MIRO NAVARRO ALVAREZ
DIRECTOR GENERAL DE INTERPOL URGUA.
Por el ... 1982

Diane C. Bartram (firmado)
Notario Público

HAY UN SELLO QUE DICE:

Diane C. Bartram
Notario Público de New Jersey
Mi Comisión Expira el 9 de Marzo del
año 2000

Diane C. Bartram (firmado)
Notario Público

HAY UN SELLO QUE DICE:

Diane C. Bartram
Notario Público de New Jersey
Mi Comisión Expira el 9 de Marzo del
año 2000

Diane C. Bartram (firmado)
Notario Público

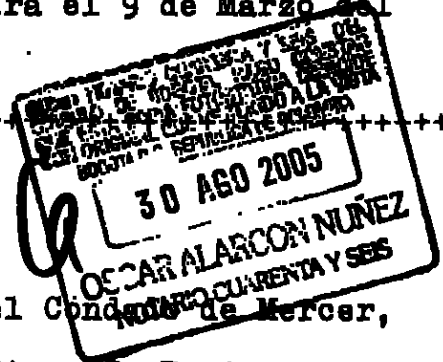
HAY UN SELLO QUE DICE:

Diane C. Bartram
Notario Público de New Jersey
Mi Comisión Expira el 9 de Marzo del
año 2000

ESTADO DE NEW JERSEY
Condado de Mercer

Yo, CATHERINE DICOSTANZO, Escribano del Condado de Mercer,

Por Medio del Presente Certifico que Diane C. Bartram, cuyo nombre está suscrito al reconocimiento, prueba o declaración jurada del instrumento anexo, y en éste escrito, es y era en el momento de tomar el mismo, un Notario Público en y para dicho Estado, residente en dicho Condado, comisionado y juramentado y debidamente autorizado por las leyes de éste para tomar las pruebas y recono-



OSCAR ALARCON ALVAREZ
Suplente del Notario Publico

cimientos de escrituras u otros instrumentos escritos, y declaraciones juradas para ser registrados en dicho Estado, y que estoy familiarizado con la caligrafía de dicho funcionario, y de veras creo que la firma es genuina.

Además Certifico que la impresión del Sello de Notarios Públicos no está requerida por la ley para ser presentada en mi oficina.

En Testimonio de lo Cual, he firmado el presente de mi puño y letra y fijado el sello de dichos Condado y Tribunales, en Tranton este día 15 de Abril del A.D. de mil novecientos noventa y nueve.

Catherine DiConstanzo (fdo.) Escribano del Condado de Mercer.

SELLO EN RELIEVE.

+++++

EN ESPAÑOL: La Certificación del Consulado General de Colombia en New York, Estado de New York, Estados Unidos de América bajo el número 200283 de fecha 20 de Abril de 1999; Autenticación hasta por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo el número 044498 de fecha 29 de Abril de 1999.

(Pagado Impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de \$57.00 Dólares).

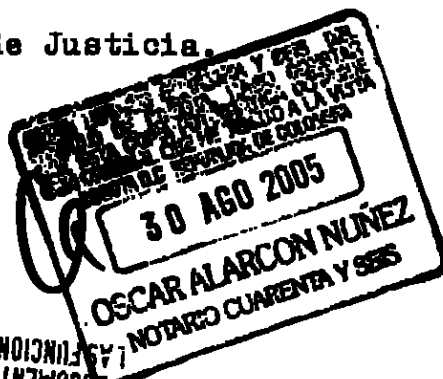
+++++

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DE LOS DOCUMENTOS ADJUNTOS.

ALVARO ALVAREZ
TRANSCUOTOR E INTERPRETE OFICIAL
Por Ley 137 de 1973

Resolución número 1876 del Ministerio de Justicia.

Fecha: Mayo 3 de 1999.



JEFE DE LA OFICINA DE
SANTAFE DE BOGOTA D.C.
99 MAY - 4 AM 11:09
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
046207
CUYA FIRMADA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS



GAVIRI A

ORGANIZACION ELECTORAL
REGISTRADURIA NACIONAL DEL ESTADO CIVIL

REGISTRO CIVIL DE DEFUNCION

Indicativo 5562241
Serial

Datos de la oficina de registro									
Clase de oficina:	Registraduria	Notaria	☒	Consulado	Corregimiento	Insp. de Policia	Código	9795	
País - Departamento - Municipio - Corregimiento o Inspección de Policía									
COLOMBIA CUNDINAMARCA BOGOTA D.C. NOTARIA 32.									

Datos del inscrito	
Apellidos y nombres completos	
CASTRO DUQUE RAMIRO	
Documento de identificación (Clase y número)	Sexo (en Letras)
C.C. No. 170322 DE BOGOTA	MASCULINO

Datos de la defunción	
Lugar de la Defunción País - Departamento - Municipio - Corregimiento o Inspección de Policía	
COLOMBIA CUNDINAMARCA BOGOTA D.C.	
Fecha de la defunción	Hora
Año 2 0 0 4 Mes 1 0 Día 3 0 04:10 PM	Número de certificado de defunción
A- 2094375.	
Presunción de muerte	
Luzada que prueba la sentencia	
Fecha de la sentencia	
Año Mes Día	
Documento presentado	Nombre y cargo del funcionario
Autorización judicial	Certificado Médico
☐	☒
ANDRES DIAZ CAMPOS.-	
R.M. No. 79982662	

Datos del denunciante	
Apellidos y nombres completos	
EDGAR DAVID REGINO II.	
Documento de identificación (Clase y número)	Firma
C.C. No. 15.030.154 DE LORICA/ CORDOBA	

Primer testigo	
Apellidos y nombres completos	
Documento de identificación (Clase y número)	
Firma	

Segundo testigo	
Apellidos y nombres completos	
Documento de identificación (Clase y número)	
Firma	

Fecha de inscripción	Nombre y firma del funcionario que autoriza
Año 2 0 0 4 Mes 1 0 Día 0 2	BLANCA ROSA GONZALEZ RESTREPO

PADRES: ALFONSO CASTRO	
MERCEDES DUQUE.	

ESPACIO PARA NOTAS

NOTARIA 32

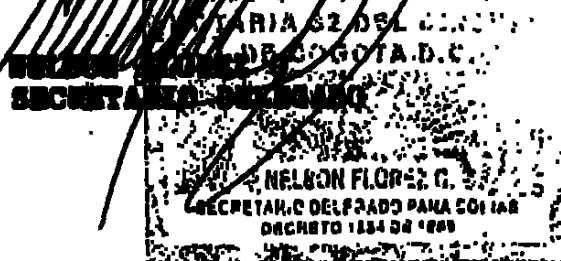
DEL CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA, D.C.

Germán Eleázar Moreno L.
Notario

COMO SECRETARIO DELEGADO DE LA NOTARIA TREINTA Y DOS (32) DEL
CIRCULO DE BOGOTA

CERTIFICO QUE:

La presente acta es fiel copia del original tomada del registro
civil de defunciones serial indicativo número: 56224
que expido en la ciudad de Bogotá D.C. hoy: 05 NOV. 2004



136
155

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓ MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () ✓ INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:



Fecha:

156 137

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
GOMEZ MEJIA HECTOR
Apoderado(a) y/o Representante de
BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY

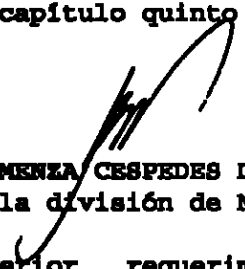
REFERENCIA	Radicación No.	5 87779
	Solicitud internacional	US2004/006103
	Fecha inicio fase nacional	04/10/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	10660

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

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.

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

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


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 11 NOV. 2005
adpal