

3/8
26a

00001

Señora

Alix Carmenza Céspedes de Vergel

Jefe de División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-053408- 00001-0000

5 Feb 2006-07-19 16:49:49 Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYI

EVE 376 PASNACIONALI

AN 320 PTINFORMACION

Folio 15

Referencia: Expediente No. 06.053.408

Solicitud de Patente de Invención titulada: "Método para el tratamiento de la enfermedad asociada con ADAMTS-5"

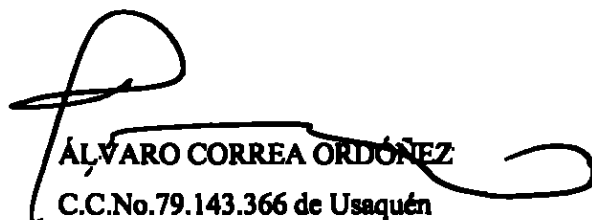
Solicitante: Wyeth

MEMORIAL DE ALCANCE

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ, mayor de edad y vecino de Bogotá D.C., identificado según aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad en referencia, manifiesto lo siguiente:

1. El día 2 de junio de 2006, bajo el número de radicación 06.053.408, presenté la solicitud de patente de invención de la referencia, para la cual adjunto documento de poder legalizado y traducción de las modificaciones realizadas en la fase internacional de la solicitud.

Atentamente,



ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ
C.C.No.79.143.366 de Usaquén

T.P.20.281

Anexo: Poder de Abogado

Traducción de modificaciones

BOGATM/BOGDMS-#54580-VI.DOC

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 130706 de un documento escrito en inglés efectuada el día 13 de junio de 2006 por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

APOSTILLA

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. Ha sido firmado por MICHELLE L MC GOWAN
3. Quien actúa en calidad de NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
4. Lleva el sello de MICHELLE L MC GOWAN, NOTARIO

Certificado

5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 20 de junio de 2006
7. Por Bradley Abelow, Tesorero de Nueva Jersey
8. N° A263097
9. Sello (Aparece adherido sello dorado)
10. Firma (firmado) Bradley Abelow

Jaime A. Garavito
JAIME A. GARAVITO B
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL.
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

Jaime A. Garavito

Jaime Armando Garavito Burgos
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá
Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983
expedida por el Ministerio de Justicia

00003-248
172

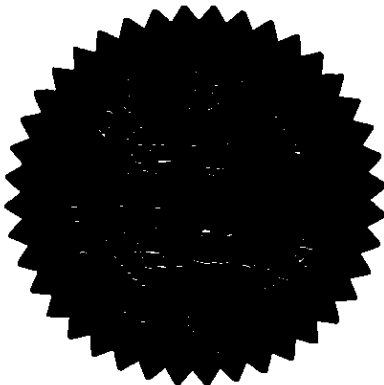
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

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

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 20TH DAY OF JUNE 2006
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A263097
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Bradley Abelow

000007 309 272

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

WYETH

with offices at

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA**

all members of the law firm Raisbeck, Lara, Rodriguez & Rueda, with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient power of attorney with respect to Colombian patent application(s) based on PCT/US2004/037169 and entitled "METHOD FOR TREATING ADAMTS-5 ASSOCIATED DISEASE" and to obtain patent protection therefor, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of a patent(s) based upon said patent application(s) in Colombia, including filing of assignments, change of name or address, voluntary cancellation; and defending oppositions, cancellations, nullity, writ mandamus, and in general the civil and administrative processes relating to those rights.

I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 16th day of June of 2006

WYETH



William H. Calman; Assistant Secretary

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

WYETH

con oficinas en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA**

Todos miembros de la firma de abogados Raisbeck, Lara, Rodriguez & Rueda, con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, para tan largo como ellos se quedan miembros de dijo el bufete de abogados, poder especial amplio y suficiente con respecto a la solicitud(es) de patente en Colombia basada(s) en PCT/US2004/037169 y titulada "METHOD FOR TREATING ADAMTS-5 ASSOCIATED DISEASE", y para obtener la protección de patente de la misma, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de la(s) patente(s) de invención en Colombia basada(s) en la mencionada solicitud de patente, incluyendo presentación de trasposos, cambio de nombre o dirección, cancelación voluntaria; y defensa en oposiciones, cancelaciones, nulidades, la tutela, y en general procesos civiles y administrativos relacionados con estos derechos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 16 días del mes de Junio de 2006

Firma de la persona que firma el Poder

3/30
23

NOTARIAL CERTIFICATION

On this **16TH** day of **JUNE**
2006, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That **Michelle L. McGowan**

of legal age and located at

Five Giralda Farms Madison, New Jersey 07940 U.S.A.

set his hand on the foregoing document.

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

3. That the grantor has executed the foregoing document as

Assistant Secretary

of the judicial person **WYETH**

4. That the judicial person **WYETH**
having its home office in

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America**

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

Minutes from the Board of Director's Meeting held on April 27, 2006.

CERTIFICACION NOTARIAL

A los **16** días del mes de **Junio**
de 2006, el suscrito Notario

DA FE

1. Que **Michelle L. McGowan**

mayor y domiciliado en

**Five Giralda Farms, Madison
New Jersey 07940 U.S.A.**

suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

Asistent^a de secretarí^a

de la persona jurídica **WYETH**

4. Que la persona jurídica **WYETH**
con sede en

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América**

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

**Minutas de la reunión de Junta Directiva
llevada a cabo el 27 de abril de 2006**

Notary Public

Michelle L. McGowan

El Notario Público

MICHELLE L. MCGOWAN
Notary Public, State of New Jersey
No. 2108903
Qualified in Morris County
Commission Expires Feb. 9, 2011

00006

352
272

01997.037000.PC

SOLICITUD DE PATENTE

EN LA OFICINA RECEPTORA DE LA
OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS (RO/US)

En la Solicitud de:)
: Oficial Autorizado: Rebecca Cook
WYETH)
:
Solicitud internacional No.:
PCT/US04/37169 :
Presentada: Nombiembre 8, 2004)
:
Para: METODO PARA EL)
TRATAMIENTO DE :
LA ENFERMEDAD)
ASOCIADA CON :
ADAMTS-5) Agosto 1, 2005

Correo PCT
Comisionado para patentes
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

MODIFICACION PRELIMINAR

Señores:

Antes de actuar sobre los méritos, por favor modificar la solicitud arriba identificada como sigue:

a.) Modificación a la especificación:

Por favor modificar el paragrafo número 00123 en la página 36 como sigue.

Los ratones KO ADAMTS-5 usados en estos estudios fueron generados a partir de ratones endogámicos ~~129SvEv-Brd~~ 129SvEvBrd, portadores del alelo KO condicional de tipo Cre/LoxP del gen ADAMTS5 (Lexicon Genetics, The Woodlands, TX). El alelo condicional contenía sitios LoxP al flanco de exón 3 de modo que la recombinación Cre resultó en la eliminación del exón 3 que codifica la mayoría del sitio con actividad enzimática, como se muestra en la Figura 1A. En la figura 1A, los exones 2,3 y 4 están representados en el listado de secuencia como ID DE SEC NOS:1, 2 y 3, respectivamente.

Por favor modificar el paragrafo número 00125 en las páginas 36-37 como sigue.

La determinación de genotipos de alelos del gen ADAMTS-5 se realizó por RCP usando una plantilla de ADN obtenida del material de digestión con proteinasa K cruda de biopsias de la cola. Se identificaron los alelos KO heterocigotos y de tipo salvaje por RCP usando un primer directo de la secuencia (5'TGT TCA CCC AAA GCA ACT AC3') (~~primer-1~~) (primer 1, ID DE SEC NO:4) y un primer inverso de la secuencia (5'TAG AGG AGA GGA GAG GAG G3') (~~primer-2~~) (primer 2, ID DE SEC NO:5). Estos primers flanquearon el sitio de inserción del sitio LoxP (5') y produjeron un amplicón de 230 bp en los animales WT y heterocigotos y ningún amplicón en los animales KO (Figura 1B, C). Se identificó al alelo de animales con genes inactivados (KO) usando el primer directo (5'GTG AAC CAC ATG GAC TTT GG3') (~~primer-3~~) (primer 3, ID DE SEC NO:6) y el primer inverso (5'TCG TAG CAA ACA CCC ACC TG3') (~~primer-4~~) (primer 4, ID DE SEC NO:7) , lo que resultó en un producto de RCP de 500 bp del alelo (KO) con eliminación del exón 3 (Figura 1B, C).

3/54
00008
26

Por favor modificar el paragrafo número 00126 en la página 37 como sigue.

El ARN total se preparó a partir del bazo de ratones WT y KO, usando el kit RNAeasy (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se confirmó la calidad de las muestras de ARN en una prueba de ARN 6000 Nano usando un bioanalizador (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Los primers de RCP fueron diseñados y sintetizados (BioSource International, Camarillo, CA) de la siguiente manera:

Primer 5, 5'CGACCTCAAGAACTTTTGC3'; ~~ID DE SEC. Nº: 4~~ ID DE SEC NO:8

Primer 6, 5'CTCAGGCCCAAATGTCAAGT3'; ~~ID DE SEC Nº: 5~~ ID DE SEC NO:9

Primer 7, 5'CGTCATGAGAAAGGCCAAGT3'; ~~ID DE SEC Nº: 6~~ ID DE SEC NO:10

La RCP-TI se realizó usando el kit de RCP-TI Qiagen OneStep con una concentración de 600 nM de cada primer y 200 ng de ARN total en un ciclador térmico de ADN Engine Dyad (MJ Research, Waltham, MA). La RCP-TI se llevó a cabo por 30 minutos a 50 °C, 15 minutos a 95 °C y 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 59 °C y 30 segundos a 72 °C. Los primers de RCP-TI se presentan en la Figura 1D y los productos de RCP-TI se presentan las Figuras 1E y 1F. Usando los primers 5 y 6, la Figura 1E muestra que el ARNm de WT es de 506 bp y el de KO es de 338 bp. Usando los primers 5, 4 y 7, la Figura 1F muestra que el ARNm de WT es de 258 bp y no hay producto, como es de esperar, en KO porque el primer 7 está situado en el exón 3, que fue eliminado en el KO.

Por favor modificar el paragrafo número 00390 en la página 136 como sigue.

El sustrato utilizado en el ensayo es un péptido sintético diseñado a partir de una porción de brevicano, uno de los sustratos naturales de Agrecanasa-2. Este péptido, conocido como WAKB-5, contiene el grupo fluorescente 2-aminobenzofilo (Abz) que se apaga por transferencia de energía a un grupo 2,4-dinitrofenilo (Dnp). WAKB-5 (masa = 1740) fue sintetizado especialmente por AnaSpec, Inc. (San José, CA) y demostró >95% de pureza según análisis por

CLAR. WAKB-5 tiene la secuencia de Abz-TESESRGAIY-Dap(Dnp)-KK-NH₂ (ID DE SEC NQ:11) Se prepararon soluciones madre del sustrato con agua MilliQ y se almacenaron alícuotas a -80°C. Se determinó la concentración de este sustrato madre por medio de espectrofotometría con un coeficiente de extinción de 354 nm de 18.172 M⁻¹cm⁻¹. Se determinó que los valores de V_{máx} y K_m para esta reacción de enzima / sustrato no eran sensibles a DMSO hasta al menos el 10% (v/v).

00010 356 220

b.) Notas

La especificación ha sido modificada a la marcación de la divulgación adjunta en conformidad con el listado de secuencia que la acompaña. Hojas sustitutas presentando las copias en limpio del texto modificado también se adjuntan. No se adiciona nueva materia.

La entrada de esta es seriamente solicitada.

El abogado del solicitante, abajo firmante, puede ser contactado en su oficina de Nueva York en el teléfono (212) 218-2100. Toda la correspondencia debe continuar siendo dirigida a nuestra dirección abajo listada.

Respetuosamente,

Firma

Lawrence S. Perry
Abogado para solicitantes
Registro No. 31.865

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

LSP/ac

ADAMTS-5, se puede evaluar la presencia o ausencia de producto escindido en los animales ADAMTS-5. El producto escindido se verá sustancialmente reducido o estará ausente en los animales transgénicos.

[00122] Los siguientes ejemplos tienen como objetivo ilustrar, sin limitar, el presente invento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Generación de ratones KO ADAMTS5

[00123] Los ratones KO ADAMTS-5 usados en estos estudios fueron generados a partir de ratones endogámicos 129SvEvBrd, portadores del alelo KO condicional de tipo Cre/LoxP del gen ADAMTS5 (Lexicon Genetics, The Woodlands, TX). El alelo condicional contenía sitios LoxP al flanco de exón 3 de modo que la recombinación Cre resultó en la eliminación del exón 3 que codifica la mayoría del sitio con actividad enzimática, como se muestra en la Figura 1A. En la figura 1A; los exones 2,3 y 4 están representados en el listado de secuencia como ID DE SEC NOS:1, 2 y 3, respectivamente.

[00124] Los ratones portadores del alelo KO condicional ADAMTS-5 se crearon por recombinación homóloga en células ES seguidas de inyección de blastocistos para generar ratones quiméricos. La línea de ratones KO ADAMTS-5 se produjo cruzando ratones KO condicionales con ratones transgénicos Protamine-Cre (proporcionados por Lexicon Genetics) lo que resultó en la eliminación mediada por Cre del exón 3 en el semen de las crías machos portadoras tanto del mutante ADAMTS-5 como de los alelos Prot-Cre, como se muestra en la Figura 1B.

Determinación del genotipo de WT ADAMTS5, KO condicional y alelos KO

[00125] La determinación de genotipos de alelos del gen ADAMTS-5 se realizó por RCP usando una plantilla de ADN obtenida del material de digestión con proteinasa K cruda de biopsias de la cola. Se identificaron los alelos KO heterocigotos y de tipo salvaje por RCP usando un primer directo de la secuencia (5'TGT TCA CCC AAA GCA ACT AC3') (primer 1, ID DE SEC NO:4) y un primer inverso de la secuencia (5'TAG AGG AGA GGA GAG GAG G3') (primer 2, ID DE SEC NO:5). Estos primers flanquearon el sitio de inserción del sitio LoxP (5')

y produjeron un amplicón de 230 bp en los animales WT y heterocigotos y ningún amplicón en los animales KO (Figura 1B, C). Se identificó al alelo de animales con genes inactivados (KO) usando el primer directo (5'GTG AAC CAC ATG GAC TTT GG3') (primer 3, ID DE SEC NO:6) y el primer inverso (5'TCG TAG

CAA ACA CCC ACC TG3') (*primer 4*), lo que resultó en un producto de RCP de 500 bp del alelo (KO) con eliminación del exón 3 (Figura 1B, C).

Preparación de ARN para RCP-TI:

[00126] El ARN total se preparó a partir del bazo de ratones WT y KO, usando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se confirmó la calidad de las muestras de ARN en una prueba de ARN 6000 Nano usando un bioanalizador (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Los *primers* de RCP fueron diseñados y sintetizados (BioSource International, Camarillo, CA) de la siguiente manera:

Primer 5, 5'CGACCCTCAAGAACTTTTGC3'; ID DE SEC NO:8

Primer 6, 5'CTCAGGCCCAAATGTCAAGT3'; ID DE SEC NO:9

Primer 7, 5'CGTCATGAGAAAGGCCAAGT3'; ID DE SEC NO:10

La RCP-TI se realizó usando el kit de RCP-TI Qiagen OneStep con una concentración de 600 nM de cada *primer* y 200 ng de ARN total en un ciclador térmico de ADN Engine Dyad (MJ Research, Waltham, MA). La RCP-TI se llevó a cabo por 30 minutos a 50 °C, 15 minutos a 95 °C y 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 59 °C y 30 segundos a 72 °C. Los *primers* de RCP-TI se presentan en la Figura 1D y los productos de RCP-TI se presentan las Figuras 1E y 1F. Usando los *primers* 5 y 6, la Figura 1E muestra que el ARNm de WT es de 506 bp y el de KO es de 338 bp. Usando los *primers* 5, 4 y 7, la Figura 1F muestra que el ARNm de WT es de 258 bp y no hay producto, como es de esperar, en KO porque el *primer 7* está situado en el exón 3, que fue eliminado en el KO.

Histología y evaluación patológica de ratones jóvenes y adultos:

[00127] Se realizaron necropsias completas en 22 machos WT y 20 KO ADAMTS-5 a las 18 semanas de vida. Las necropsias incluyeron observaciones macroscópicas, pesos corporales y de los órganos, hematología, química sérica completa y examen microscópico del cerebro, articulaciones, corazón, pulmones, timo, bazo, hígado, riñones, glándulas salivales, ganglios linfáticos mandibulares, testículos, epidídimo, ojos, glándulas harderianas, glándulas lacrimales, esternón y húmero. Se colocaron todos los tejidos en formalina neutra amortiguada al 10%, se descalcificaron si estaban mineralizados, se procesaron de manera rutinaria, se incrustaron en parafina y se prepararon como las secciones teñidas con hematoxilina y eosina de rutina. Un patólogo veterinario certificado (BS) evaluó todos los portaobjetos para confirmar la presencia o ausencia de lesiones patológicas.

360
00014
20
2

enzima se almacenaron a -80°C en Tris 25 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, CaCl_2 5 mM, ZnCl_2 10 μM , glicerol al 10%.

[00390] El sustrato utilizado en el ensayo es un péptido sintético diseñado a partir de una porción de brevicano, uno de los sustratos naturales de Agrecanasa-2. Este péptido, conocido como WAKB-5, contiene el grupo fluorescente 2-aminobenzofilo (Abz) que se apaga por transferencia de energía a un grupo 2,4-dinitrofenilo (Dnp). WAKB-5 (masa = 1740) fue sintetizado especialmente por AnaSpec, Inc. (San José, CA) y demostró >95% de pureza según análisis por CLAR. WAKB-5 tiene la secuencia de Abz-TESESRGAIY-Dap(Dnp)-KK- NH_2 . Se prepararon soluciones madre del sustrato con agua MilliQ y se almacenaron alícuotas a -80°C . Se determinó la concentración de este sustrato madre por medio de espectrofotometría con un coeficiente de extinción de 354 nm de $18.172 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se determinó que los valores de V_{max} y K_m para esta reacción de enzima / sustrato no eran sensibles a DMSO hasta al menos el 10% (v/v).

[00391] El *buffer* utilizado en el ensayo (pH 7,4) estaba compuesto por Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 5 mM, CHAPS al 0,1%, glicerol al 5%. Cada pocillo de placas negras de poliestireno de 96 ó 384 pocillos contenía una reacción compuesta por el *buffer* del ensayo, Agr-2 purificada (diluida con el *buffer* del ensayo) y concentraciones variables de inhibidor (preparado por dilución en serie en DMSO, en placas de polipropileno de 96 pocillos). Las placas se incubaron entonces a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las reacciones enzimáticas se iniciaron añadiendo sustrato hasta una concentración final de 25 μM y se mezclaron desplazando una pipeta hacia arriba y abajo. Los índices iniciales de las reacciones de escisión se determinaron a temperatura ambiente, con un lector de placa de fluorescencia inmediatamente después de añadir el sustrato.

[00392] A continuación se presenta un procedimiento detallado para reacciones de 100 μl en una placa de 96 pocillos, con una concentración final de DMSO del 4% y una concentración final de enzimas de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (una concentración que demostró ser adecuada en la mayoría de los casos): (1) Los compuestos se diluyeron en una placa de polipropileno de 96 pocillos, con DMSO al 100% hasta 25 veces la concentración final en el ensayo, (2) la Agr-2 se diluyó a 2,083 veces la concentración final (es decir 1,04 $\mu\text{g/ml}$) en el *buffer* del ensayo, (3) se añadieron 48,0 μl de 2,083X Agr-2 a los pocillos, (4) se transfirieron 4,0 μl de 25X del compuesto a la placa de prueba y los reactivos se

mezclaron, (5) las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, (6) el sustrato se diluyó a 52,075 μ M (2,083X la concentración final)