

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

División de Nuevas Crea



No. 10-067268-A-00000-0000

Fecha: 2012-12-18 11:16:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 67

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 10 - 67268 A

54. TÍTULO CONJUGADOS DE NEURTURINA NOVEDOSOS PARA USO
FARMACEUTICO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT

DOMICILIO GOTTINGEN, ALEMANIA

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de U\$aquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-067268-00000-0000

Fecha: 2010-06-03 15:57:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 154**FORMULARIO UNICO DE**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

**PC
ENTRADA EN F**

No. 10-067268-A-00000-0000

Fecha: 2012-12-18 11:16:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 67**SOLICIT**

1

☒ Patente de Invención.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **DEVELOGEN
AKTIENGESELLSCHAFT**Sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Alemania.Dirección: Marie-Curie-Strasse 7,
37079 Göttingen,
AlemaniaDomicilio: Göttingen,
Alemania**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓNC.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número **35.456.344**T.P. **23.555**

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Matthias AUSTEN**Lärchenweg 17,
37079 Göttingen,
Alemania3. **Rainer MUSSMANN**Waldweg 17,
CH-4312 Magden,
Alemania5. **Thomas SIEGMUND**Potzwenden 5,
37136 Landolfshausen
Alemania2. **Marcus GEESE**Wilhelm-Weber-Strasse 35,
37073 Göttingen,
Alemania4. **Friedrich HARDER**Schwesternberg 6,
88131 Lindau,
Alemania6. **Martin SCHNEIDER**Schildweg 16,
37085 Göttingen,
Alemania

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/009320Fecha: 05 de noviembre de 2008Publicación Internacional No. WO 2009/059755 A3Fecha: 14 de mayo de 2009

6

Título (54)CONJUGADOS DE NEURTURINA NOVEDOSOS PARA USO FARMACEUTICO

7

Clasificación Internacional (51) A61K 047/048

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐EP05 de noviembre de 200707021493.7



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural

☐

Persona Jurídica

☒

DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro

☐

Pequeña

☐

Mediana

☐

Otra

☐

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Alemania	Marie-Curie-Strasse 7,	37079 Göttingen
Dirección electrónica		No. Fax
clientes@cavelier.com		2 11 86 50
		Número telefónico
		3 47 36 11

☐

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

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre

De Páez Luz Clemencia

Documento de identificación

C.C. 35.456.344

Tarjeta profesional

T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

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

11
3

4.

Datos del trámite

CONVERSION

Expediente _____

De: _____
A: _____

DIVISION

Expediente : **10.067.268**
De: _____
A: _____

FUSION

Expediente _____

De: _____
A: _____

5.

Comprobante de Pago No 12-134330 Fecha: 2012/12/05
Comprobante de Pago No 12-137553 Fecha: 2012/12/12

6.

Anexos

☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por \$590.000

☒ Comprobante de pago por 23 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$ 690.0000

☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación

☒ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división

☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud

☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
Nombre y apellidos LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	Firma <i>Lu2 Clemencia De Paez</i>
C.C 35.456.344 de Usaquén	Tarjeta Profesional T.P. 23.555

~~20~~
4

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 10.067.268 La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 16580 notificado por fijación en lista del 18 de septiembre de 2012. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 03 de junio de 2010 y la prioridad que allí se reivindica el 05 de noviembre de 2007.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 10.067.268

25

CONJUGADOS DE NEURTURINA NOVEDOSOS PARA USO FARMACEUTICO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con la
5 modificación de la neurturina humana para incrementar su
vida media en suero y perfil farmacocinético. En
particular, la invención se relaciona con conjugados de
neurturina novedosos que comprenden neurturina o fragmentos
biológicamente activos de los mismos unidos covalentemente
10 a porciones de poliol, preferiblemente polietilén glicol.
La invención se relaciona además con composiciones
farmacéuticas con mayor biodisponibilidad que comprenden
conjugados de neurturina novedosos como agente activo para
terapia, tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la
15 diabetes y neurodegeneración.

Las células beta pancreáticas secretan insulina
en respuesta a los niveles elevados de glucosa en sangre.
La insulina entre otras hormonas juega un papel clave en la
regulación del metabolismo combustible. La insulina conduce
20 al almacenamiento de glicógeno y triglicéridos y a la
síntesis de proteínas. La entrada de glucosa en los
músculos y células adiposas es estimulada por la insulina.
En pacientes que padecen de diabetes mellitus tipo 1, o
LADA (diabetes autoinmune en adultos, Pozzilli & Di Mario,
25 2001, Diabetes Care. 8:1460-1467) las células beta están
siendo destruidas debido a ataque autoinmune. La cantidad
de insulina producida por las células de los islotes
pancreáticos restantes es demasiado baja, dando como
resultado niveles de glucosa en sangre elevados
30 (hiperglicemia). En la diabetes mellitus tipo II las

células hepáticas y musculares pierden su capacidad de responder a los niveles de insulina en sangre normales (resistencia a la insulina). Los altos niveles de glucosa en sangre (y también los altos niveles de lípidos en sangre) conducen a su vez a un deterioro de la función de las células beta y a un incremento en la muerte de las células beta. De manera interesante, los procesos degenerativos de células beta como la neogénesis y replicación no parecen compensar la pérdida de la masa de células beta en diabéticos tipo II, causando de este modo una reducción en la masa de células beta total con el tiempo. Eventualmente la aplicación de insulina exógena se vuelve necesaria en los diabéticos tipo II para un control adecuado de los niveles de glucosa en sangre.

En los diabéticos tipo I, donde las células beta están siendo destruidas por ataque autoinmune, han sido contemplados tratamientos los cuales modulan el sistema inmune y pueden ser capaces de detener o reducir fuertemente la destrucción de los islotes (Raz et al., 2001, Lancet 358: 1749-1753; Chatenoud et al., 2003, Nat Rev Immunol. 3: 123-132; Homann et al., Immunity. 2002, 3:403-415). Sin embargo, debido a la regeneración relativamente lenta de las células beta humanas esos tratamientos pueden ser más exitosos si son combinados con tratamientos que pueden estimular la regeneración de células beta.

La diabetes es una enfermedad muy discapacitante, debido a que los fármacos antidiabéticos comunes hoy en día no controlan suficientemente bien los niveles de azúcar en sangre para evitar completamente la ocurrencia de niveles

de azúcar en sangre altos y bajos. Con frecuencia los niveles de azúcar en sangre elevados son tóxicos y producen complicaciones a largo plazo como por ejemplo nefropatía, retinopatía, neuropatía y enfermedad vascular periférica.

5 La pérdida extensa de células beta también conduce a la desregulación de la secreción de glucagon de las células alfa pancreáticas la cual contribuye a un incremento en el riesgo de episodios hipoglicémicos peligrosos. También existen muchos riesgos de condiciones relacionadas, como
10 obesidad, hipertensión, enfermedad cardíaca e hiperlipidemia, de las cuales las personas con diabetes están sustancialmente en riesgo.

Además de la calidad de vida deteriorada de los pacientes, el tratamiento de la diabetes y sus
15 complicaciones a largo plazo presentan una enorme carga financiera a nuestros sistemas de salud con tendencia a elevarse. De este modo, para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I y LADA, pero también para el tratamiento de las etapas tardías de la diabetes mellitus tipo II existe
20 una fuerte necesidad en la técnica de identificar factores que induzcan la regeneración de células beta productoras de insulina pancreática. Esos factores podrían reestablecer la función normal del páncreas endocrino una vez que su función ha sido dañada o aún podrían prevenir el desarrollo
25 o progreso de la diabetes tipo I, LADA o diabetes tipo II.

La neurturina es una proteína secretada la cual se expresa en páncreas embrionario. La neurturina recombinante ha mostrado estimular la diferenciación de células no diferenciadas embrionarias de ratón con células
30 productoras de insulina. Además, los ratones transgénicos

con niveles elevados de neurturina en el páncreas tienen una masa de células beta pancreática sustancialmente incrementada. Sobre la base de esos descubrimientos, ha sido propuesto el uso de neurturina para el tratamiento de trastornos pancreáticos como la diabetes (véase por ejemplo la WO 03/99318 y la WO 2005/051415, la descripción de las cuales se incorpora aquí como referencia).

La neurturina es un miembro de la familia de ligandos de GDNF (GFL) comprendida de la línea celular Glial derivada del factor neurotrófico (GDNF), Neurturina, Artemina y Persefina. La neurturina madura es un homodímero con un tamaño de 23.6 kDa comprendida de 102 monómeros de aminoácido. Cada monómero contiene tres enlaces disulfuro intracadena formando un nudo de cistina. Un puente de sulfuro adicional conecta los monómeros.

La neurturina ya había sido previamente propuesta como tratamiento para enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y Huntington, trastornos neuronales motores, lesiones de la médula espinal o trastornos del oído (WO 97/08196, WO 99/06064; Akerud et al. J Neurochem. 1999; 73(1):70-78; Koeberle & Ball Neuroscience. 2002; 110(3):555-567; Bilak et al. Mol Cell Neurosci. 1999; 13(5):326-336; Perez-Navarro et al. Neuroscience. 2000; 98(1):89-96; Rosenblad et al, Eur J Neurosci. 1999; 11 (5): 1554-1566, las descripciones de las cuales se incorporan aquí como referencia).

Se ha encontrado, sin embargo, que tras la liberación mejorada por convección (CED) en cerebros de rata, el volumen de distribución de la neurturina y el factor relacionado GDNF fue limitada (Hamilton et al., Exp

de poliol unida covalentemente a un producto de proteína de neurturina humana.

La presente invención se relaciona además con una composición farmacéutica que comprende al menos un producto
5 de proteína neurturina y/o un fragmento biológicamente activo de la misma, el cual se conjuga a al menos una molécula de polietilen glicol como un ingrediente activo junto con un soporte, un diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

10 En una modalidad más, la presente invención se relaciona con un método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite la misma, que comprende una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un producto de proteína neurturina modificada o un
15 fragmento biológicamente activo de la misma, el cual se conjuga con al menos una molécula de polietilen glicol como un ingrediente activo junto con un soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto más de la presente invención es
20 proporcionar el método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite de la misma, que comprende una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un producto de proteína neurturina modificada o un fragmento biológicamente activo de la misma que se conjugó
25 a al menos una molécula de polietilen glicol como un ingrediente activo junto con una sustancia de bajo peso molecular junto con un soporte, diluyente, y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de la presente invención son
30 adecuadas para prevenir o tratar trastornos pancreáticos,

enfermedades neurodegenerativas, particularmente trastornos autoinmunes pancreáticos, por ejemplo diabetes autoinmune como la diabetes tipo I o LADA pero también diabetes tipo II.

5

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona conjugados de neurturina que comprenden porciones de polirol unidas covalentemente como el polietilen glicol (PEG), así como composiciones farmacéuticas que comprenden esos conjugados de neurturina así como variantes, derivados o fragmentos biológicamente activos de la misma.

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos, técnicas y métodos de laboratorio descritos aquí son aquéllos conocidos en la técnica a la cual pertenecen. Los símbolos y abreviaciones químicas estándar se usan de manera intercambiable con los nombres completos representados por esos símbolos. Las técnicas estándar pueden ser usadas para síntesis química, análisis químico, preparación, composición, distribución y tratamiento farmacéutico de los pacientes. Pueden ser usadas técnicas estándar para la metodología de ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo tisular y similares. Las reacciones y técnicas de purificación pueden ser efectuadas por ejemplo, usando equipos de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes, como comúnmente se efectúa en la técnica o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden ser detectados de manera general de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se

28/11

Neurol. 2001 ; 168(1):155-161). Las proteínas deben típicamente ser administradas por inyección. Después de la inyección, la mayoría de las proteínas son eliminadas rápidamente del cuerpo, necesitando inyecciones frecuentes.

5 En nuestros estudios, hemos encontrado que la biodisponibilidad después de la inyección subcutánea e intravenosa de la neurturina es mamíferos es baja. Solo aproximadamente 10% de la neurturina inyectada subcutáneamente entra a la circulación. En consecuencia, es
:10 difícil alcanzar niveles en sangre terapéuticamente útiles de las proteínas en pacientes.

De este modo, existe una fuerte necesidad de desarrollar una variante de neurturina con mejor disponibilidad en pacientes y con esto el desarrollo del
15 métodos para prolongar las vidas medias en circulación de agentes terapéuticos de proteína en el cuerpo - la biodisponibilidad - de modo que la neurturina como agente activo no tenga que ser inyectada frecuentemente para satisfacer las necesidades de pacientes para fármacos
20 terapéuticos de proteína "amigables con el usuario".

De este modo, el problema que subyace a la presente invención fue proporcionar nuevas variantes y formulaciones de neurturina que mejoren su biodisponibilidad.

25 El problema es resuelto proporcionando las modalidades caracterizadas en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un
30 conjugado de neurturina novedoso que comprende una porción

describe en varias referencias generales o más específicas que se citan o describen a través de la presente especificación.

El término "análogo" se refiere a un polipéptido el cual se asemeja a la neurturina en una estructura, teniendo una función similar.

El término "biológicamente activo" o "actividad biológica" como se usa aquí, significa que el producto de neurturina induce y/o estimula la diferenciación de células productoras de insulina a partir de sus progenitoras, por ejemplo, células no diferenciadas, y/o promueve la protección, sobrevivencia o regeneración de células productoras de insulina, por ejemplo células beta *in vivo* o *in vitro*. La actividad biológica en los productos de proteína neurturina modificada como se describe aquí puede ser fácilmente determinada en ensayos *in vitro* estándar como se describe en la determinación de la actividad de GDNF, descrita en la WO 93/06116 y en la Solicitud de Patente Estadounidense No. 08/535,681 o como se describe en los presentes Ejemplos.

Como se utiliza aquí, "fragmentos" de neurturina se refieren a porciones de neurturina que son generadas por cualquier método, incluyendo pero sin limitarse a la digestión enzimática y escisión química (por ejemplo CNBr) de neurturina y repartición física del polipéptido. Los fragmentos de neurturina también se pueden ser generados, por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante y por síntesis de aminoácidos.

Como "fragmento activo" o "fragmento biológicamente activo" de neurturina como se utiliza en la

presente invención se refiere a cualquier fragmento o un precursor de la cadena polipeptídica de neurturina, solo o en combinación con moléculas relacionadas o residuos unidos a éste, por ejemplo, residuos de azúcares o fosfatos, o
5 agregados de la molécula polipeptídica cuando los fragmentos o precursores muestran la misma actividad biológica de la neurturina. El término "fragmento biológicamente activo" también se relaciona con un fragmento de un producto neurturina el cual induce y/o
10 estimula la diferenciación de las células productoras de insulina a partir de progenitoras, por ejemplo, células no diferenciadas, y/o promueve la protección, sobrevivencia o regeneración de células productoras de insulina, por ejemplo células beta *in vivo* o *in vitro*. La actividad
15 biológica de un fragmento de los productos de proteína neurturina modificada como se describe aquí pueden ser determinada fácilmente ensayos *in vitro* estándar, como se describe para la determinación de la actividad GDNF, descrito en la WO 93/06116 y en la Solicitud de Patente
20 Estadounidense No. 08/535,681 o descrita en los ejemplos de la presente.

El término "homólogo" es usado aquí para referirse a un polipéptido relacionado con la neurturina por descender de una secuencia de proteína ancestral común.
25 El término, homólogo, puede aplicarse a la relación entre proteínas separadas por el evento de duplicación genética.

El término "sustancia de bajo peso molecular" se refiere a un sustrato con un peso molecular promedio de entre 100 y 12000 Da, preferentemente de entre 200 y 8000
30 Da y más preferiblemente de aproximadamente 500 y 7000 Da.

La sustancia de bajo peso molecular puede ser un polímero polianiónico que sea natural o sintético y que contiene una pluralidad de grupos aniónicos como grupos carboxilato y/o sulfato. Por ejemplo, el polímero polianiónico puede ser seleccionado de sacáridos sulfatados de bajo peso molecular, ciclodextrinas sulfatadas, o polímeros sintéticos sulfatados, como polímeros de acrílico, polímeros aromáticos, y/o polialcoholes. De manera más particular, el polímero polianiónico es seleccionado de heparinas de bajo peso molecular o derivados heparina, sulfatos de heparina, sulfatos de condroitina, sulfatos dextran, oligosacáridos derivados de heparina modificados químicamente (lista de Wang et al. (2002), supra), oligosacáridos similares a la heparina, sulfatos de dextran, glicosaminoglicanos de bajo peso molecular sulfatados, dextrin-2-sulfatos, sulfatos de celulosa y de polímeros de sulfonato de naftaleno (por ejemplo, PRO 2000), PAVAS (un copolímero de ácido acrílico con alcohol sulfato de vinilo), el polímero sulfonado PAMPS [ácido poli(2-acril-amido-2-metil-1-propansulfónico)] (Mw por ejemplo, aproximadamente 7000 - 12000), sulfatos de condroitina, ciclodextrinas sulfatadas, sulfato de laminarina (Alban, S. in Carbohydrates in Drug Design (Ed. ZJ. Witczak, K.A. Nieforth) Dekker, New York, 1997, pp 209.), sulfatos de poliglicerina (Türk, H., Haag, R., Alban, S. Bioconjugate Chem. 2004, 15, 162;), polisulfatos de pentosan (PPS) y derivados de los mismos como polisulfatos de pentosan modificados con lactosa, PPS fraccionado/PPS de bajo peso molecular, fucoidan, o derivados o combinaciones de los mismos.

27
15

Los análogos de heparina de bajo peso molecular (LMWH) como la Enoxaparina, Dalteparina o Fragmina son ejemplos preferidos de polímeros adecuados. Ellos son obtenidos por fraccionación y/o digestión limitada 5 enzimática o química de heparina, y tienen un peso molecular promedio preferido de aproximadamente 3000 hasta aproximadamente 7000 Dalton (Weitz 1997 supra).

El término "producto de proteína neurturina modificada" como se usa aquí se relaciona con un conjugado 10 de proteína neurturina modificada químicamente, así como un conjugado expresado en la célula que comprende una fracción de poliol unida covalentemente.

Los conjugados de neurturina modificados químicamente pueden ser preparados por un experto en la 15 técnica dada la discusión de la presente o por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

La fracción de poliol del conjugado de neurturina de la invención puede ser cualquier poli(óxido de alquilen) mono o bifuncional soluble en agua que tenga una 20 cadena lineal o ramificada. Típicamente, el poliol es un poli(alquilen glicol), como el poli(etilenglicol) (PEG). Sin embargo, aquellos expertos en la técnica reconocerán que pueden ser usados de manera adecuada otros polioles, como, por ejemplo, poli(propilenglicol) y copolímeros de 25 polietilen glicol y polipropilen glicol. Otros conjugados de neurturina pueden ser preparados acoplando neurturina a un polímero soluble en agua. Una lista no limitante de esos polímeros incluyen otros homopolímeros de óxido polialquilen como los polipropilen glicoles, polioles 30 oxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de

bloques de los mismos. Como una alternativa los polímeros basados en óxido de polialquileno, los materiales efectivamente no antigénicos como el dextran, polivinil pirrolidonas, poliacrilamidas, alcoholes polivinílicos, 5 polímeros basados en carbohidratos y similares pueden ser utilizados.

Los conjugados de proteína también pueden ser expresados en las células eucariotas o procariotas, bien conocido en la técnica.

10 El término "conjugado de neurturina" se relaciona con un producto de proteína neurturina que comprende una fracción de poliol como el polietilenglicol unido covalentemente a un aminoácido de neurturina. El aminoácido puede ser específico del ciclo en el aminoácido N-terminal 15 o en cualquier otro aminoácido. Los conjugados de PEG pueden contener una o más moléculas PEG unidas covalentemente a cualquier sitio adecuado de la molécula de proteína neurturina.

El término "producto de proteína neurturina", 20 "producto de neurturina", "proteína neurturina" o "neurturina", que se utilizan de manera intercambiable aquí, se relacionan con una proteína o péptido que tiene un grado de identidad con producto biológicamente activo de neurturina humana que da como resultado de la escisión del 25 precursor neurturina que tiene la secuencia de aminoácidos publicada como Número de Acceso del GenBank NP_004549 (SEQ ID NO: 1, Fig. 3) o el precursor de neurturina humana en sí, que es superior al 70%, preferiblemente en exceso del 80%, más preferiblemente un exceso del 90% y más 30 preferiblemente un exceso del 95%, variantes o derivados de

los mismos. El grado de identidad entre la proteína de ratón y humana es de aproximadamente 91%, y se contempló que las proteínas de neurturina de mamífero preferidas tendrán un alto grado de similitud de identidad. El porcentaje de identidad de un producto de neurturina y la proteína neurturina humana o un precursor puede ser determinado de acuerdo a procedimientos estándar, por ejemplo, mediante el algoritmo BLAST. Preferentemente, el porcentaje de identidad se calcula como el porcentaje de aminoácidos residuales encontrados en la más pequeña de dos secuencias que se alinean con aminoácidos residuales idénticos en la secuencia que esté siendo comparada. Cuando pretenden ser introducidos cuatro espacios en la longitud de 100 aminoácidos para ayudar a esa alineación.

El término "ortólogo" se relaciona con polipéptidos en diferentes especies que evolucionaron de un gen ancestral común por especificación. Los ortólogos conservan la misma función en el curso de la evolución.

El término "polietilen glicol" o "PEG" se relaciona con el PEG en sí, así como derivados del mismo. El PEG polimérico es usado como metoxi-PEG-OH, (m-PEG), en el cual un término es el grupo metoxi relativamente inerte, mientras que el otro término es un grupo hidroxilo que está sujeto a modificación química. Los PEG ramificados están también en uso común. El número de brazos ramificantes (m) puede variar de tres a cien o más. Los grupos hidroxilo son sometidos además a modificación química. Otra forma ramificada, como la descrita en la Solicitud de Patente PCT WO 96/21469, tiene un solo término que es objeto de modificación química. Otra forma ramificada más, tiene

grupos reactivos, como carboxilo, a lo largo del esqueleto del PEG más que al final de las cadenas de PEG. Además de esas formas de PEG, el polímero también puede ser preparado con enlaces débiles o degradables en el esqueleto. Por ejemplo, Harris ha mostrado en la Solicitud de Patente Estadounidense No. de Serie 06/026,716, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad, que el PEG se puede ser preparado con enlaces éster en el esqueleto polimérico que son objeto de hidrólisis. Esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de peso molecular más bajo. Los copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno están estrechamente relacionados con el PEG en su química, y pueden ser usados en lugar del PEG en muchas de sus aplicaciones.

El término "PEGilación" comprende la unión covalente de una molécula de polietilen glicol a un sustrato, el cual puede ser una proteína. La PEGilación de proteínas es ampliamente conocida en el estado de la técnica y ha sido revisada por, por ejemplo, Veronese, F. M., *Biomaterials* 22 (2001) 405-417. El PEG puede ser ligado usando diferentes grupos funcionales y polietilen glicoles con distinto peso molecular, PEG lineales y ramificados, así como diferentes grupos de enlace (véase también Francis, G. E., et al., *Int. J. Hematol.* 68 (1998) 1-18; Delgado, C1 et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* 9 (1992 (249-304)).

La PEGilación puede ser efectuada en una solución acuosa con reactivos de PEGilación como se describe, por ejemplo, en la WO 00/44785, preferiblemente usando moléculas de PEG lineales o ramificadas activadas con NHS

de un peso molecular de entre 5 y 40 kDa. La PEGilación también puede ser efectuada en fase sólida de acuerdo con Lu, Y. et al., *Reactive Polymers* 22 (1994) 221-229.

La PEGilación selectiva en el aminoácido N-terminal puede ser efectuada de acuerdo con Felix, A.M., et al., *ACS Symp. Ser* 680 (Poly(ethylene glycol)) (1997) 218-238. La PEGilación N-terminal selectiva es lograda durante la síntesis en fase sólida por acoplamiento de un derivado de aminoácido N-PEGilado al aminoácido N-terminal de la cadena peptídica. La PEGilación de la cadena lateral se realiza durante la síntesis de fase sólida por acoplamiento de derivados del aminoácido N-PEGilados a la cadena en crecimiento. La PEGilación de la cadena lateral y el N-terminal combinados es procesada como se describió anteriormente con la síntesis en fase sólida o por síntesis en fase de solución aplicando reactivos de PEG activados al péptido desprotegido en el amino.

Los derivados de PEG adecuados son moléculas de PEG activadas con un peso molecular promedio preferido de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 40 kDa, de manera más preferible de aproximadamente 20 hasta aproximadamente 40 kDa, y de manera más preferible de aproximadamente 30 kDa. Los derivados de PEG puede ser PEG lineales o ramificados.

Los derivados de PEG activados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Morpurgo, M., et al., *J. Bioconj. Chem.* 7 (1996) 363-368, para PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y cadena ramificada especies son adecuadas para la preparación de fragmentos PEGilados. Los ejemplos de reactivos de PEG

reactivados son yodo-acetil-metoxi-PEG y metoxi-PEG-vinilsulfona (m es un entero de preferencia de aproximadamente 450 hasta aproximadamente 900 y R es alquilo inferior, lineal o ramificado, que tiene de uno a seis átomos de carbono como el metilo, etilo, isopropilo, etc., de los cuales se prefiere de metilo.

Como se utiliza aquí, el término "PEG" o "porción de PEG" pretenden incluir, pero no se limita a, PEG lineal o ramificado, metoxi PEG, PEG degradable hidrolítica o enzimáticamente, PEG colgante, PEG dendrímero, copolímeros de PEG y uno o más polioles, y copolímeros de PEG y PLGA (poli (ácido láctico/glicólico)).

El término "neurturina PEGilada" o "neurturina modificada por" "PEGilación" o "conjugado de neurturina que comprende una porción de polietilen glicol" se relaciona con un producto de proteína neurturina producido por un método por el cual una porción de PEG se une covalentemente para formar estas proteínas PEGiladas.

El término "soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se relaciona con uno y más compuestos farmacéutico y fisiológicamente aceptables, como excipientes y auxiliares, lo cual facilita el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones, las cuales pueden ser usadas farmacéuticamente. Los detalles se pueden encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

El término "productos de proteína neurturina de control no modificado" se relaciona con un producto de proteína neurturina del mismo origen que el producto de proteína neurturina modificada correlacionada que se usa

como control.

El término "variante" como se usa aquí se relaciona con una variante polinucleotídica que puede contener una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones, como se describe más adelante, con relación con un polipéptido nativo. El término "variante" también abarca polipéptidos homólogos de origen xenogénico. Por lo general, una variante de neurturina mantiene la actividad biológica ya sea completamente, una proporción sustancial de la misma, o al menos parcialmente, como, por ejemplo, se puede determinar usando un ensayo específico como se describe más adelante. El término "variante" como se usa aquí también abarca la neurturina que fue modificada mediante la alteración de las secuencias de proteínas por sustituciones, adiciones o supresiones proporcionando moléculas funcionalmente equivalente, como es bien sabido en la técnica. La última incluye secuencias alteradas en las cuales aminoácidos residuales funcionalmente equivalentes son sustituidos por los residuos dentro de la secuencia dando como resultado el intercambio biológicamente silencioso.

Las variantes de neurturina se preparan introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ADN que codifica para el polipéptido o por síntesis química in vitro del polipéptido deseado. Será apreciado por aquellos expertos en la técnica que pueden hacerse supresiones, inserciones y sustituciones, dando como resultado una variante producto de la proteína que presenta actividad biológica de neurturina.

Las técnicas de mutagénesis como de sustitución,

inserción o supresión de uno o más aminoácidos seleccionados son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica (por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,518,584, la descripción de la cual se incorpora por lo tanto aquí como referencia.)

En una modalidad preferida, son introducidos cambios de aminoácidos en la región entre los aminoácidos 47-69, preferiblemente 51-65, de la neurturina humana madura (aminoácidos 141-164, preferiblemente 147-160, como se muestra en la Figura 3). Esos cambios de aminoácidos pueden comprender al menos una supresión o sustitución de un residuo de arginina en esta región, por ejemplo, los residuos de arginina 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 y/o 65. Los preferidos son sustituciones de arginina por aminoácidos neutros o ácidos, por ejemplo, glicina, serina, alanina, aspartato o glutamato. Especialmente preferida es una sustitución por el glutamato, por ejemplo, R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E y R65E o una variante de neurturina que comprende al menos 2 de esas sustituciones.

De manera alternativa y/o adicionalmente un aminoácido residual de neurturina, por ejemplo, en la región indicada anteriormente, en particular un residuo de arginina, puede ser sustituido por la lisina para facilitar el acoplamiento a grupos poliol. Puesto que no existe lisina en neurturina humana madura, ese cambio permite la modificación específica del sitio con grupos poliol. Específicamente preferida es una sustitución por la lisina en la región antes indicada, por ejemplo, R51K, R52K, R54K, R56K, R57K, R58K, R60K, R61K y R65K o una variante de neurturina que comprende al menos 2 de esas sustituciones.

Las variantes de sustitución de neurturina tienen al menos un aminoácido residual de la secuencia de aminoácidos de la neurturina humana o de ratón removido y un residuo diferente insertado en su lugar. Esas variantes de sustitución incluyen variantes alélicas, las cuales se caracterizan por cambios en la secuencia nucleotídica natural en la relación de especies que pueden o no dar como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos.

De manera sorprendente, se ha encontrado por los inventores de la presente que una composición farmacéutica como la descrita tiene una mayor biodisponibilidad de su ingrediente activo, la neurturina conjugada y/o fragmento biológicamente activo de la misma, en comparación con una composición farmacéutica que no comprende neurturina conjugada. La invención demuestra que la conjugación de la proteína neurturina con un poliol como el PEG mejora significativamente la vida media en suero y biodisponibilidad de un producto de neurturina. La mejora de la biodisponibilidad de un producto de neurturina a su vez puede reducir la acumulación o procesamiento del agente en el sitio de la inyección si se aplica subcutáneamente y que puede mejorar la tolerancia local de esta manera.

La presente invención proporciona el método de aplicación de los conjugados de neurturina de la invención como agentes activos a pacientes en una dosis mucho menor en comparación con la neurturina de control no modificada para tener un efecto terapéutico. Esto cumple con la necesidad de "agentes terapéuticos de proteína amigables con el usuario" y también puede dar como resultado costos de producción más bajo del agente activo y/o la composición

farmacéutica.

Los conjugados de la neurturina de la presente también tienen una mayor solubilidad en soluciones acuosas en comparación con la neurturina no modificada, lo cual
5 puede dar como resultado una simplificación de la formulación del agente activo.

Como una ventaja más, el acoplamiento de polioles como el PEG a la neurturina puede reducir la inmunogenicidad a la neurturina y por lo tanto la formación
10 de anticuerpos neutralizantes o reacciones alérgicas contra el agente activo.

Preferiblemente, el producto de proteína neurturina de la presente invención es una neurturina humana o un fragmento biológicamente activo de la misma.
15 Los productos de proteína neurturina son producidos preferiblemente vía técnicas recombinantes debido a que esos métodos son capaces de lograr grandes cantidades de proteína con una gran pureza y no se limitan a productos expresados en sistemas celulares, de bacterias, plantas,
20 mamíferos o insectos.

Los productos de proteína neurturina recombinante incluyen formas glicosiladas y no glicosiladas de la proteína. En general las técnicas recombinantes implican el aislamiento de los genes que codifican para un producto de
25 proteína neurturina, clonación del gen en un vector y/o tipo de célula adecuada, modificación del gen si es necesario para codificar para una variante deseada, y expresar el gen para producir el producto de proteína neurturina.

30 De manera alternativa, puede ser sintetizada

25

químicamente una secuencia nucleotídica que codifique para el producto de neurturina deseado. Se contempló que un producto de neurturina puede ser expresado usando secuencias nucleotídicas que varíen en el uso del codón debido a la degeneración del código genético o variaciones alélicas o alteraciones hechas para facilitar la producción del producto de proteína por la célula seleccionada.

Kotzbauer et al., Nature 384:467-470, describe la identificación de un ADNc de ratón y secuencias de aminoácidos y un ADNc humano y secuencias de aminoácidos para una proteína neurturina, identificada aquí como SEQ ID NO:1.

Los productos de neurturina de acuerdo con la presente invención pueden ser aislados o generados por una variedad de medios. Métodos ejemplares para producir productos de neurturina están descritos en la solicitud de patente WO 97/08196, la cual se incorpora aquí como referencia. También se describen una variedad de vectores, células anfitrionas, condiciones de crecimiento en cultivo para la expresión de la proteína neurturina, así como métodos para sintetizar varios productos de proteína neurturina. Los vectores adicionales adecuados para la expresión de producto de proteína neurturina en E. coli son descritos en la Patente No. EP 0 423 980, la descripción de la cual se incorpora aquí como referencia.

La forma biológicamente activa de la proteína neurturina es un dímero unido por enlaces disulfuro, lo cual puede ser determinado por el peso molecular de la neurturina modificada. El material aislado después de la expresión en el sistema bacteriano es en esencia biológicamente inactivo, y existe como un monómero. Es

necesario el repliegue para producir el dímero unido por enlaces disulfuro biológicamente activo. Los procesos adecuados en el repliegue y maduración de la neurturina expresada en sistemas bacterianos son sustancialmente similares a aquéllos descritos en la WO 93/06116. Los ensayos estándar *in vitro* para la determinación de la actividad de la neurturina son también esencialmente similares a aquéllos que determinan la actividad GDNF como se describe en la WO 93/06116 y la Solicitud de Patente Estadounidense No. 08/535,681, y por lo tanto se incorporan aquí como referencia.

La unión covalente entre el polímero biodegradable, inerte, no tóxico, polietilen glicol (PEG), también conocido como óxido de polietileno (PEO), a la neurturina tiene aplicaciones importantes en biotecnología y medicina. La PEGilación de la neurturina da como resultado una mejor farmacocinética lo cual también da como resultado una duración sostenida, mejor seguridad (es decir, menos toxicidad, inmunogenicidad y antigenicidad), incremento de la eficacia, disminución de la frecuencia de dosificación, mejor solubilidad y estabilidad del fármaco, reducción de la proteólisis, y facilita la liberación controlada del fármaco.

La presente invención contempla el uso de productos de proteína neurturina, por ejemplo los derivados que son neurturinas expresadas por procariotes, o variantes de las mismas, ligadas al menos a una molécula de polietilen glicol, así como el uso de neurturina, o variantes de la misma, unida a una o más moléculas de polietilen glicol, vía un enlace acilo o alquilo. La

PEGilación puede ser llevada a cabo por cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo: Enfoque sobre los Factores de Crecimiento, 3(2):4-10, 1992; EP 0 154 316, la descripción de la cual se incorpora aquí como referencia; EP 0 401 384; y las otras publicaciones citadas aquí que se relacionan con la PEGilación.

La composición farmacéutica de la presente invención tiene una mayor biodisponibilidad del ingrediente activo en un mamífero, por ejemplo, un humano, en comparación con una composición farmacéutica la cual no contiene la neurturina PEGilada (véase la Figuras 2A y 2B). Preferiblemente, la neurturina PEGilada está presente en una cantidad para proporcionar un incremento de al menos 2 veces, preferiblemente al menos 5 veces y de manera más preferible al menos 10 veces en la biodisponibilidad del ingrediente activo.

El incremento de la biodisponibilidad puede estar determinado como se muestra en los Ejemplos de la presente solicitud. De manera más particular, una composición que contiene el ingrediente activo en una cantidad o dosis dada en comparación con una composición farmacéutica que contiene el ingrediente activo en la misma dosis pero sin PEGilación. La biodisponibilidad de ambas composiciones puede ser determinada de la concentración en plasma después de la administración subcutánea a animales de experimentación, por ejemplo, ratones. De manera más preferible, la concentración en plasma es medida durante un periodo de tiempo de al menos 120 min, preferiblemente de 240 min y de manera más preferible de 24 h (véase las Figuras 2A y 2B).

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser adaptada para su administración por cualquier ruta efectiva, por ejemplo por las rutas de administración oral, nasal, rectal, pulmonar, tópica, transdérmica o parenteral. De este modo, la composición puede ser una composición sólida o líquida, por ejemplo, una tableta, cápsula, polvo, crema, gel, ungüento, solución, emulsión, suspensión, liofilizado, etc. Preferiblemente, sin embargo, la composición es administrada por inyección o infusión, de manera más preferible por inyección, por ejemplo, por inyección subcutánea o intravenosa. La composición farmacéutica es preferiblemente una solución acuosa.

Además el ingrediente activo y opcionalmente una sustancia de bajo peso molecular como un polímero polianiónico, la composición farmacéutica puede comprender un soporte, un diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, como amortiguadores, agentes para ajustar tonicidad, estabilizadores, cargas, desintegrantes, espesantes, etc.

La composición farmacéutica contiene el ingrediente activo en una cantidad o dosis terapéuticamente efectiva. La dosis terapéuticamente efectiva depende del tipo del ingrediente activo, el tipo y la variedad de la enfermedad a ser tratada y el tipo de administración. Para composiciones parenterales que contienen neurturina como ingrediente activo, la dosis terapéuticamente efectiva está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0.001 mg a 500 mg, de manera más preferible de aproximadamente 0.05 hasta aproximadamente 100 mg, aún más preferible de

89

aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 5 mg por día.

La composición es administrada preferiblemente a un mamífero, particularmente un humano. De este modo, la composición es adecuada para medicina veterinaria y humana.

5 La composición es particularmente adecuada para la prevención y/o tratamiento de trastornos neurodegenerativos o pancreáticos, particularmente trastornos autoinmunes pancreáticos como la diabetes tipo I y LADA, o diabetes tipo II.

10 El conjugado de neurturina como se describe aquí puede ser administrado por cualesquier medios adecuados, preferiblemente enteral o parenteral o tópicamente de manera directa al páncreas, como es sabido por aquellos expertos en la técnica. La dosis específica puede ser

15 calculada de acuerdo a consideraciones de peso corporal, área de superficie corporal o tamaño del órgano. La refinación adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosis apropiada para el tratamiento e implica

20 cada una de las composiciones mencionadas anteriormente es efectuada de manera rutinaria por aquellos expertos en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas efectuadas de manera rutinaria. Las dosis apropiadas pueden ser determinadas a través del uso de ensayos establecidos para determinar las dosis utilizadas en conjunto con los datos

25 de dosis-respuesta apropiados. El régimen de dosis final implicado en un método para tratar las condiciones descritas anteriormente será determinado por el médico que preste la atención, considerando varios factores que modifiquen la acción de los fármacos, por ejemplo, la edad,

30 condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la

severidad de cualquier infección, tiempo de administración y otros factores clínicos. A medida que se conduzcan estudios, emergerá mayor información con respecto a los niveles de dosis apropiada para el tratamiento de varias enfermedades y condiciones.

Se contempló que la administración continua o liberación sostenida de un conjugado de neurturina como se describe aquí puede ser ventajosa para un tratamiento dado. Aunque la administración continua puede ser efectuada vía medios mecánicos, como con una bomba de infusión, se contempló que pueden ser practicados otros modos de administración continua o casi continua. Por ejemplo, la derivación o encapsulación química pueden dar como resultado formas de liberación sostenida de la proteína que tienen el efecto de la presencia continua, en cantidades precisas, sobre la base de un régimen de dosis determinado. De este modo, los productos de proteína neurturina incluyen proteínas derivadas o de otro modo formuladas para efectuar esa administración continua.

En una modalidad más preferida, el conjugado de neurturina puede ser proporcionado directamente al progenitor, por ejemplo células no diferenciadas para estimular la diferenciación de células productoras de insulina *in vitro* o *in vivo*. En esta modalidad de la invención, el conjugado de neurturina puede ser agregado de manera preferible a concentraciones entre 0.1 ng/ml y 500 ng/ml, de manera más preferible entre 1 ng/ml y 100 ng/ml, de manera aún más preferible entre 20 y 80 ng/ml y de manera más preferible 50 ng/ml.

El conjugado de neurturina como se describe aquí

puede ser usado en una monoterapia o una terapia de combinación con otros agentes farmacéuticos. Por ejemplo, puede ser administrado junto con otros agentes farmacéuticos adecuados para el tratamiento o prevención de enfermedades pancreáticas y/o obesidad y/o síndrome metabólico, particularmente con otros agentes farmacéuticos adecuados para estimular y/o inducir la diferenciación de células productoras de insulina de células progenitoras. Además, puede ser usado junto con agentes farmacéuticos que tengan una actividad inmunosupresora, como por ejemplo anticuerpos, polipéptidos y/o sustancias de bajo peso molecular peptídicas o no peptídicas como se describe en la WO 2005/51415.

Una modalidad más de la presente invención es una variante de la neurturina humana que comprende al menos uno, por ejemplo 1,2,3 o 4 cambios de aminoácidos en comparación con la neurturina humana natural. La variante de la neurturina humana puede tener una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones, como se describe con detalle más arriba, en relación al polipéptido humano nativo. Las variantes de neurturinas pueden ser preparadas como se describió anteriormente.

En una modalidad preferida, están presentes cambios de aminoácidos en la región entre los aminoácidos 47-69, preferiblemente 51-65 de neurturina humana madura (aminoácidos 141-164, preferiblemente 147-160 como se muestra en la Figura 3). Esos cambios de aminoácidos pueden comprender al menos una supresión o sustitución de un residuo de arginina en esta región. Por ejemplo los residuos de arginina 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 y/o 65.

Las preferidas son sustituciones de arginina por aminoácidos neutros o ácidos, por ejemplo, glicina, serina, alanina, aspartato o glutamato. Especialmente preferida es una sustitución por glutamato, por ejemplo, R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E y R65E, o una variante de neurturina que comprende al menos dos de esas sustituciones.

También son preferidas las variantes de la neurturina humana, donde de manera alternativa y/o adicional un aminoácido residual, por ejemplo, en la región indicada anteriormente, particularmente un residuo de arginina, es sustituido por lisina. Por lo tanto, es facilitado el acoplamiento específico al sitio de la variante de neurturina a grupos poliol. Específicamente preferidos una sustitución por lisina en la región indicada anteriormente, por ejemplo, R51K, R52K, R54K, R56K, R57K, R58K, R60K, R61K y R65K o una variante de neurturina que comprende al menos 2 de estas sustituciones.

Las variantes de sustitución de neurturina de acuerdo con la presente invención tienen al menos un aminoácido residual de la secuencia de aminoácidos de la neurturina humana removido y un residuo diferente insertado en su lugar. Esas sustitución incluyen variantes alélicas las cuales se caracterizan por cambios en la secuencia nucleotídica natural en poblaciones de especies que pueden dar como resultado o no un cambio de aminoácido.

La presente invención proporciona además un método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite del mismo, donde la composición comprende una cantidad o dosis farmacéuticamente activa de

al menos un producto de proteína neurturina conjugado con al menos un poliol como el PEG o un fragmento biológicamente activo de esa neurturina conjugada como un ingrediente activo junto con un soporte, diluyente y/o
5 adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona también además un método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite del mismo, donde la composición comprende una cantidad o dosis farmacéuticamente activa de al menos un
10 producto de proteína neurturina modificada o un fragmento biológicamente activo del mismo como un ingrediente activo junto con una sustancia de peso molecular junto con soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

15

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Las siguientes Figuras 1A a 8B y Ejemplos ilustran la invención y son modalidades no limitantes de la invención como se reclama más adelante. Numerosos aspectos y ventajas adicionales de la invención se volverán
20 evidentes a aquellos expertos en la técnica tras la consideración de la siguiente descripción de las Figuras.

Figuras 1A y 1B: Actividad biológica de neurturina PEGilada en cultivo celular.
25

Dosis respuesta de derivados de Neurturina (media $n=3+/-$ DE); (media $n=4+/-$ DE)

La línea celular reportera que es sometida a concentraciones crecientes de neurturina o conjugado de
30 neurturina con PEG (neurturina PEGilada). La actividad del

gen reportero resultante (unidades de luz relativas (RLU) dadas sobre el eje y) fue graficada contra la concentración final del agente de prueba (dada en el eje x en ng/ml; Figuras 1A y 1B). Fueron usados dos lotes producidos independientemente de neurturina no modificada como 5 controles experimentales (PeproTech; Lot0805112 y Lot0106112) y su actividad relativa fue comparada con aquéllas de tres conjugados PEGilados (mono-mPEG-NHS-neurturina, mono-mPEG-CHO-neurturina y mono-CES0310-neurturina). Los valores dados son medios de al menos 3 10 pozos $\pm$ D.E. Las CE_{50} calculadas de las diferentes pruebas son: Neurturina (Lote 0805112, proteína no modificada): CE_{50} = 2.2 ng/ml, neurturina (Lote 0106112, proteína no modificada): CE_{50} = 1.2 ng/ml, mono-CES0310-neurturina: CE_{50} = 12 ng/ml (Figura 1A), y neurturina (Lote 0106112, 15 proteína no modificada): CE_{50} = 3.8 ng/ml, mono-mPEG-NHS-neurturina: CE_{50} = 9.7 ng/ml, y mono-mPEG-CHO-neurturina: CE_{50} = 7.4 ng/ml (Figura 1B).

20 **Figuras 2A y 2B: Estudios farmacocinéticos (PK) después de la administración subcutánea de agentes de prueba en ratones**

Las Figuras 2A y 2B muestran la concentración en plasma de neurturina en ng/ml en varios puntos en el tiempo 25 después de la administración de 0.050 mg/kg de PC (Fig. 2A) o 0.50mg/kg de PC (Fig. 2B) de neurturina o neurturina PEGilada a ratones. Los niveles en plasma resultantes fueron determinados por un ensayo de ELISA de neurturina. El punto cero en el tiempo muestra la señal de fondo 30 promedio para la neurturina en suero de ratón usando este

5/35

ensayo de ELISA. Los valores de fondo fueron calculados a partir de valores medidos independientemente de suero de 12 (Fig. 2A) o de 11 (Fig. 2B) ratones no tratados. Los otros valores indicados son las medias de niveles en suero medidos de tres animales $\pm$ DE. La Figura 2A muestra datos de PK para el conjugado de neurturina mono-NHS-neurturina provenientes de dos experimentos independientes (mono-NHS-neurturina_Exp.1 y -_Exp.2). La Figura 2B muestra los datos derivados de otro experimento más donde los ratones fueron tratados con 0.50 mg/kg de PC de mono-NHS-neurturina.

Para el análisis el área bajo la curva (ABC) cubre todos los puntos en el tiempo medidos, el valor basal se fijó a 0.6 ng/ml (el valor de fondo promedio en el punto cero en el tiempo): proteína neurturina no modificada: 18.8 ng*min/ml, mono-mPEG-NHS-neurturina_Exp1: 409 ng*min/ml, mono-mPEG-NHS-neurturina_Exp2: 918 ng*min/ml, mono-CES0310-neurturina: CE_{50} = 142 ng*min/ml (Figura 2A), y proteína neurturina no modificada: 324 ng*min/ml, mono-mPEG-NHS-neurturina: 1157 ng*min/ml, y mono-mPEG-CHO-neurturina: 845 ng*min/ml (Figura 2B).

Para el análisis el área bajo la curva (ABC) (Figuras 2A y 2B) de los niveles de neurturina en suero el valor basal se fijó en 0.6 ng/ml de neurturina, lo cual corresponde al nivel de fondo promedio determinado en suero de ratones no tratados.

Figura 3:

Secuencia de proteína de precursor de la neurturina de acuerdo a lo publicado por el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) (número de acceso: NP_004549). La secuencia de la proteína madura que

corresponde a la forma activa biológica así como farmacológicamente se resaltó en negrillas.

Figuras 4A y 4B:

5 **Figura 4A.** Expresión de neurturina humana y
variantes de neurturina mutantes. El PAGE Nativo/Western-
blot del sobrenadante concentrado de células HEK-293 que
expresa neurturina y variantes de neurturina (numeración de
las posiciones de acuerdo con la secuencia de la neurturina
10 humana madura, R: arginina, E: ácido glutámico).

Figura 4B. ELISA de Neurturina: Curva estándar
Representativa usando neurturina recombinante humana
expresada de *E. coli*.

15 **Figuras 5A y 5B: Cuantificación de la actividad
biológica de la neurturina**

Figura 5A. Ensayo de actividad biológica de
neurturina celular: Actividad del gen reportero de Tirosina
hidroxilasa estimulada por neurturina recombinante humana
20 exógena de *E.coli* en concentraciones crecientes combinadas
con concentraciones crecientes de suero.

Figura 5B. Actividad biológica de variantes de
neurturina (n.d.: no detectada)

25 **Figura 6: Alineación de las secuencias de
neurturina de diferentes especies vertebradas.**

Los aminoácidos 47-69 de neurturina humana madura
muestran (la numeración de las posiciones de acuerdo con la
secuencia del péptido de neurturina humana madura, número
30 de acceso del gen banco NP_004549, péptido maduro aa 96-

197). Las variaciones de aminoácidos diferentes de la neurturina humana se grafican en negrillas y subrayado (Números de Acceso del GenBank entre corchetes).

5 **Figura 7: Secuencia de ADN de un plásmido recombinante de expresión de neurturina: Kr-G3-H6-G3-Xa-neurturina (wt)**

10 Kr-G3-H6-G3-Xa-neurturina(wt) clonada en vector de pMA. La secuencia de ADN de la hebra sentido y antisentido se muestran junto con los sitios de restricción y la secuencia de aminoácidos resultantes de la región codificadora.

15 **Figuras 8A y 8B: ELISA de anticuerpo anti-neurturina**

 ELISA de anticuerpo anti-neurturina: Figura 8A: Curva estándar usando IgG anti-neurturina, Figura 8B: Curva estándar usando IgG/IgM anti-neurturina.

20 Deberá notarse que todas las modalidades preferidas discutidas para uno o varios aspectos de la invención también se relacionan con otros aspectos.

 La versatilidad de la presente invención es ilustrada, pero no limitada, por los siguientes Ejemplos.

25 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1 - PEGilación de neurturina

30 Los grupos polietilenglicol (PEG) fueron conjugados a la neurturina a través de un proceso llamado PEGilación. Esta tecnología es usada ampliamente para la modificación de proteínas terapéuticas y el procedimiento

es familiar a cualquier experto en la técnica. En la presente invención, los conjugados de neurturina mono PEGilados fueron producidos enlazando una sola molécula de PEG al aminoácido N-terminal de uno de las dos subunidades del homodímero. Se produjeron dos conjugados diferentes de neurturina mono-PEGilada que difieren en tamaño y estructura del PEG unido así como en el método de producción para conjugar el PEG a la proteína. El conjugado descrito como "mono-mPEG-NHS-neurturina" aquí fue producido usando un reactivo de PEG lineal de aproximadamente 5 kDa (succinato de mPEG-succinimidilo; NOF, Japón). Este llamado "método de NHS" es el método más comúnmente usado para la PEGilación de proteínas solubles. Además, se usó un polietilen glicol butiraldehído (Nektar, 082M0H01) de 5 kDa para generar el conjugado descrito como "mono-mPEG-CHO-neurturina". Bajo condiciones experimentales específicas los ésteres o aldehídos de NHS reaccionan eficientemente con grupos amino libres de proteínas y péptidos. En otro conjugado más descritos como "mono-CES0310-neurturina", el aminoácido N-terminal de una cadena del homodímero de neurturina fue conjugado con un PEG ramificado de seis brazos de aproximadamente 5 kDa usando una metodología de PEGilación conocida en la técnica (véase, por ejemplo, pero sin limitarse a, DE 2005 100 04 157.0, EP 1 631 545 A2; WO 04/108634; WO 07/025763; CA 2528667). La neurturina no contiene residuos de lisina, por lo tanto se espera que las reacciones de PEGilación descritas anteriormente principalmente PEGilación N-terminal vía los grupos amino reactivos de los aminoácidos N-terminales del homodímero de neurturina. La calidad (tamaño y pureza) de los productos

PEGilados fue confirmada usando la metodología bioquímica estándar conocida por cualquier experto en la técnica.

Ejemplo 2 - Actividad biológica de conjugados de neurturina PEGilados o variantes de los mismos

La actividad biológica de los conjugados de neurturina fue evaluada usando un ensayo reportero basado en células. Se determinó que tan fuertemente la neurturina o sus conjugados PEGilados activan un plásmido recombinante de gen reportero en una línea celular que expresa receptores de neurturina sobre la superficie. En este ensayo se encontró que la actividad de ambos conjugados de neurturina PEGilados se redujo de 3 a 10 veces con relación a la neurturina no modificada (Figuras 1A y 1B).

La línea celular de neuroblastoma humano TGW (JCRB0618) que expresa los receptores de neurturina sobre la superficie celular fue transfectada de manera estable con un constructo de gen reportero de neurturina. Los constructos de gen reportero contienen un gen de luciferasa el cual se encuentra entre otros elementos reguladores bajo el control transcripcional de elementos de respuesta en suero repetitivos (SRE). En esas células la expresión de luciferasa es estimulada en respuesta a la activación de la vía de MAPK, por ejemplo a través de la unión de neurturina a sus receptores de superficie. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos. La actividad de la luciferasa fue medida mediante la adición del sustrato de luciferina a los pozos y las lecturas fueron generadas en un lector de análisis (Molecular Devices) operando en el modo de luminescencia.

Ejemplo 3 - Biodisponibilidad mejorada de conjugados de neurturina PEGilados o variantes de los mismos

La biodisponibilidad relativa de los conjugados PEGilados de neurturina fue estimada con la ayuda de estudios de PK en ratones (Figuras 2A y 2B). En esos experimentos la proteína fue inyecta subcutáneamente en la región del cuello de los ratones. A continuación, se determinó la concentración de neurturina en suero en los puntos en el tiempo definido después de la entrega de la proteína usando un ensayo de ELISA específico para la neurturina (Figuras 2A y 2B). La sensibilidad de este ensayo de ELISA para la neurturina fue limitada debido a señales de fondo relativamente altas en presencia de suero de ratón, de acuerdo a lo detectado por el uso de suero de ratones que no fueron tratados con neurturina (valores del punto cero). Después de la inyección de 0.050 mg/kg de peso corporal (PC) de neurturina no modificada, los niveles de neurturina en suero no excedieron significativamente este del fondo en ningún punto en el tiempo. Por el contrario, cuando se aplicó la misma cantidad de neurturina PEGilada se detectó un incremento significativo de los niveles en suero de la proteína inyectada, sin importar el tipo de modificación con PEG (Fig. 2A). Cuando la cantidad de neurturina no modificada inyectada se incrementó 10 veces (0.5 mg/kg PC) la proteína fue detectada significativamente en suero en los puntos en el tiempo 60, 90, 120 y 180 minutos (Fig. 2B). La importancia de esta observación fue confirmada usando la prueba T y se calcularon los valores de $p < 0.05$, También los niveles en suero de los derivados

de neurturina PEGilados dados en la dosis de 0.5 mg/kg PC fueron pocas veces mayor que los de la proteína no modificada (Figuras 2A y 2B).

Los conjugados de neurturina presentados aquí
5 demostraron consistentemente niveles en suero más altos con relación a aquéllos de la proteína no modificada. En conclusión, la PEGilación de la neurturina mejora significativamente la biodisponibilidad de la neurturina.

10 **Ejemplo 4 - Variantes de neurturina**

Los residuos de arginina básicos que se localizan dentro del parche básico de neurturina (aminoácidos 51-65 de la proteína madura) fueron reemplazados por residuos de ácido glutámico a través de mutagénesis basada en PCR
15 dirigida al sitio. De manera breve, la secuencia que codifica para la neurturina humana madura con un péptido señal de secreción eucariótico N-terminal adicional fue modificada por mutagénesis basada en PCR utilizando cebadores desajuste que introducen las mutaciones deseadas:

20 R51E, R52E, R54E, R56E, R57E, R58E, R60E, R61E, R63E o R65E

(numeración de las posiciones de acuerdo con la secuencia del péptido de neurturina humano maduro, el Número de Acceso del Genbank NP_004549, péptido maduro aa
25 96-197, esta secuencia también se muestra en la Figura 3; R: arginina, E: ácido glutámico).

Los plásmidos resultantes se purificaron y la corrección de la secuencia codificadora fue verificada por secuenciamiento. Las secuencias de codificación fueron
30 clonadas vía sitios de clonación HindIII y XhoI

flanqueantes en el vector pCDNA3.1 + (Invitrogen Cat. No. V790-20) para expresión eucariótica.

Para la expresión eucariota, esos vectores, así como de control del vector vacío y el vector de expresión de GFP como control de transfección fueron transfectados de manera transitoria en células HEK-293 cultivadas en recipientes de cultivo tisular de 175 cm² con 25 ml de medio, cada uno. La cosecha de los medios se realizó 48 horas después de la transfección y los sobrenadantes fueron concentrados mediante el uso de columnas de ultrafiltración hasta aproximadamente 0.4 ml, cada uno.

La expresión de neurturina humana wt y las variantes mutantes fue controlada primero por PAGE nativo/Western-blot utilizando anticuerpos para la detección específica de neurturina (véase la Figura 4A). Como control se usó neurturina recombinante humana expresada de E. coli.

La figura 4A muestra que la neurturina natural humana (wt), así como todas las variantes de neurturina modificada R63E fueron expresados en cantidades similares. La masa aparente de las variantes de neurturina fluctuó entre 20 y 25 kDa de manera similar neurturina wt.

El rendimiento de la neurturina expresada fue determinada por ELISA específico para la neurturina. De manera breve, se recubrió anticuerpo antineurturina de conejos sobre micropozos para capturar la neurturina de sobrenadantes de medios concentrados que contienen neurturina. Después del lavado, la neurturina capturada fue cuantificada por una lectura de luminiscencia usando anticuerpo anti-neurturina de cabra seguido con biotina

seguido por el uso de estreptavidina conjugada con peroxidasa. Se usó neurturina recombinante humana expresada de *E. coli* para establecer una curva de estándar (véase la Figura 4B).

5 Además, se cuantificaron las actividades biológicas de las variantes de neurturina expresadas en un ensayo celular específico. El principio del ensayo se basa en los experimentos de Tanaka et al., 2002, 2003 (Tanaka M, Xiao H, Kiuchi K. Heparin facilitates glial cell line-
10 derived neurotrophic factor signal transduction. *Neuroreport*. 2002 Oct 28;13(15):1913-6; Tanaka M, Xiao H, Hirata Y, Kiuchi K. A rapid assay for glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin based on transfection of cells with tyrosine hydroxylase promoter-luciferase construct. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2003 May; 15 11 (2): 119-22). Que muestra la inducción de un plásmido recombinante de gen reportero de tirosina hidroxilasa (TH) por neurturina expresada estable en la línea celular de neuroblastoma TGW humano. Brevemente, las células TGW que
20 sobre expresan el plásmido recombinante de gen reportero de tirosina hidroxilasa (TH) se hicieron reaccionar con las muestras que contienen neurturina conduciendo a la inducción de la vía de MAPK por señalización de la neurturina. Los plásmidos recombinantes del gen reportero
25 contienen un gen de luciferasa bajo el control de elementos de respuesta en suero repetitivos (SRE). La expresión de la luciferasa depende de la activación de la vía MAPK. El ensayo se realizó en placas de 96 pozos, la expresión de luciferasa mediada por neurturina se mide mediante la
30 adición de luciferina y analizada con un lector de

luminiscencia.

Un experimento representativo que demuestra la cuantificación de la actividad biológica de la neurturina utilizando neurturina recombinante humana expresada en E. coli como estándar en combinación con las concentraciones crecientes en suero se muestra en la Figura 5A.

Figura 5B muestra que la neurturina humana recombinante natural, así como las variantes de neurturina excepto la R63E son expresadas en cantidades similares dando como resultado concentraciones de proteína entre 1.2-1.7 g/l, y todas las variantes expresadas mostraron una actividad biológica similar *in vitro* en comparación con la neurturina humana recombinante natural tipo con una CE_{50} entre 0.32-0.89 ng/ml (véase la Figura 5B). La neurturina recombinante humana de E. coli usada para la comparación, mostró una potencia más débil con una CE_{50} de 2.20 ng/ml, probablemente como resultado de una porción de neurturina no replegada apropiadamente en la muestra (véase la Figura 5B).

De este modo, la Figura 5B muestra que las modificaciones en la región del "talón de la neurturina" como una introducción de un aminoácido, cargado negativamente, en el parche de base no compromete la actividad biológica de neurturina en general. De este modo es sorprendente que la técnica anterior muestre que una modificación de aminoácidos básicos a ácidos en la región del talón podría interferir con la actividad biológica de la neurturina (véanse las comparaciones de secuencia y estructura con otros GFL, como se discutió anteriormente).

La falla de expresión de la variante de neurturina R63E muestra que en esta posición no es tolerado

un cambio de arginina a ácido glutámico. Sin embargo, otras modificaciones que no dan como resultado un cambio completo de la carga de aminoácidos son funcionales. Una comparación de las secuencias de homólogos de neurturina conocidos muestra que existe una variante R63E en la neurturina humana homóloga de *Ornithorhynchus anatinus*, *Monodelphis domestica*, y *Gallus gallus*. También existen variantes naturales de los residuos de arginina en las posiciones 52, 57, 58 y 61 en diferentes homólogos de neurturina (véase la Figura 6).

Para crear variantes de neuriturna biológicamente activos con una biodisponibilidad mejorada, los inventores reemplazaron las argininas básicas en la región del "talón" con Lisina. Puesto que la arginina y la lisina están relacionadas estructuralmente, se espera que esos intercambios afecten la estructura de la molécula de neurturina sólo mínimamente. Esos cambios permiten la PEGilación de la neurturina dirigida específicamente al sitio vía la amina primaria de la cadena lateral de la lisina en una región de la proteína que muestra tolerar cambios sustanciales de aminoácidos, y la cual por lo tanto no es importante para la actividad biológica. Esta reacción es altamente específica, debido a que no está presente lisina en las secuencias neurturina humana nativas maduras. Las reacciones de PEG activada con otras aminas se minimizan mediante la optimización de las condiciones de reacción, por ejemplo, pH, temperatura y tiempo de reacción. Efectuando una modificación del PEG dentro del parche básico en la región del "talón", se logran dos objetivos: (i) pueden obtenerse beneficios de la PEGilación

de la proteína (mejor biodisponibilidad vía la eliminación renal reducida, la reducción de la inmunogenicidad, mejor estabilidad proteica) minimizando a la vez los efectos sobre la actividad de la proteína y (ii) se espera que la PEGilación en esta región proteja el parche básico evitando interacciones con proteoglicanos de la superficie celular cargados negativamente, los cual también se espera mejore la biodisponibilidad de la proteína.

En un primer paso, la secuencia codificadora de neurturina humana madura la cual se optimizó para el uso del codón humano (con un péptido señal N-terminal adicional para secreción de eucariótica) y una marca de purificación adicional (repetición de seis residuos de histidina con un sitio adicional para la escisión de esta marca de depuración con el factor Xa) modificado por mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR. Aquí, los codones son intercambiados en residuos de arginina 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 63, o 65 con los codones para los residuos de lisina.

El plásmido recombinante de expresión resultante resultante referido como **Kr-G3-H6-G3-Xa-rhneurturin** en esta invención que contiene las siguientes características:

- Kr: secuencia de ADN de proteína transmembranal 2 que contiene kringle de ratón aminoácidos 1 - 26, péptido señal (número de acceso del GenBank NP_082692) para la secreción citoplasmática optimizada para el uso del codón humano (secuencia de aminoácidos: MGTPHLQGFLLLFPLLLRLHGASAGS; SEQ ID NO: 2).

- G3: secuencia de ADN de un separador de

glicina optimizado para uso de codones humanos (secuencia de aminoácidos: GGG, SEQ ID NO: 3).

• H6: secuencia de ADN de una marca de 6 histidinas para propósitos de purificación optimizada para el uso de codones humanos (secuencia de aminoácidos: HHHHHH; SEQ ID NO: 4).

• Xa: secuencia de ADN del sitio de reconocimiento de proteasa de Factor Xa optimizada para uso de codones humanos (secuencia de aminoácidos: IEGR; SEQ ID NO: 5). Cortes de proteasa de Factor Xa C-terminales después de la arginina.

• rhneurturina: secuencia de ADN de neurturina humana recombinante madura optimizada para uso de codones humanos (secuencia de aminoácidos: ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYCAGACEAAARVYDLGLRRLRQRRRLRRERVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAHSRYHTVHELARECACV; SEQ ID NO: 6). Los codones de arginina individuales en las posiciones 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61, 63, o 65 se sustituyen por el codón de lisina AAG en el plásmido recombinante de expresión variante de neurturina respectivos.

La secuencia de ADN completa de Kr-G3-H6-G3-Xa-rhneurturina (wt) clonada en vector de PMA se muestra en la Figura 7, SEQ ID NO: 7.

25 **Ejemplo 5 - Pegilación de variantes de neurturina**

Los constructos resultantes son clonados en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1+, que se transfectaron en células HEK-293 para la expresión de las variantes de neurturina modificada como se describió anteriormente.

Las variantes de neurturina expresadas son purificadas por ultrafiltración y por cromatografía de afinidad por medio de la marca de depuración introducida.

La estructura, pureza y actividad biológica en las preparaciones de variante de neurturina resultante son verificadas por PAGE nativo/Western-blot y ensayo de actividad de neurturina como se mostró anteriormente.

Las variantes de neurturina biológicamente activas que son expresadas con suficiente rendimiento y son purificadas a una pureza aceptable son usadas para la modificación covalente con diferentes PEG monodispersos. Estos PEG tienen un tamaño preferible de 2.5 - 30 kDa, son lineales o ramificados y activados con éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). El éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) es espontáneamente reactivo con aminas primarias, proporcionando la PEGilación eficiente de proteínas. Otros derivados de PEG son por ejemplo pero no se limitan a moléculas con diferentes tamaños, no monodispersos o con diferentes patrones de ramificación y también pueden ser aplicadas otras químicas de acoplamiento.

Después de la reacción, la marca de purificación es escindida en el sitio de proteinasa introducido por el factor Xa y las variantes de PEG-neurturina son purificadas por cromatografía de exclusión por tamaño y/o afinidad.

Un número de marcas de purificación y combinaciones del sitio de proteasa/proteasa recombinante adicionales son bien conocidos en la técnica y pueden reemplazar la marca de His y/o sitio de factor Xa/escisión de factor Xa. De manera alternativa, la proteína neurturina que contiene los sitios de PEGilación introducidos pueden

ser purificados del sobrenadante de sistemas de expresión eucarióticos o formar el lisado o sobrenadante de bacterias sobreexpresantes sin marca de purificación por métodos cromatográficos.

5 La estructura, pureza y actividad biológica de las preparaciones de variantes de PEG-neurturina resultantes son verificadas por SDS-PAGE/Western-blot, PAGE nativo/Western-blot, y ensayo de actividad de neurturina como se mostró anteriormente.

10 Las variantes de PEG-neurturina purificadas que muestran suficiente actividad biológica *in vitro* son ensayadas *in vivo* por su comportamiento farmacocinético después de la administración subcutánea de 50 $\mu\text{mol/kg}$ s.c. a ratones y ratas. La concentración de neurturina en plasma
15 es determinada por ELISA de neurturina en la línea basal, y a las 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 y 8 horas después de la administración.

 Las variantes de PEG-neurturina seleccionadas que muestran mejor biodisponibilidad en comparación con la
20 neurturina wt son probadas por su eficacia *in vivo* por administración subcutánea a ratas neo STZ una vez al día con 50 $\mu\text{mol/kg}$ durante 6 días. Para ensayar la función las células beta, la glucosa en sangre es determinada cada día, y el contenido de insulina pancreática es determinado
25 después de 6 días de tratamiento en comparación con los grupos control con vehículo y con neurturina wt.

Ejemplo 6 - Potencial inmunogénico de neurturina pegilada

30 La neurturina wt recombinante humana tiene un

66
50

potencial inmunogénico como es demostrado por la aparición de anticuerpos anti-neurturina después de la administración a ratones adultos de más de 2 semanas. Los anticuerpos anti-neurturina han sido detectados con un ensayo específico. De manera breve, la neurturina humana recombinante fue recubierta sobre microplacas para capturar anticuerpos de suero. Después del lavado, los anticuerpos anti-neurturina capturados fueron cuantificados de una lectura de luminiscencia usando anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado con biotina de anticuerpo anti-IgG/IgM de cabra seguido por el uso de estreptavidina conjugada con proxidasa. La IgG anti-neurturina y la IgM anti-neurturina diluidas en suero fueron usadas para establecer las curvas estándar (véase las Figs. 8A y 8B).

Puesto que la PEGilación de las proteínas farmacológicamente activas reduce su potencial inmunogénico, se probaron variantes de PEG-neurturina seleccionada con biodisponibilidad mejorada y potencia sostenida por su potencial inmunogénico de la administración subcutánea una vez al día de 50 $\mu\text{mol/kg}$ durante 28 días en ratones adultos. La aparición de los anticuerpos anti-neurturina es determinada por ensayo de ELISA anticuerpo anti-neurturina cada semana en comparación con grupos control con vehículo y con neurturina wt.

62
51

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de neurturina que comprende una porción de poliol unida covalentemente a un producto de proteína neurturina humana o un fragmento biológicamente activo de la misma.

2. Conjugado de neurturina según la reivindicación 1, que comprende un polipéptido codificado por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID. NO. 1, o un homólogo, ortólogo, variante, análogo, derivado, fragmento biológicamente activo o mutante biológicamente activo del mismo.

3. Conjugado de neurturina según las reivindicaciones 1 o 2, donde la porción de poliol es una porción de polietilen glicol.

4. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la porción de poliol es una porción de poliol de cadena simple.

5. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la porción de poliol es una porción de poliol de cadena ramificada.

6. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la porción de poliol es una porción de polialquilen glicol.

7. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que tiene la misma o una actividad de neurturina *in vivo* mayor que la neurturina humana nativa.

8. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que tiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la neurturina humana.

68
52

9. Conjugado de neurturina según la reivindicación 8, donde el cambio de aminoácido es entre los aminoácidos 47-69, preferiblemente 51-65 de la neurturina humana madura.

5 10. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde al menos uno de los residuos de arginina 51, 52, 54, 56, 57, 58, 60, 61 o 65 es suprimido o sustituido.

10 11. Conjugado de neurturina según la reivindicación 10, donde al menos un residuo de arginina es sustituido por un aminoácido residual neutro o ácido, por ejemplo ácido glutámico.

15 12. Conjugado de neurturina según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, donde al menos es introducido un residuo de lisina.

20 13. Composición farmacéutica que comprende al menos un producto de proteína neurturina y/o un fragmento biológicamente activo del mismo conjugado con al menos una molécula de polietilen glicol como un ingrediente activo junto con un soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

25 14. Composición según la reivindicación 13, donde el producto de proteína neurturina es un producto de proteína neurturina humana o un fragmento biológicamente activo de la misma.

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde el producto de proteína neurturina modificada está monoPEGilado, que comprende una molécula de polietilen glicol de una sola cadena.

30 16. Composición según cualquiera de las

reivindicaciones 13 o 14, donde el producto de proteína de neurturina modificada está oligo o poliPEGilada, comprendiendo dos, tres, cuatro o varias cadenas de molécula de polietilen glicol.

5 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, donde el producto de proteína de neurturina modificada comprende al menos una molécula de polietilen glicol de cadena lineal.

10 18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, donde el producto de proteína neurturina modificada comprende al menos una molécula de polietilen glicol de cadena ramificada.

15 19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-18, donde la molécula de polietilen glicol tiene un peso molecular promedio de 100 a 10000 Da, preferiblemente 200 a 8000 Da y de manera más preferible 1000 a 7000 Da.

20 20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-19, donde la molécula de polietilen glicol está ligada al aminoácido N-terminal del producto de proteína neurturina modificada.

25 21. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-20, donde la molécula de polietilen glicol se liga al producto de proteína neurturina modificada vía un enlace acilo o alquilo.

22. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-21, donde la molécula de polietilen glicol es terminada por un grupo OH-, OCH₃- o OEt-.

30 23. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-22, el cual tiene una mayor

20
37

biodisponibilidad del ingrediente activo en comparación con una composición con un producto de proteína neurturina de control sin modificar.

24. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-23, donde la proteína neurturina modificada está presente en una cantidad para proporcionar un incremento de al menos 2 veces, preferiblemente al menos 5 veces y de manera más preferible al menos 10 veces en la biodisponibilidad del ingrediente activo.

25. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-24 para inyección o infusión.

26. Composición según la reivindicación 25 para inyección subcutánea o intravenosa.

27. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-26 para la prevención o tratamiento de trastornos pancreáticos o neurodegenerativos.

28. Composición según la reivindicación 27 para la prevención o tratamiento de diabetes mellitus tipo I, LADA y diabetes mellitus tipo II.

29. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-28 para la administración a un mamífero, particularmente un humano.

30. Variante de neurturina humana que comprende al menos uno, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 cambios de aminoácido en comparación con la neurturina humana natural.

31. Variante de neurturina humana según la reivindicación 30, donde los cambios de aminoácido son como se definen en las reivindicaciones 9-12.

32. Método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite del mismo que

comprende una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un producto de proteína neurturina modificada o un fragmento biológicamente activo de la misma, el cual está conjugado a al menos una molécula de polietilen glicol como un ingrediente activo junto con un soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

33. Método para administrar una composición farmacéutica a un sujeto que necesite del mismo que comprende una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un producto de proteína neurturina modificada o un fragmento biológicamente activo de la misma, el cual está conjugado con al menos una molécula de polietilen glicol como un ingrediente activo junto con una sustancia de bajo peso molecular con un soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

20

25

30

RESUMEN

La presente invención se relaciona con productos de proteína neurturina conjugados con polioles y composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de neurturina como ingredientes activos, preferiblemente conjugados de neurturina PEGilados o variantes de los mismos, que tienen mayor biodisponibilidad.

10

15

20

25

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, D. COLOMBIA

189

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos y dibujos; marcas de fábrica y de servicios; nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio y licencias.

Vertretung und Vollmacht mit notarielle beglaubigung und Apostille für Patente, Modelle, Muster, Warenzeichen, Dienstleistungsmarken, Handelsnamen, Embleme, namen der domäne und lizenzen.

REPRESENTACION Y PODER

VERTRETUNG UND VOLLMACHT

Yo (nosotros), abajo firmado(s) / Ich (wir) unterzeichnende(r)

DeveloGen Aktiengesellschaft

domiciliado(s) en / wohnhaft in

Marie-Curie-Strasse 7, 37079 Goettingen, Germany

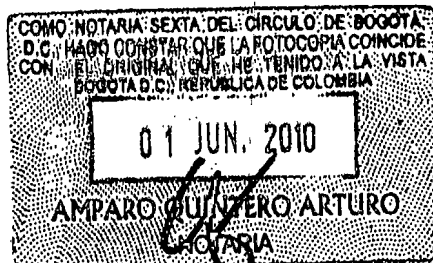
por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades 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 patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas,

© CAVELIER ABOGADOS
WPP0001-189 (MINUTA 12.1.1.4.1.2)

emene(n)a) hiermit in Übereinstimmung mit Abs. 1 des Artikels 543 des Handelsgesetzbuches EMILIO FERRERO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 31929), LUZ CLEMENCIA DE PAEZ (Rechtsanwaltsausweis Nr. 23555) und DANIEL PEÑA (Rechtsanwaltsausweis Nr. 65620), mit Geschäftssitz in Bogotá/Kolumbien, Carrera 4ª N° 72-35 zu meinen (unseren) Prozelbevollmächtigten (EMILIO FERRERO zum Hauptbevollmächtigten, die anderen - in der genannten Reihenfolge zu seinen Stellvertretern) in allen Angelegenheiten, die das gewerbliche Eigentum betreffen. Sie sind befugt, Zustellungen entgegenzunehmen und Prozelbevollmächtigte und außergerichtliche Bevollmächtigte zu ernennen. Der erste Stellvertreter hat Herrn EMILIO FERRERO bei dessen Abwesenheit oder im Falle einer vorübergehenden oder endgültigen Verhinderung zu vertreten. Dasselbe gilt, wenn der zweite Stellvertreter den ersten, oder über der dritte den zweiten, zu vertreten hat. In diesen Fällen wird der Hauptvertreter, oder gegebenenfalls der erste oder zweite Stellvertreter, oder beide, in Form einer durch einen Notar (in Kolumbien) oder durch einen Notar oder sonstigen öffentlichen Beamten oder Konsul von Kolumbien (im Ausland) beglaubigten Erklärung seine Absicht, die Vertretung nicht auszuüben, zum Ausdruck bringen. Sollte eine Verhinderung der Grund dafür sein, ist die entsprechende Bescheinigung beizufügen. Sollte einer der Ernannten endgültig ausscheiden, nimmt der Nachfolgende seine Stelle ein. Bei Beendigung der Abwesenheit oder Verhinderung des Hauptvertreters oder seines ersten oder zweiten Stellvertreters, können EMILIO FERRERO oder aber - je nach Fall - die entsprechenden Stellvertreter, die Vertretung ohne weiteres wieder übernehmen und die jeweilige Stellvertretung gilt als aufgehoben.

Außerdem erteile ich (erteilen wir) den oben genannten Rechtsanwälten die Vollmacht, den Schutz meines (unseres) gewerblichen Eigentums und den Schutz gegen unlauteren Wettbewerb zu erlangen. Zu diesem Zweck ermächtigen wir die genannten Bevollmächtigten zur Vertretung vor sämtlichen Stellen oder Personen, gleichgültig ob diese rechtsprechende Gewalt ausüben oder nicht, vor allem vor den Verwaltungsbehörden, vor der Verwaltungsgerichtsbarkeit und Gerichten, sowie vor den Schiedsgerichten, und zwar in allen Fragen, die sich auf folgende Angelegenheiten beziehen: a) Erlangung von Patenten für Erfindungen, Gebrauchsmuster, Industriezeichnungen, die Eintragung von



defensivas, de servicio, marcas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos administrativos relacionados con estos derechos; en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de

Warenzeichen, Verbandszeichen, Defensivmarken, Dienstleistungsmarken, Werbeslogans, Handelsnamen, Emblemen, Namen der domäne, Gemüsearten und Herkunftsbezeichnungen, ihre Erneuerung, Übertragung, Änderung des Namens oder des Geschäftssitzes, den freiwilligen Verzicht und die Eintragung von Nutzungslizenzen für diese Rechte; b) Klagen wegen unlauteren Wettbewerbs, Verbraucherschutz, Widersprüchen und Einsprüchen, verwaltungsrechtlicher und gerichtlicher Löschung, Nichtigkeit, einstweiligen Verfügungen, Konzessionen von Lizenzen, Verfassungsbeschwerde und allgemein für zivil, straf- und verwaltungsrechtliche und verwaltungsgerichtliche Prozesse, die mit diesen Rechten in Verbindung stehen und die wir betreiben oder die gegen uns anhängig gemacht werden. Wir ermächtigen sie ebenfalls dazu, in allen oben genannten Angelegenheiten einen Unterauftragten einzusetzen, Vergleiche abzuschließen, zu schließen, Prozessverhalte anzuerkennen, zurückzutreten, zu quittieren, in Empfang zu nehmen, Verzicht zu erklären und die Rechtsgeschäfte nicht bevollmächtigter Personen zu genehmigen.

Dado y firmado hoy/Geschehen und unterzeichnet am _____

en/in _____

Por/ermenne(n) _____

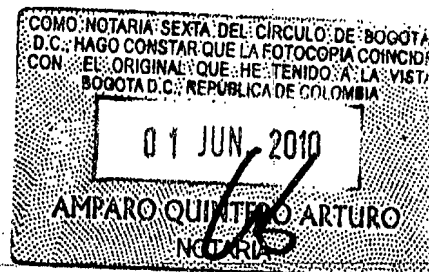
DeveloGen Aktiengesellschaft

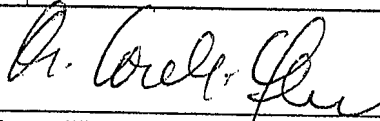
Firma

Corrado Wohrmann
CEO, DeveloGen AG

Carsten Behning
CFO, DeveloGen AG

Unterschrift

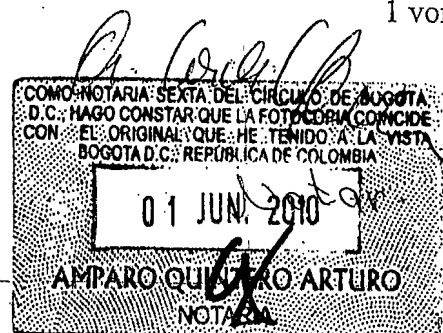


NOTARIELLE BESTÄTIGUNG	NOTARIAL CONFIRMATION
An diesem	On this
11.12.2008 Tag/day, Monat/month, Jahr/year	
erschieden persönlich vor mir, dem unterzeichnenden notary public	before me, the undersigned notary public appeared personally
1. Carsten Dehning, 2. Cord Dohrmann, beide geschäftsansässig: Marie-Curie-Straße 7, 37078 Göttingen	
die mir persönlich als die Personen bekannt sind, welche das beigelegte Dokument in meiner Gegenwart unterzeichnet haben..	personally known to me to be the persons who executed in my presence the attached document.
Außerdem bestätige ich, dass die Firma DeveloGen Aktiengesellschaft mit Sitz in Göttingen, im Handelsregister des Amtsgerichts Göttingen zu HR B 3010 eingetragen ist und dass die Herren Carsten Dehning und Cord Dohrmann gemeinsam berechtigt sind, die Gesellschaft zu vertreten.	Furthermore I certify, that DeveloGen Aktiengesellschaft, seated in Göttingen, is registered with the Municipal Court of Göttingen - Commercial Register - under Nr. HR B 3010 and that Mr. Carsten Dehning and Cord Dohrmann are entitled to act jointly as this company's legal representatives.
vom/dated 11. 12. 2008	
Diese Namensunterschriften der Herren Carsten Dehning und Cord Dohrmann beglaubige ich hiermit.	I herewith certify these signatures.
Zum Zeichen dessen unterschreibe ich und drücke mein Siegel bei.	Witness my hand and official seal
 Name, Unterschrift und Siegel des Notary Public/ Name, Signature and Seal of the Notary Public	

Sämtliche Schreibfehler
berichtigt am 13.1.2009

Göttingen, den 13. Januar 2009

1 von 2



Notarkostenberechnung (§§ 141, 154 KostO)**Geschäftswert: 3.000,00 EUR**

Beglaubigung von Unterschriften §§ 32, 45 I, 33 KostO

5/20 10,00 EUR

Erteilung einer Bescheinigung nach § 21 Abs. 1 Nr. 1 BNotO § 150 Nr. 1 KostO

13,00 EUR

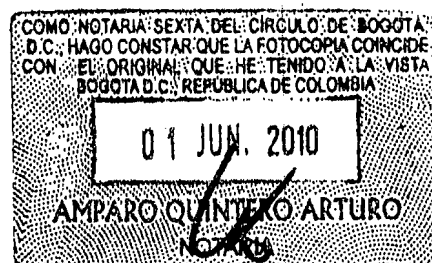
Entgelte für die Übersendung auf Antrag erteilter Ausfertigungen, Ablichtungen und Ausdrücke § 152 II 1 a KostO

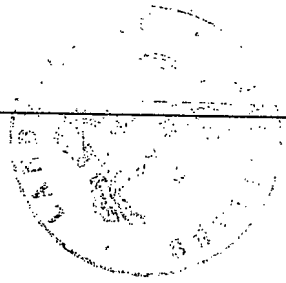
1,45 EUR

Zwischensumme netto

24,45 EUR

19 % Mehrwertsteuer § 151a KostO

4,65 EUR**Gesamtbetrag****29,10 EUR**
Notar



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland.
Diese öffentliche Urkunde
2. ist unterschrieben von
Herrn Dr. Heise in Göttingen
3. in seiner Eigenschaft als Notar;
4. sie ist versehen mit dem Siegel des Notars
Dr. Cord J. Heise in Göttingen.

Bestätigt:

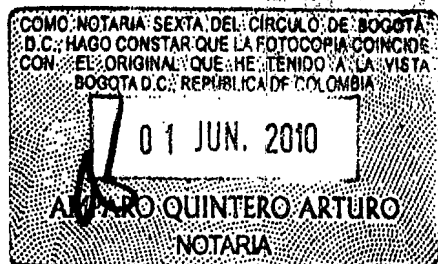
5. in Göttingen
6. am 18.12.2008
7. durch den Präsidenten des Landgerichts
in Göttingen
8. unter 910 E-18088
9. Siegel:



10. Unterschrift:

I. A.

Handwritten signature
(Hacke)
Justizamtsinspektor



La presente traducción oficial No. 0008/09 fue elaborada por Hernando Torres Barrera, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución 01305 de 1998 del Ministerio de Justicia y del Derecho.

A continuación se traduce una certificación notarial y una apostilla en alemán, que acompañan un DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN Y PODER.

REPRESENTACIÓN Y PODER

Yo (nosotros), el (los) abajo firmante(s)

DeveloGen Aktiengesellschaft

domiciliado(s) en

Marie-Curie-Strasse 7, 37079 Göttingen, Alemania

(sigue texto del poder en los idiomas español y alemán)

Dado y firmado hoy _____

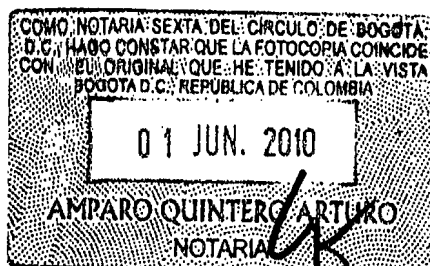
en _____

Por _____

DeveloGen Aktiengesellschaft

Firma

Firma



HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998

78
62

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

En esta fecha

11.12.2008
día, mes, año

comparecieron personalmente ante mí, el notario público abajo firmante

1. Carsten Dehning,
2. Cord Dohrmann,

ambos con domicilio profesional en: Marie-Curie-Straße 7, 370769 Göttingen

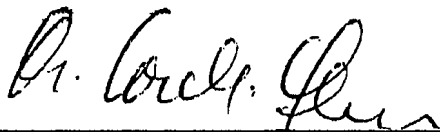
a quienes conozco personalmente como las personas que firmaron en mi presencia el documento adjunto.

Certifico además que la empresa DeveloGen Aktiengesellschaft, con sede en Göttingen, se halla inscrita en el Registro Mercantil del Juzgado Municipal de Göttingen bajo HR B 3010 y que los señores Carsten Dehning y Cord Dohrmann están autorizados de manera conjunta a representar a la sociedad.

Fechado el 11.12.2008

Por el presente certifico las presentes firmas autógrafas de los señores Carsten Dehning y Cord Dohrmann Dohrmann.

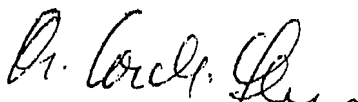
En constancia de lo anterior, firmo y estampo mi sello al pie de mi firma.



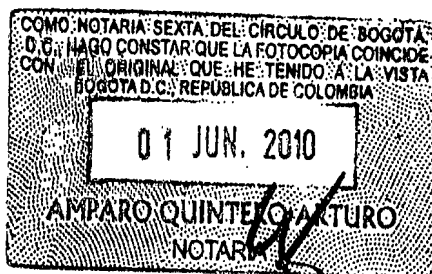
Nombre, firma y sello del Notario Público

Todos los errores de digitación/ortografía se corrigieron el 13 de enero de 2009. Göttingen, 13 de enero de 2009

1 de 2



Notario



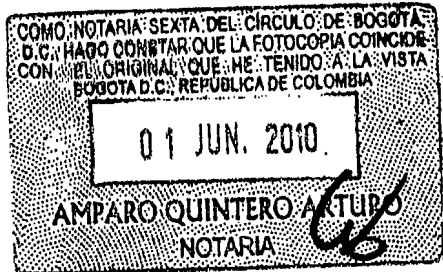
HERNANDO TORRES BARKERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998

29
63

Cálculo de Gastos Notariales según Artículos (§§) 141, 154 del Reglamento de Gastos (KostO):

Valor de la transacción: 3.000,00 EUROS		
Autenticación de firmas §§ 32, 45 I, 33 KostO	5/20	10,00 EUROS
Expedición de una certificación según § 21, parágrafo 1, numeral 1, del Reglamento Federal de Notarios (BNotO) § 150, numeral 1 KostO		13,00 EUROS
Reembolsos por envío, previa solicitud, de ejemplares formalizados, fotocopias y extractos § 152 II 1 KostO		1,45 EUROS
Subtotal neto		24,45 EUROS
19 % IVA § 151 a KostO		4,65 EURSO
Valor Total		29,10 EUROS


Notario




HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998

APOSTILLA

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. País: República Federal de Alemania
2. Este documento público
3. está firmado por el
4. Señor Dr. Heise en Göttingen
5. en su calidad de Notario
6. lleva el sello del Notario
7. Dr. Cord J. Heise en Göttingen

Certificado

5. en Göttingen
6. el 18 de diciembre de 2008
7. por el Presidente del Tribunal Regional en Göttingen
8. bajo el No. 910 E I 8088
9. Sello/timbre
10. Firma

En representación:

Hacke
(Hacke)
Inspector Judicial

868661
Hernando Torres

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
BOGOTÁ D.C.

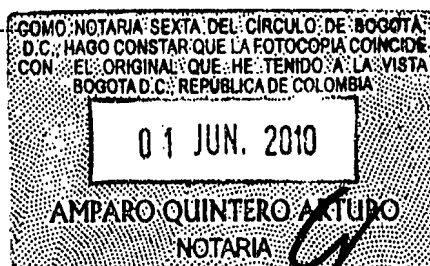
Jefe de la Oficina
Notarial

20062

2008 ENE 28 12 1:21

SELLO: EL PRESIDENTE DEL TRIBUNAL REGIONAL EN GÖTTINGEN

Bogotá, D. C, 26 de enero de 2009



Hernando Torres Barrera
HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

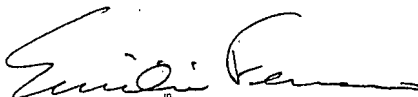
E. S. D.

Poderdante : DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT

Poder conferido el : 13/01/2009

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

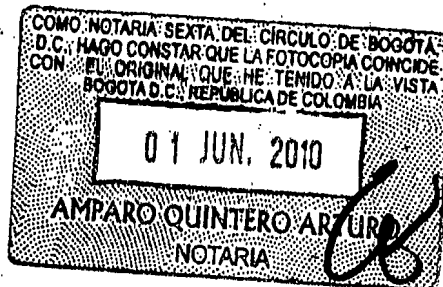
Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C.

Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,

NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE

BOGOTA, D.C.

Cornopredec(aron)

Quisi(era) exhibir(eron) la(s) C.C.

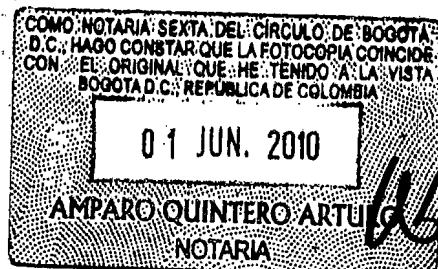
Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que al reco(n)

en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y

que el contenido del mismo es claro.

En constancia se firma esta diligencia.

Emilia Fuenmayor
Luz Clemencia Sobez



82
66

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 134330
		Bogotá D.C., Diciembre 05 de 2012 - 08:32:16

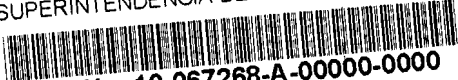
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157715670	04/12/2012	26.315.400.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00 590.000.00
			\$590.000.00

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

Responsable: 
****_
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-067268-A-00000-0000
Fecha: 2012-12-18 11:16:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 67

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-067268-00006-0000
Fecha: 2012-12-18 18:04:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 83

CCLO: J6793-841-004-7.

83
67

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 137553

Bogotá D.C., Diciembre 12 de 2012 - 16:27:48

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	123034	27/11/2012		60.000.00
RECIBO DE CA	999999999	123053	27/11/2012		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	123054	27/11/2012		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	134339	05/12/2012		620.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO

23 50005-01-01 SOLICITUDES

CONCEPTO

1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL
A LAS 10 INICIALES

Vr.UNDITARIO

30.000.00

Vr.CONCEPTO

690.000.00

\$690.000.00

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-067268-A-00000-0000

Fecha: 2012-12-18 11:16:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 67

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-067268-00006-0000

Fecha: 2012-12-13 18:04:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 83

0010: 16793-841-0047

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

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

Diciembre 12 de 2012 - 16:27:49