

Industria y Comercio
S U P E R I N T E N D E N C I A

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 13-159374

54. TÍTULO Composiciones farmacéu-
ticas de tenecteplasa

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD.

DOMICILIO Pune 411057, INDIA

74. APODERADO German Marín Ruales

22. BOGOTÁ, D.C., 5 de julio de 2013



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Reservado para el adhesivo de radicación

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-159374- -00000-0000

Fecha: 2013-07-05 13:04:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREATIVIDADES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/IN2011/000863	Fecha: 16 diciembre 2011
Publicación Internacional No.		WO/2012/085933	Fecha: 28 junio 2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIONES FARMACEUTICAS DE TENECTEPLASA			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 38/16, A61K 9/16, A61P 9/10			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		No. TELÉFONO	
P-1, IT-BT Park, MIDC Phase-2, Hinjwadi			
CIUDAD		CORREO ELECTRÓNICO	
Pune - 411057		marinsantacruz@marinsantacruz.com	
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
		India	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. MISHRA		Maheshwari Kumar	Indio
2. BHANDARI		Pritiranjana	Indio
3. SINGH		Sanjay	Indio
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. India		Pune - 411057	GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD., P-1, IT-BT Park, MIDC Phase-2, Hinjwadi
2. India		Pune - 411057	GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD., P-1, IT-BT Park, MIDC Phase-2, Hinjwadi
3. India		Pune - 411057	GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD., P-1, IT-BT Park, MIDC Phase-2, Hinjwadi
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
MARIN RUALES		Germán	C.C. 79.155.665 T.P. 64.239
DIRECCIÓN		No. TELÉFONO	
Carrera 13 A No. 89-38 Oficina 328		6 163199	
CIUDAD		CORREO ELECTRÓNICO	
Bogotá D.C.		marinsantacruz@marinsantacruz.com	
PAÍS		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	
Colombia			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1. INDIA		IN	3516/MUM/2010
			(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
			2010/12/23

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-0063670 y 13-0063671	Fecha 27 junio 2013
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
 GERMÁN MARIN RUALES Apoderado			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 3 a 15		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° de Reivindicaciones: 15		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☐ Dibujos y/o figuras N° folios: 18 a 21		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen:		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medinas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☒ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0063670
		Bogotá D.C., Junio 27 de 2013 - 13:07:47

RECIBIDO DE : MARIN SANTACRUZ & ASOCIADOS					NI 900.343.639
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	4776	17/01/2013		750.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
=====				

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-159374- -00000-0000
Fecha: 2013-07-05 13:04:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

4

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0063671
		Bogotá D.C., Junio 27 de 2013 - 13:07:47

RECIBIDO DE : MARIN SANTACRUZ & ASOCIADOS					NI 900.343.639	
*** Soporte del Pago ***						
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO	
RECIBO DE CA	999999999	4776	17/01/2013		750.000.00	

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
5	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	150.000.00
				\$150.000.00
=====				

SON: **CIENTO CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-159374- -00000-0000

Fecha: 2013-07-05 13:04:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



No. 13-159374- -00000-0000

Fecha: 2013-07-05 13:04:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PATENTE DE INVENCION ☐

MODEL C

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

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

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

		Espacio reservado para el adhesivo de radicación	
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT			
1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo I ☐ Capítulo II	
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/IN2011/000863	Fecha 16 de diciembre de 2011
Publicación Internacional No.		WO/2012/085933	Fecha 28 de junio de 2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIONES FARMACEUTICAS DE TENECTEPLASA			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 38/16, A61K 9/16, A61P 9/10			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
1.	GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD.		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		P-1 , IT-BT Park MIDC Phase-2, Hinjwadi,	
CIUDAD		Pune - 411057	
DEPARTAMENTO/ESTADO			
PAÍS DE RESIDENCIA		India	
No. TELÉFONO			
CORREO ELECTRÓNICO:		marinsantacruz@marinsantacruz.com	
NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN		India	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	SINGH,	Sanjay	Indio
2.	MISHRA,	Maheshwari Kumar	Indio
3.	BHANDARI,	Pritiranjana	Indio
4.			
5.			
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
1.	India		Pune - 411057
2.	India		Pune - 411057
3.	India		Pune - 411057
4.			
5.			
DIRECCIÓN			
P-1 , IT-BT Park MIDC Phase-2, Hinjwadi			
P-1 , IT-BT Park MIDC Phase-2, Hinjwadi			
P-1 , IT-BT Park MIDC Phase-2, Hinjwadi			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
			C.C . T.P .
DIRECCIÓN		Carrera 13 A No. 89-38 oficina 328	
CIUDAD		Bogotá, D.C.	
PAÍS		Colombia	
No. TELÉFONO		6 163199	
CORREO ELECTRÓNICO		marinsantacruz@marinsantacruz.com	
No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL			

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
1. 2. 3.	(33) PAÍS DE ORIGEN India	CÓDIGO PAÍS IN	(31) NÚMERO 3516/MUM/2010
	(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2010/12/23		
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13- 63670 y 13- 63671	Fecha 27 de junio de 2013
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
German Marin Ruales Apoderado			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: folios 3. ☐ Dibujos y/o figuras N° folios: a 4. ☒ Resumen. Folio 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. Folio 8. ☒ Anexo formato digital.		Documentación Jurídica 9. ☒ Poderes, si fuera el caso. 10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medinas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☒ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

Esta invención se relaciona con los compuestos farmacéuticos de un derivado del activador tisular del plasminógeno humano conocido como tenecteplasa (TNK) para el tratamiento del bloqueo de las arterias cerebrales que causa apoplejías de tipos importantes o menores tales como el accidente cerebrovascular isquémico agudo (ACVIA). La invención también se relaciona a las formulaciones que tienen una eficacia y seguridad óptimas comparadas con los agentes conocidos de terapias según están identificados en pruebas clínicas de las composiciones mencionadas con cantidades específicas de TNK como el ingrediente activo.

Antecedentes de la invención

El Activador Tisular del Plasminógeno (TPA) está involucrado en la disolución de coágulos sanguíneos no específicos en el sistema circulatorio. La TNK es un derivado del TPA en la que siete aminoácidos de la secuencia nativa son modificados de manera que la nueva molécula cambió su especificidad a la proteína de la fibrina y cambiaron las propiedades farmacocinéticas, lo que tiene como consecuencia efectos farmacocinéticos cambiados. La TNK es una glicoproteína de 527 aminoácidos con un peso molecular de 70 KDa. Fue aprobada para su uso en los productos medicinales para el tratamiento del infarto agudo al miocardio y demás trombosis y embolias relacionadas con la ruptura de vasos sanguíneos en diferentes órganos. Recientemente, fue considerada para el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico agudo y varias pruebas clínicas fueron efectuadas para esta indicación, pero estas pruebas no dieron evidencia concluyente sobre la dosis segura y efectiva de la TNK para el ACVIA.

Los activadores de plasminógenos son enzimas que activan el plasminógeno con el fin de generar la proteasa serina plasmina que a su vez, degrada la fibrina. Entre los activadores de plasminógenos usados como medicamentos están: a) la estreptoquinasa [una proteína bacteriana], b) la uroquinasa [una enzima sintetizada en los riñones], y c) activador tisular del plasminógeno humano [una enzima producida por el endotelio vascular]. También hay otras enzimas en desarrollo que son candidatas potenciales como medicamentos fibrinolíticos. Los mecanismos de acción de estos activadores difieren: la estreptoquinasa forma un complejo con el plasminógeno, lo que genera actividad en la plasmina, la uroquinasa rompe directamente el plasminógeno, y el TPA forma un complejo ternario con fibrina y plasminógeno, lo que conduce a la activación del plasminógeno y a la disolución del coágulo en el lugar. El TPA humano natural tiene una vida media en plasma típicamente de 8 a 10 minutos. Sin embargo, se deseó aumentar la vida media para que la terapia fibrinolítica se administre efectivamente en un periodo corto de tiempo, con más resultados de eficacia benéfica. Por lo tanto, fueron creados y probados varios mutantes de aminoácidos y de eliminación para las características mejoradas comparado con el TPA. La TNK tiene seis mutaciones que duplicaron la vida media [de 20 a 24 minutos] comparada con el tPA y tiene mejores características, tales como una especificidad más elevada a los

coágulos de fibrina con una afinidad concurrente menor para el inhibidor-1 del activador del plasminógeno.

La TNK fue develada por primera vez en US5385732 en donde fue producida por tecnología recombinante de ADN usando una línea establecida de células mamíferas. Varias patentes más cubren aspectos diferentes de la producción y uso de la TNK, a saber, US5728567, US5714145, US5366886, US5094953, US 5407819 y US 6506598. La US5407819 revela un método de preparación de una variante del TPA por desplazamiento de un aminoácido particular en la secuencia del aminoácido. La US5612029 revela una variante del TPA, la cual es glicosilada en cualquier posición en 103-105 y desprovista de una estructura funcional de carbohidratos en la posición 117 de la secuencia humana del TPA de tipo salvaje. La US5520911 revela la preparación de secuencias de ADN para codificar la variante del TPA. La US5424198 revela un método para la producción de TPA al transformar las células con genes DHFR mutantes o de tipo salvaje en combinación con los genes tPA. Éstos y varios otros documentos también cubren varias condiciones o indicaciones médicas en las que la TNK se puede usar como medicamento para el tratamiento relacionado con la formación de coágulos. Una de las condiciones cubiertas por la US20080107641 es el ACVIA . Sin embargo, esta solicitud no revela un método para identificar una dosis segura y efectiva de TNK para el tratamiento del ACVIA en pacientes humanos. En vez de eso, predice el uso de una dosis segura con base en modelos teóricos de matrices de datos existentes sin dar un método específico para probar y calificar las dosis efectivas identificadas. Por lo tanto, el arte previo actual no atiende la necesidad no satisfecha de identificar las dosis seguras y efectivas de TNK para el tratamiento del ACVIA , ni las composiciones farmacéuticas efectivas (fórmulaciones) para el tratamiento del ACVIA . La presente invención atiende la necesidad arriba mencionada y brinda fórmulaciones mejores y más efectivas de la TNK para el tratamiento del ACVIA en pacientes humanos, que son seguras y fáciles de administrar en un periodo corto de tiempo.

Hay algunos estudios que mencionan el uso de la TNK para el tratamiento del ACVIA , sin embargo, no revelan la formulación de la TNK con las cantidades de TNK que sean seguras y efectivas como aquí se revela con respecto a sus efectos secundarios. Además, la TNK usada para la preparación de fórmulaciones se prepara con la nueva tecnología del sistema de fermentación basado en la perfusión que no se había usado anteriormente para preparar la proteína TNK.

Se conocen varias fórmulaciones que usan la TNK para el tratamiento del ACVIA . Sin embargo, hasta ahora, ninguna ha sido aprobada por algún organismo regulador de medicamentos que sea segura y eficaz cuando se prueba en un análisis de riesgo-beneficio. Tras identificar este vacío, algunas fórmulas de TNK se revelan en este documento que tienen las propiedades deseadas y requeridas de un medicamento seguro y efectivo para el tratamiento del ACVIA . Algunos aspectos del método usado en el presente documento para la preparación de la TNK de alta

pureza se conocen con anterioridad. Sin embargo, se usan varios elementos nuevos que no se conocen para la producción, preparación, selección, pruebas y la calificación clínica especial de las fórmulas de TNK para el tratamiento del ACVIA.

Objetos de la invención

El objeto principal del invento es identificar la cantidad segura y efectiva de TNK para el tratamiento del ACVIA en pacientes humanos. Otro objeto del invento es desarrollar las formulaciones de TNK que sean seguras y efectivas en el tratamiento del ACVIA en pacientes humanos. Otro objeto más del invento es realizar pruebas clínicas para identificar la cantidad de TNK que sea segura y efectiva para el tratamiento del ACVIA. Incluso otro objeto más del invento es usar la tecnología de fermentación basada en la perfusión para la producción de TNK recombinante usada para lograr los objetivos anteriores.

Resumen

La producción de TNK se hizo por medio de tecnología de ADN recombinante en las células del ovario del hámster chino (OHC) en un sistema de fermentación continua basada en la perfusión. Este método brinda una producción a gran escala de la proteína con calidad y cantidad mayores, además de ser escalable para aplicaciones industriales. La línea de células recombinantes que producen TNK como una proteína secretada fue preparada y seleccionada para la naturaleza deseada de la TNK, y usada para las formulaciones de TNK para el tratamiento del ACVIA en pacientes humanos. Estas formulaciones que tienen cantidades diferentes de TNK fueron probadas en un ambiente clínico para identificar la cantidad segura y efectiva de TNK que se requiere para el tratamiento óptimo del ACVIA en pacientes humanos. Los datos de la prueba clínica que dieron la cantidad de TNK que es segura y eficaz para el tratamiento del ACVIA se dan a conocer en la intervención. Y la TNK se prepara por medio del sistema de fermentación continua basado en la perfusión. En la primera parte, las líneas de células mamíferas (OHC) se prepararon con técnicas moleculares y biológicas. Estas líneas de células fueron luego filtradas por el nivel de expresión de la TNK secretada y una línea de células de alta expresión de TNK fue aislada para un proceso posterior de desarrollo para la producción de TNK de grado farmacéutico. En la segunda parte, las células productoras de TNK se cultivaron en un sistema de fermentación continua basado en perfusión para la producción a gran escala de la TNK y el material utilizado y recogido se almacenó para su procesamiento posterior. En la tercera parte, la recolección se sometió a pasos cromatográficos para obtener una TNK altamente pura y potente para ser el ingrediente activo para la preparación posterior de formulaciones para aplicaciones clínicas. En la cuarta parte, un grupo de formulaciones de TNK fueron preparadas y estudiadas para varios parámetros, tales como estabilidad, potencia y otras propiedades farmacológicas en bioensayos. En la quinta parte, las

fórmulaciones de TNK preparadas fueron examinadas en pruebas clínicas para identificar la cantidad segura y efectiva de TNK requerida para el tratamiento del ACVIA en pacientes afectados bajo ciertas condiciones. Estos estudios identificaron un juego de parámetros requerido para el uso seguro y efectivo de la TNK para el tratamiento del ACVIA en la forma de fórmulaciones inyectables.

Descripción detallada

El experto en medicina y farmacología sabe que, para poder obtener compuestos farmacéuticos seguros y efectivos, es una buena estrategia desarrollar varias fórmulaciones de la potencia del ingrediente activo con excipientes diferentes y probarlas en las condiciones deseadas con el fin de identificar una dosis segura y efectiva de un nuevo medicamento para una indicación específica. El papel de los excipientes es importante, pues brindan características adicionales, tales como estabilidad, facilidad de administración, volumen, etc. El objeto principal de este invento es desarrollar una preparación mejorada de TNK para usarse como composición farmacéutica para el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico agudo en pacientes humanos que sea seguro y eficaz a comparación con las fórmulaciones conocidas. Otro objeto de este invento se relaciona con el uso de pruebas clínicas con cantidades específicas de TNK para determinar la cantidad segura y efectiva de TNK en el tratamiento del ACVIA. Además, hay una falta de entendimiento respecto a los muchos aspectos de la tecnología de ADN recombinante, desarrollo de procesos y producción que afecta la productividad y características de los productos finales. Por lo tanto, hay una necesidad de nuevos métodos de preparación de productos con tecnología rADN que sean mejores que los métodos y tecnologías existentes. El objeto de este invento es desarrollar composiciones/fórmulaciones seguras y efectivas para el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico agudo en los humanos, en el que la TNK se produce a partir de una línea de células OHC desarrollada de nuevo y usada en un sistema de fermentación continua basado en la perfusión para la producción a gran escala de TNK.

En la primera parte, se preparó la línea de células OHC que expresan TNK como una proteína secretada a un nivel más alto. La biología molecular, bioquímica y las técnicas analíticas usadas son estándar en el arte y se han utilizado rutinariamente. El plásmido de expresión mamífero usado para la creación de la línea de células de expresión contenía un promotor/amplificador de CMV antes de un gen artificial de TNK seguido por una cola de poli-A SV40 para la terminación de la transcripción. El mismo plásmido también contenía un gen DHFR bajo el control del promotor de SV40, y finalizaba con una cola poli-A SV40. Este plásmido fue transfectado a las células negativas del OHC por el gen DHFR nativo (línea de células OHC-DHFR). Una línea de células con niveles más altos de expresión TNK fue aislada y utilizada posteriormente [Ejemplos 1 y 2].

En la segunda parte, las células OHC con expresión TNK se usaron para la preparación a gran escala de la TNK en un sistema de fermentación continua basado en perfusión.

Aproximadamente $6-12 \times 10^9$ células fueron inmovilizadas en el núcleo del reactor del biorreactor de perfusión. A estas células se les permitió crecer en un medio IMDM con FBS

durante unos cuantos días hasta que se desarrolló la masa requerida de células bajo una concentración constante de glucosa de unos 1-2 gm/L en modo quemostático. Durante la fase de producción, el medio se cambió a OHC-S-SFM II sin FBS, y la fermentación continuó durante varios meses bajo condiciones de alimentación con glucosa, mientras que una cierta concentración de producto crudo de TNK se fabricaba en el medio cultivado para procesamiento posteriores. El medio de cultivo fue recogido en contenedores estériles y almacenado a 4° C hasta su uso en pasos de purificación subsecuentes [Ejemplos 3, 5 y 7].

En la tercera parte, el medio cultivado que contenía TNK cruda fue sujeto a un juego de pasos cromatográficos en serie. Esto incluyó un paso de captura de afinidad con tinte, seguido por un paso de purificación de afinidad con la lisina, y un paso final de pulido con intercambio de iones. La Tabla A muestra los diferentes pasos de la purificación cromatográfica que condujeron a un aumento en la cantidad de proteína purificada según se determina por densitometría SDS-PAGE/CETAR (Cromatografía de Exclusión de Tamaño de Alto Rendimiento). Antes de someter el caldo cultivado al proceso de purificación, contenía aproximadamente un 80% de proteína TNK. Al final del último paso de cromatografía de intercambio iónico (CII), la pureza de la proteína fue de al menos 95%. Los tipos de resinas usados para los pasos de afinidad, intercambio iónico y de filtración de gel que se usaron en el método descrito aquí se pueden reemplazar con otras resinas de características similares. Los métodos de purificación descritos aquí son ejemplos de la estrategia de purificación usada para la preparación de TNK para el tratamiento del ACVIA, y no están limitados por el uso de los tipos de resinas cromatográficas reveladas, pues se pueden usar otros medios similares de separación de manera igualmente efectiva. La TNK en bruto fue almacenada en una concentración de aproximadamente 5 mg/mL a -80° C [Ejemplos 4, 5 y 7].

Tabla A: Aumento en la pureza de la TNK

Etapas de Cromatografía	Cantidad de TNK /ML	% de Pureza de la TNK
Cosecha	10 µg	~80%
DAC-1	0,5 mg	~90%
LAC-2	2 mg	~92%
IEC-3.	5 mg	>95%

En la cuarta parte, se prepararon varias fórmulaciones de la solución de TNK en bruto en el rango de 0,10 a 0,24 mg/mL por cada frasco de 10mL en forma liofilizada. En un tipo de las fórmulaciones, la proporción de los componentes fue de 1 parte de TNK, 11 partes de L-arginina, 3,4 partes de ácido fosfórico y 0,086 partes de polisorbato -20 como polvo liofilizado.

Estas formulaciones fueron sometidas a las pruebas de rutina y se usaron en la evaluación clínica de la TNK para el tratamiento del ACVIA [Ejemplo 6].

En la quinta parte, se evaluaron las pruebas clínicas y la eficacia de las formulaciones de TNK para el tratamiento del ACVIA en un estudio multicéntrico abierto que involucró alrededor de 35 pacientes afectados. De los datos obtenidos en este estudio, se obtuvo la cantidad segura y efectiva de TNK requerida para el tratamiento del ACVIA [Ejemplo 8].

El invento detallado arriba se ilustra con los siguientes ejemplos para el propósito de mostrar la utilidad del invento. Las modalidades a continuación no restringen el invento de ninguna forma para aplicaciones con más alcance para la preparación de composiciones/formulaciones de proteínas similares a la TNK. La enseñanza de esta invención también se puede usar en la preparación de las proteínas que son análogas al tPA. Las figuras son ilustrativas y no limitan una aplicación más amplia del invento referente a la calidad y pureza de la proteína preparada y formulada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gramo SDS-PAGE reducido teñido de plata de contenido TNK en fracciones purificadas - 1) marcador de peso molecular (desde abajo: 21, 31, 45, 66 y 96 kDa); 2) caldo cultivado; 3) E-1 después del DAC; 4) E-2 después del LAC; 5) E-3 después del IEC, y 6) muestra estándar.

Figura 2: Gramo SDS-PAGE no reducido teñido de plata de contenido TNK en fracciones purificadas - 1) marcador de peso molecular (desde abajo: 21, 31, 45, 66 y 96 kDa); 2) caldo cultivado; 3) E-1 después del DAC; 4) E-2 después del LAC; 5) E-3 después del IEC, y 6) muestra estándar.

Figura 3: Una gráfica CETAR ilustrativa de TNK no reducida después del último paso cromatográfico: el péptido de TNK (tiempo de retención: 26,653 minutos) tiene una pureza mayor al 99%.

Figura 4: Una gráfica CETAR ilustrativa de TNK reducida después del último paso cromatográfico: péptido de TNK, cadena sencilla (tiempo de retención: 25,093 minutos), y péptido de TNK, cadena doble (tiempo de retención: 29,247 minutos).

Figura 5: Una curva estándar ilustrativa de las mediciones de la bioactividad de la TNK.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Métodos biológicos moleculares, bioquímicos y analíticos.

Los métodos generales biológicos moleculares, bioquímicos y analíticos usados durante los procedimientos son conocidos en el ramo. Las técnicas rutinarias se pueden anticipar y no se describen, pues están disponibles en la literatura pública. Las cepas usadas como células bacterianas huésped fueron derivadas de *E. Coli* K-12 y los plásmidos y elementos del ADN usados para la preparación de los vectores de expresión fueron sustraídos de plásmidos disponibles comúnmente o fueron diseñados y sintetizados en el laboratorio e integrados para crear los elementos requeridos. La secuencia de péptidos usada para la preparación del gen artificial de TNK es la secuencia tPA nativa humana que tiene los cambios en aminoácidos como: Thr103Asn, Asn117Gln, Lys296Ala, His297Ala, Age298Ala y Age299Ala

/MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSQEIHARFRRGARSYQVICRDEKTQMIYQQHQSWLRPVLRSNRVEYC
 WCNSGRAQCHSVPVKSCSEPRCFNGGTCQQALYFSDFCQCPEGFAGKCCEIDTRATCYEDQGGSYRGTWS
 TAESGAECTNWNSSALAQPKPYSGRRPDAILRLGLGNHNYCRNPDRDSKPWCYVFKAGKYSSEFCSTPACSEG
 NSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMILIGNVYTAQNPSAQUALGLGKHNYCRNPDGDAKPWCHVL
 KNRRRLTWEYCDVPSCSTCGLRQYSQPQFRIKGGFLFADIASHPWQAAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWILSA
 AHCFQERFPPHHLTVILGRYRVVPGEEEQKFEVEKYIVHKEFDDDDTYDNDIALQLKSDSSRCAQESSVVRTV
 CLPPADLQLPDWTECELSGYGKHEALSPFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLLNRTVTDNMLCAGDTRSGGP
 QAN LHDACQGDSGGPLVCLNDGRMTLVGIISWGLGCGQKDVPGVYTKVTNYLDWIRDNMNP].

Todos los elementos sintéticos subsecuentes del ADN estuvieron basados en esta secuencia e integrados en la clonación y en los vectores de expresión mamífera usando métodos estándar. Para confirmar la identidad e integridad de estos elementos, se efectuó la secuenciación del ADN y las secuencias fueron curadas manualmente.

Ejemplo 2: Preparación de una línea de células mamíferas para la expresión de la TNK.

Se sintetizó artificialmente una secuencia artificial de ADN de la TNK del gen humano tPA con las seis mutaciones de arriba. Esta secuencia fue clonada en un vector de plásmido que tiene los elementos para una sobre-expresión eficiente de la proteína en las células del ovario del hámster chino (OHC) como una proteína secretada en el medio. En el vector, el elemento promotor/amplificador del CMV fue seguido por el gen artificial de TNK seguido por un elemento de terminación de la transcripción poli-A SV40. El mismo plásmido también expresó el gen DHFR controlado por el promotor temprano SV40 y por el terminador SV 40 poliA como un cistrón separado. El gen DHFR también fue usado como un marcador de expresión en las células OHC recombinadas para la detección de células positivas de TNK. El vector fue transfectado en la línea de células OHC negativas (DUKxB11) para dihidrofolato reductasa (DHFR) y se aislaron clones estables genómicamente integrados con una expresión robusta de TNK secretada. Los niveles de expresión de la TNK en varios clones seleccionados fueron

probados con análisis Western blot y SDS-PAGE, seguidos de métodos cuantitativos RT-PCR para establecer las líneas de células con una expresión estable y robusta de la proteína. Se usó una línea de células con una buena productividad de TNK para crear el banco maestro de células, desde el cual se preparó un banco de células de trabajo y se utilizó en los procesos de fermentación por perfusión a gran escala. La TNK secretada por cada clon fue probada para verificar la integridad y calidad de la proteína; también se hicieron pruebas para determinar las actividades enzimáticas asociadas con esta proteína según los estándares de la farmacopea para aplicaciones médicas.

Ejemplo 3: Sobre-expresión de la TNK en las células OHC.

Se expresó la secuencia del aminoácido de la TNK bajo el control de un sistema de expresión constitutiva del promotor/amplificador del CMV en las células OHC. Aquí se empleó una tecnología de fermentación continua llamada biorreactor de perfusión para la producción a gran escala de la proteína. Las células OHC productoras de TNK se cultivaron en el medio IMDM [INVITROGEN] con suero fetal bovino (SFB). De un cultivo de aproximadamente 1×10^6 células recombinantes, se logró una cantidad final de cerca de $6-12 \times 10^9$ células con amplificación serial de las células en frascos con cultivo de tejidos y en botellas de cultivo rotatorias en un periodo de varios días. Las condiciones del cultivo que se mantuvieron en todos los pasos durante la generación en masa de las células fueron: temperatura: $36,5^\circ \text{C}$, CO_2 : 5% y SFB: 10%. La confluencia de la célula se mantuvo en $>90\%$ del área de la superficie de crecimiento en los frascos y en las botellas en todos los pasos antes de cosechar las células para el siguiente paso. Se efectuaron pruebas microscópicas y bioquímicas periódicamente para detectar la salud e integridad de las células cultivadas. Luego, ellas fueron retiradas con un tratamiento de tripsina leve para su transferencia al biorreactor, que estaba equipado con sondas pH y DO y el medio para soportar las células en el núcleo del reactor para mantener la célula en el reactor. El reactor 5-L esterilizado fue inoculado con $6-12 \times 10^9$ células y se le permitió funcionar durante 3-4 días a una concentración de glucosa de aproximadamente 1-2 gm/L. Este proceso condujo al asentamiento de las células en el reactor en condiciones sanas. Los parámetros del reactor fueron: temperatura: $36,6^\circ \text{C}$, ventilación: 1,0 L/min, pH: entre 7,2-7,4 [mantenido usando CO_2 y una solución saturada de bicarbonato de sodio], agitación: 100 rpm, oxígeno disuelto: 30%. Una vez que las células se colocaron en la matriz de soporte, el medio se cambió de IMDM con SFB a OHC-S-SFM II [INVITROGEN] sin SFB. Este medio fue usado durante la etapa de producción. Al principio de la fase del biorreactor, aproximadamente 100L del medio inicial fueron cosechados y desechados. A partir de ahí, la temperatura del reactor se mantuvo en $33,5^\circ \text{C}$ durante la fase de producción y se obtuvieron cada día unos 100L de la cosecha al tiempo que se mantenía el nivel de glucosa del reactor entre 0,3 y 1,5 gm/L. En estas condiciones, el biorreactor de perfusión puede funcionar para recoger hasta 10,000 L de la cosecha en un periodo de 3 a 4 meses. Los lotes de caldo cosechado fueron filtrados a

través de filtros de 0,45 μm , recogidos en contenedores estériles y almacenados a de 2 a 8°C hasta su proceso posterior. Las piscinas de caldo cosechado fueron probadas periódicamente para verificar su contenido de TNK y su esterilidad con los métodos establecidos [Figuras 1 y 2].

Ejemplo 4. Purificación de la TNK.

Los lotes de caldo cosechado fueron probados para verificar su contenido de TNK, su integridad y su esterilidad [Figuras 1 y 2]. En un lote sencillo de 1000-L para purificación, se usó una serie de pasos de cromatografía. En el primer paso, un lote de aproximadamente 1000 L de caldo cosechado con contenido de TNK de aproximadamente 10 mg/L fue cargado en una columna de sistema de cromatografía rápida líquida (CRL) (300 mm X 500 mm) con 11 L de resina activada de afinidad al tinte (resina Blue Sepharose 6 FF; GE Healthcare). La columna fue equilibrada con un amortiguador de equilibrio-1 (EB-1, fosfato de sodio: 20 mM, NaCl: 0,15 M, pH 7,2) al pasar 2 columnas de volumen (CVs) a una tasa de flujo de unos 100 a 150 cm/h. La cosecha fue cargada en la columna con una tasa lineal de flujo de unos 100 a 150 cm/h, seguida por el paso de EB-1 de 2 CVs a una tasa de flujo de aproximadamente 100 cm/h. Esto fue seguido por 2-3 CVs del amortiguador de lavado (WB-1, fosfato de sodio: 20 mM, NaCl: 2 M, pH 7,2) a una tasa de flujo de 100 a 150 cm/h. La proteína unida objeto fue eluida al pasar aproximadamente 4 CVs de amortiguador-1 de elución, (EUB-1, fosfato de sodio: 20 mM, NaCl: 1 M, urea: 3 M, pH 7,2) y recogida basada en la absorción a 280 nm. El eluido (E-1) fue analizado para verificar la cantidad y pureza de la proteína por medio de electroforesis SDS-PAGE. En este paso, el contenido de TNK en la proteína total es de aproximadamente 90%. En el segundo paso, el amortiguador se intercambió usando la cromatografía de filtración de gel. El E-1 fue cargado en una columna (300 mm X 750 mm) con 25 L de resina de filtración de gel (Sephadex G-25). La columna después fue lavada con 2 CVs del amortiguador de intercambio (fosfato de sodio: 20 mM, pH 7,2) con una tasa lineal de flujo de aproximadamente 100 a 150 cm/h, y el eluido (E-2) fue recogido en un contenedor estéril. En el tercer paso, el E-2 fue cargado en una columna (200 mm X 500 mm) con 4,5 L de resina activada con afinidad a la L-lisina (resina Lysine HyperD; Pall Corp.). Luego, la columna fue equilibrada con amortiguador-2 de equilibrio (EB-2, fosfato de sodio: 20 mM, polisorbato-20: 0,043%, pH 7,2) al pasar 2 volúmenes de columna (CVs) a una tasa de flujo de unos 100 a 150 cm/h, seguido de pasar 2 CVs de WB-2 (fosfato de sodio: 20 mM, NaCl: 1 M, polisorbato-20: 0,043%, pH 7,2) a una tasa de flujo de unos 100 cm/h. La proteína unida objeto fue eluida al pasar 2 CVs de amortiguador-2 de elución (EUB-2, arginina: 0,5 M, AEAC (ácido épsilon aminocaproico) : 0,2 M, polisorbato-20: 0,043%, pH 7,8 ajustado por el ácido fosfórico) y recogida con base en la absorbancia a 280 nm. El eluido (E-3) fue analizado para verificar la cantidad y pureza de la proteína por medio de electroforesis SDS-PAGE [Figuras 1 y 2]. En este paso, el contenido de TNK de las proteínas totales es de más del 95%. Esto fue seguido por un intercambio de amortiguadores por medio de GFC a un amortiguador de almacenaje a granel (L-arginina: 55 g/L, ácido fosfórico: 17 g/L, polisorbato-20: 430 mg/L. pH 7,6 $\pm$ 0,2). La concentración

final de TNK en la solución fue de unos 2 mg/L, y la solución se almacenó congelada hasta su uso. Esta solución de TNK fue concentrada posteriormente con una resina intercambiadora de aniones (resina Capto Q, GE Healthcare) a 5 mg/mL antes de la preparación de las formulaciones.

Ejemplo 5: Ensayos analíticos

Durante los procesos de producción y purificación, se determinó el contenido de TNK en muestras dentro del proceso por medio de métodos SDS-PAGE estándares de reducción y de no reducción [Figuras 1 y 2]. Se prepararon geles SDS-PAGE al 10% y 50 µg de la proteína ejemplo se cargaron en cada pozo. Para la determinación del contenido de cadena sencilla y del monómero, se usaron métodos reductores y no reductores de CETAR [cromatografía de exclusión de tamaño de alto rendimiento], respectivamente. Las columnas usadas para los métodos CETAR fueron la cromatografía de columna de exclusión de tamaño basada en sílice para el rango de separación de moléculas de 10 a 500 kDa [Figuras 4 y 5]. Se realizaron muestras estándar y muestras de prueba bajo condiciones de análisis idénticas. También se efectuaron ensayos periódicos de bioactividad en el proceso para vigilar la cantidad e integridad de la proteína.

Ejemplo 6: Fórmulas de la TNK.

Las diversas formulaciones de TNK fueron preparadas para probar la seguridad y eficacia de la TNK en el tratamiento del ACVIA. Las formulaciones fueron basadas en las proporciones de 1 parte de TNK, 11 partes de L-arginina, 3,4 partes de ácido fosfórico y 0,086 partes de polisorbato-20 como productos liofilizados. La concentración de la solución de TNK usada para esta preparación fue de 5 mg/mL de TNK. Tras mezclar los componentes sin precipitar la TNK en la solución, las formulaciones se secaron congelándolas para estabilizar las formas polvosas. Se preparó un juego de formulaciones liofilizadas con una potencia de TNK variando desde 0,10; 0,14; 0,18; 0,20 y 0,24 TNK por mL por frasco de 10mL cuando se reconstituye con 10 mL de agua para su inyección, y fue almacenado a unos 4°C hasta su uso posterior. Estas formulaciones de prueba fueron sometidas a diferentes pruebas y estudios de estabilidad, y se encontró que son comparables en contenido y estabilidad durante un periodo de un año. Las formulaciones liofilizadas, cuando fueron reconstituidas con 10 mL de agua estéril para su inyección, dieron la cantidad arriba mencionada de TNK por mL en soluciones claras para su uso en pruebas clínicas.

Ejemplo 7. Bioensayo de TNK.

La potencia biológica de la TNK en volumen y formulada fue determinada por un ensayo rápido turbidimétrico de coágulo-lisis desarrollado a partir de un protocolo de monografía de farmacopea europea para la alteplasa. En una placa transparente multi-pozo de 1,5 mL, se tomaron y mezclaron soluciones de 20 µg de plasminógeno humano (1 mg/mL) y 1 mL de fibrinógeno humano (2 mg/mL), y se mantuvieron a 0°C. En una placa multi-pozode 1,5 mL

separada, se prepararon y mezclaron 0,5 mL de trombina humana (33 IU/mL) y 0,5 mL de TNK de prueba o referencia (1 mg/mL de proteínas totales), y se sometieron a una temperatura de 37° C. Todas las diluciones se prepararon con el amortiguador solvente según se reveló. Se agregaron 200 µL de mezclas de referencia/prueba a las mezclas de plasminógeno/fibrinógeno y se incubaron a 37°C. Después de una formación visiblemente turbia de coágulos en unos 30 segundos, subsecuentemente se formaron burbujas en los tubos a medida que procedía la lisis de coágulo. Se registraron los tiempos en que se agregaron las mezclas de trombina y cuando la última burbuja subió en el tubo, lo que dio los tiempos de lisis de coágulo en segundos. Se determinaron los tiempos de lisis de coágulo de las muestras de TNK de prueba y referencia, y la prueba de bioactividad del lote de TNK se calculó en unidades internacionales (IU) por mL para el lote usado en este ejemplo, según el protocolo de la EP. La Figura 5 muestra una curva estándar ilustrativa de las mediciones de la bioactividad de la TNK. La bioactividad del lote usado aquí fue de 203 IU/mg. Las tablas B y C muestran las cifras de las muestras de referencia y de prueba de TNK obtenidas en el ensayo de bioactividad de coágulo-lisis.

Tabla B: Bioensayo de TNK: muestras de referencia

Estándar No.	Concentración de proteína (ng/mL) del estándar de referencia	Tiempo (en segundos) de la coágulo-lisis para el estándar [promedio de 2]
1	100	4078,29
2	200	2978,02
3	400	2139,05
4	800	1529,98
5	1600	1086,62

Tabla C: Bioensayo de TNK: muestras de prueba

No. de la muestra de prueba	Concentración de proteína (ng/mL) de la muestra de prueba	Tiempo (en segundos) de la coágulo-lisis para la muestra [promedio de 2]	Cantidad calculada de TNK en la muestra (ng/mL) usando la curva estándar
1	100	3930,16	96,4
2	200	2970,70	199,5
3	400	2135,70	399,4
4	800	1538,90	804,7
5	1600	1091,50	1607,2

Ejemplo 8: Pruebas y eficacia de las formulaciones de TNK.

Las pruebas clínicas de las formulaciones de TNK para el ACVIA se realizaron con los métodos establecidos en la medicina clínica. En una prueba clínica multicéntrica abierta sobre la eficacia y seguridad de la TNK en el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico agudo (ACVIA) en pacientes reportando a 4,5 horas de su inicio, se usaron dos dosis de TNK - bolo de 0,1 mg/kg IV (inyección intravenosa) y bolo de 0,2 mg/kg IV en un horario aleatorio. La TNK se inyectó como bolo IV tras confirmación de que no había hemorragia intracerebral por medio de tomografías computarizadas en un periodo de 5 a 10 segundos. La dosis de 0,1 mg/kg IV fue recibida por 14 pacientes y la dosis de 0,2 mg/kg IV fue recibida por 21 pacientes. Se consideró la escala del NIH-SS (Escala de Ataques del Instituto Nacional de la Salud, por sus siglas en inglés) como el parámetro principal de eficacia. En ambos grupos hubo una mejoría estadísticamente importante en la calificación media del NIH-SS en un plazo inmediato de 24 horas (Tablas 1 a 3). Esta mejoría se mantuvo a los 7 días de la evaluación. La mejoría de las calificaciones del NIH-SS de ≥ 4 fue considerada como una mejoría clínicamente importante (Tabla 2). El grupo de 0,2 mg/kg mostró una incidencia más alta de eficacia en este parámetro a las 24 horas (80,95%), que aumentó a 95,24% en el día 7. Aunque no hubo diferencias estadísticamente importantes entre los dos grupos de dosis, estos datos sugirieron que es preferible la dosis de 0,2 mg/kg. Usando el criterio más estricto de mejoría de la calificación NIH-SS de > 8 (Tabla 3), el grupo de 0,2 mg/kg mostró un aumento estadísticamente importante en la incidencia de mejoría en el día 7 ($p=0,015$), que confirmó que la dosis de 0,2 mg/kg es preferible. La eficacia de la TNK a 0,2 mg/kg IV para una calificación NIH-SS > 4 fue vista en el 80,95% de los pacientes comparada con el 49,51% en el estudio JACT [Stroke 2006; 37(7): 1810-5] con alteplasa a 0,6 mg/kg IV ($p=0,0087$), y 46,52% en el estudio NINDS [NEJM 1995; 333(24): 1581-87] con alteplasa a 0,9 mg/kg IV ($p=0,0043$), y 65,5% en un estudio de la India [Ann Indian Acad Neurol 2008; 11: 221-4] con alteplasa a 0,9 mg/kg IV ($p=0,0172$). Estos datos mostraron que la dosis de 0,2 mg/kg IV de TNK tiene una eficacia significativamente mejor que la alteplasa. En lo que se refiere a los criterios más estrictos de NIH-SS > 8 , la TNK mostró una eficacia en el 28,57% de los pacientes, que fue numéricamente mayor que los datos de TNK a 0,2 mg/kg (24%) de Haley 2005 [Stroke 2005; 36: 607-612] y estadísticamente no importante comparado con los datos de Haley 2010 (35%) [Stroke 2010; 41: 707-11] con TNK a 0,25 mg/kg. No hubo HICs (hemorragia intracerebral) sintomática en ningún grupo. La HIC asintomática fue detectada por tomografía computarizada a las 48 horas en un paciente en el grupo de 0,1 mg/kg y en 2 pacientes en el grupo de 0,2 mg/kg. En total se reportaron 3 (8,57%) incidentes de HIC asintomática. Se reportó que la incidencia de HIC sintomática o asintomática es de 11,29% ($=7/62$) en el estudio Haley 2010 y de 20% ($=10/50$) en el estudio Haley 2005 con TNK. Estudios anteriores con alteplasa reportaron HIC sintomática en hasta el 7% de los pacientes y HIC asintomática en hasta el 31% de los pacientes (NEJM 1995, 333, 24, 1581-7). Los

nuevos datos revelados mostraron que la eficacia de la TNK es mejor que la reportada con alteplasa en el tratamiento del ACVIA.

Tabla 1: Mejoría en la calificación media NIH-SS

	Grupos de estudio		valor p [#]
	0,1 mg/Kg N = 14	0,2 mg/Kg N = 21	
Base (Media±SD)	10,07 ± 3,89	12,95 ± 5,08	0,081
24 horas después de la inyección (Media±SD)	6,43 ± 4,65	5,90 ± 4,06	0,72
48 horas después de la inyección (Media±SD)	5,57 ± 4,48	4,24 ± 3,97	0,31
Día 7 después de la inyección (Media±SD)	4,29 ± 4,43	3,20 ± 4,13	0,45
valor p comparado con la base [@]	0,0009	<0,0001	NA

- valor p, cuando es comparado entre grupos; se aplicó la prueba T.

@ - valor p, cuando se comparan los valores de base y del día 7 dentro del grupo; se aplicó la prueba T.

p <0,05 —estadísticamente importante; NA – No Aplicable; N = Número de pacientes

Tabla 2: Mejoría en la calificación NIH-SS ≥4 puntos

Mejoría en la calificación NIH-SS ≥4	Grupos de estudio		valor p [#]
	0,1 mg/Kg	0,2 mg/Kg	
A las 24 horas n (%)	8 (57,14)	17 (80,95)	0,15
A las 48 horas n (%)	10 (71,43)	20 (95,24)	0,133
Al día 7 n (%)	11 (78,57)	20 (95,24)	0,279
valor p [@]	0,41	0,34	NA

- valor p, cuando es comparado entre grupos

@ - valor p, cuando se compara el valor a las 24 horas y al día 7 dentro del grupo

p <0,05 —estadísticamente importante; NA – No Aplicable; N = Número de pacientes

Se aplicó la prueba exacta de Fisher para las proporciones. n – proporción de pacientes.

Tabla 3: Mejoría en la calificación NIH-SS ≥ 8 puntos

Mejoría en la calificación NIH-SS ≥ 8	Grupos de estudio		valor p [#]
	0,1 mg/Kg N = 14	0,3 mg/Kg N = 21	
A las 24 horas n (%)	1 (7,14)	6 (28,57)	0,202
A las 48 horas n (%)	2 (14,29)	9 (42,86)	0,136
Al día 7 n (%)	2 (14,29)	12 (57,14)	0,015
valor p [@]	1	0,118	NA

- valor p, cuando es comparado entre grupos

@ - valor p, cuando se compara el valor a las 24 horas y al día 7 dentro del grupo

p < 0,05 —estadísticamente importante; NA – No Aplicable; N = Número de pacientes

Se aplicó la prueba exacta de Fisher para las proporciones. n – proporción de pacientes.

REIVINDICACIONES

Reivindicamos:

1. Una composición farmacéutica como una inyección intravenosa de bolo para el tratamiento de accidentes cerebrovasculares isquémicos agudos en pacientes humanos que comprende:
 - a. una cantidad efectiva y segura de tenecteplasa, que es preparada por un proceso de fermentación basado en la perfusión continua;
 - b. un amortiguador inorgánico aceptable farmacéuticamente;
 - c. agentes estabilizadores aceptables farmacéuticamente; y
 - d. opcionalmente, un portador aceptable farmacéuticamente.
2. Una composición de la reivindicación 1 en el que la dosis efectiva y segura de tenecteplasa es de aproximadamente 0,10 a 0,24 mg/kg de peso corporal cuando es administrada.
3. Una composición de la reivindicación 1 en el que la dosis efectiva y segura de tenecteplasa es de aproximadamente 0,20 mg/kg de peso corporal cuando es administrada.
4. Una composición de la reivindicación 1 en el que la tenecteplasa se prepara en un sistema continuo de fermentación por perfusión usando células del ovario del hámster chino.
5. Una composición de la reivindicación 1 en el que el amortiguador usado es preferiblemente un amortiguador de ácido fosfórico/fosfato.
6. Una composición de la reivindicación 1 en el que el agente estabilizador usado es preferiblemente la L-arginina.
7. Una composición de la reivindicación 1 en el que otro agente estabilizador usado es preferiblemente un polisorbato.
8. Una composición de la reivindicación 1 en el que los componentes se liofilizan para convertirlos en polvo para su reconstitución con agua para inyección antes de su uso.
9. Una composición de la reivindicación 1 en el que la dosis total del compuesto se administra como un bolo intravenoso en 10 segundos dentro de 6 horas del inicio del accidente cardiovascular.
10. Un kit farmacéutico que comprende:
 - (a) una ampolla que contiene formulación de tenecteplasa liofilizada; e

(b) instrucciones para usar la fórmula para tratar el accidente cerebrovascular isquémico agudo en pacientes humanos al administrar la dosis de tenecteplasa de no más de 0,20 mg/kg de peso corporal proporcionada como un bolo intravenoso dentro de un plazo de 10 segundos.

11. Un kit de la reivindicación 10 en el que la cantidad de tenecteplasa es aproximadamente 2 mg/mL cuando se reconstituye con agua para su inyección.

12. Un kit de la reivindicación 10 en el que la dosis total se administra como bolo intravenoso a las 6 horas del inicio del accidente cerebrovascular isquémico agudo.

13. Un kit de la reivindicación 10 en el que la cantidad óptima de tenecteplasa para la dosis del bolo es aproximadamente 0,20 mg/kg de peso corporal.

14. Un kit de la reivindicación 10 en el que la dosis total se da como un bolo no más de 10 segundos.

15. Una composición farmacéutica de tenecteplasa y kit de la misma sustancialmente como se describe con referencia a los ejemplos.

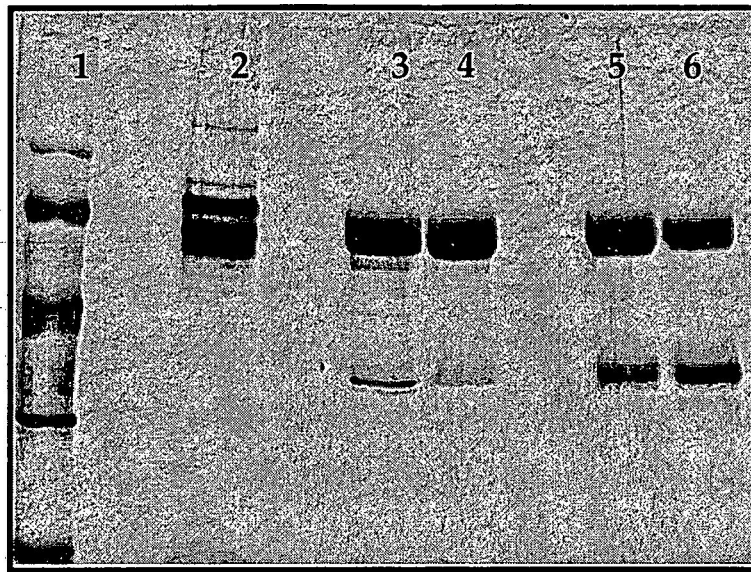


Figura 1

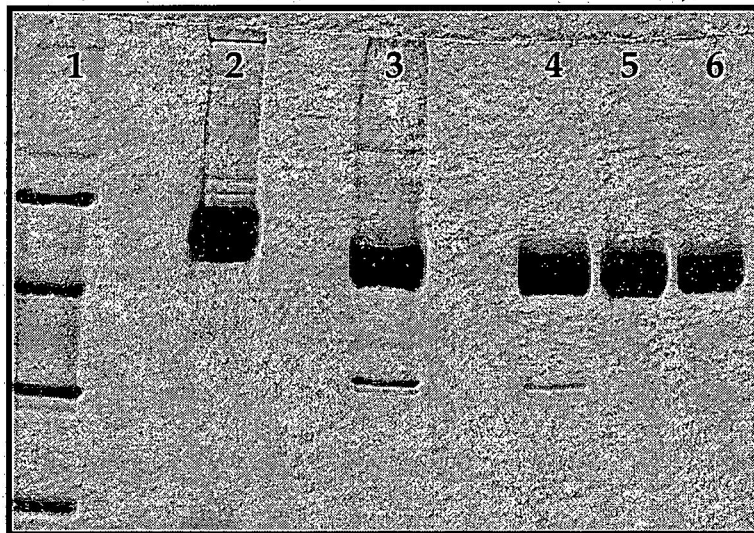


Figura 2.

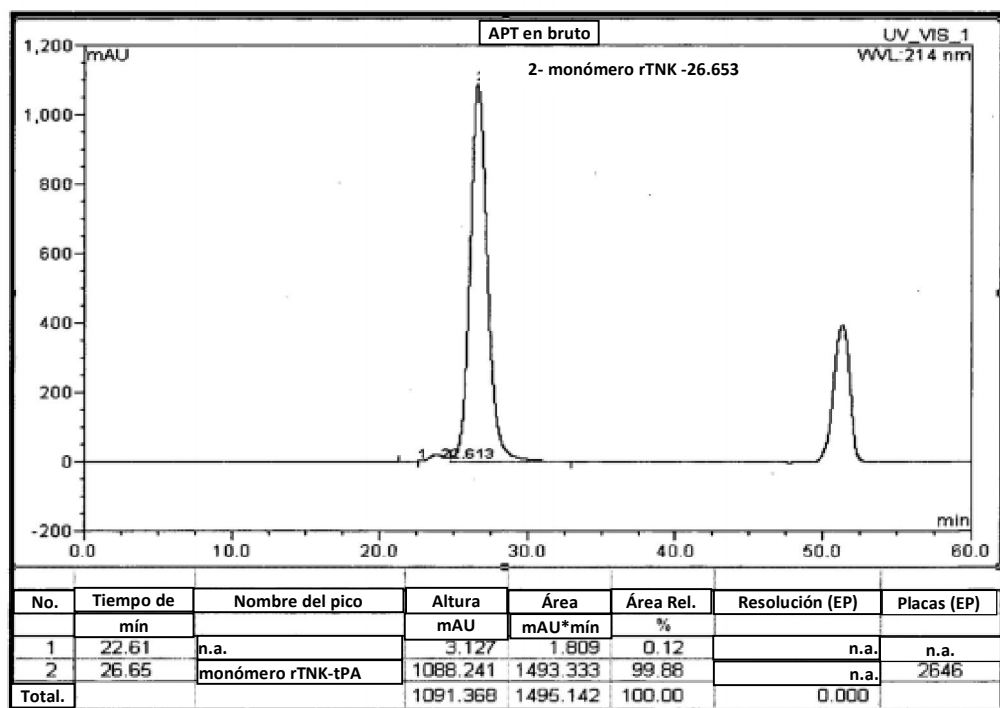
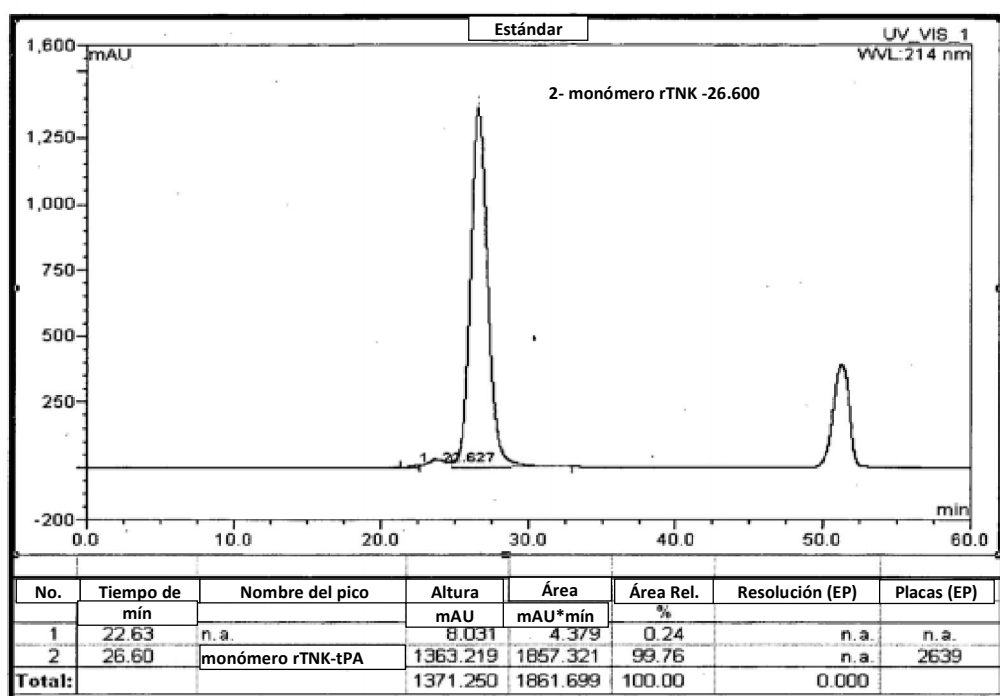


Figura 3.

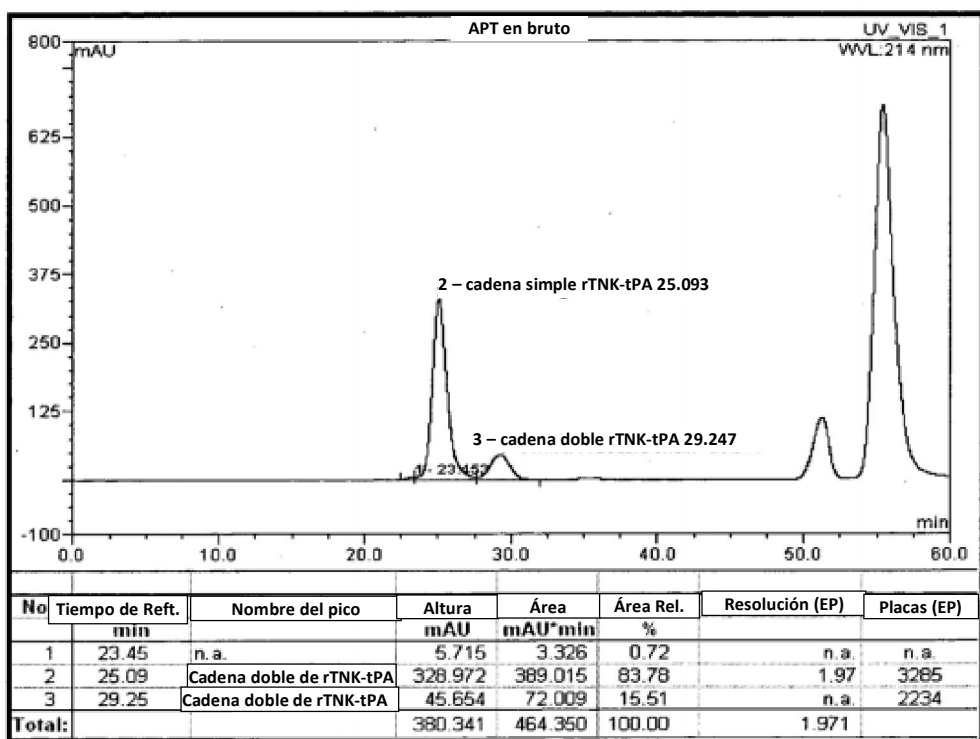
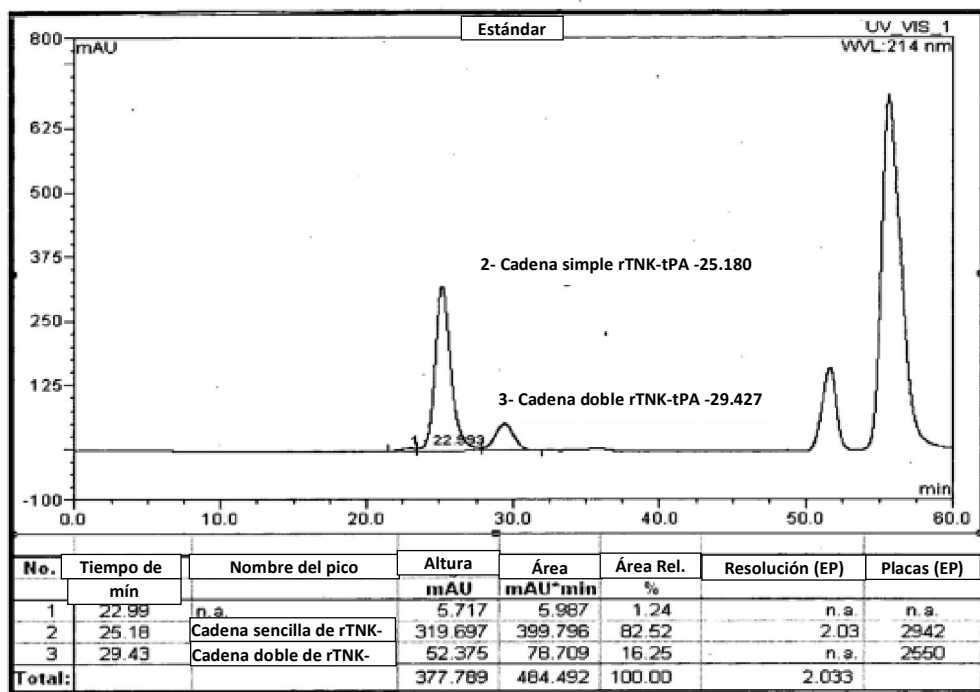


Figura 4.

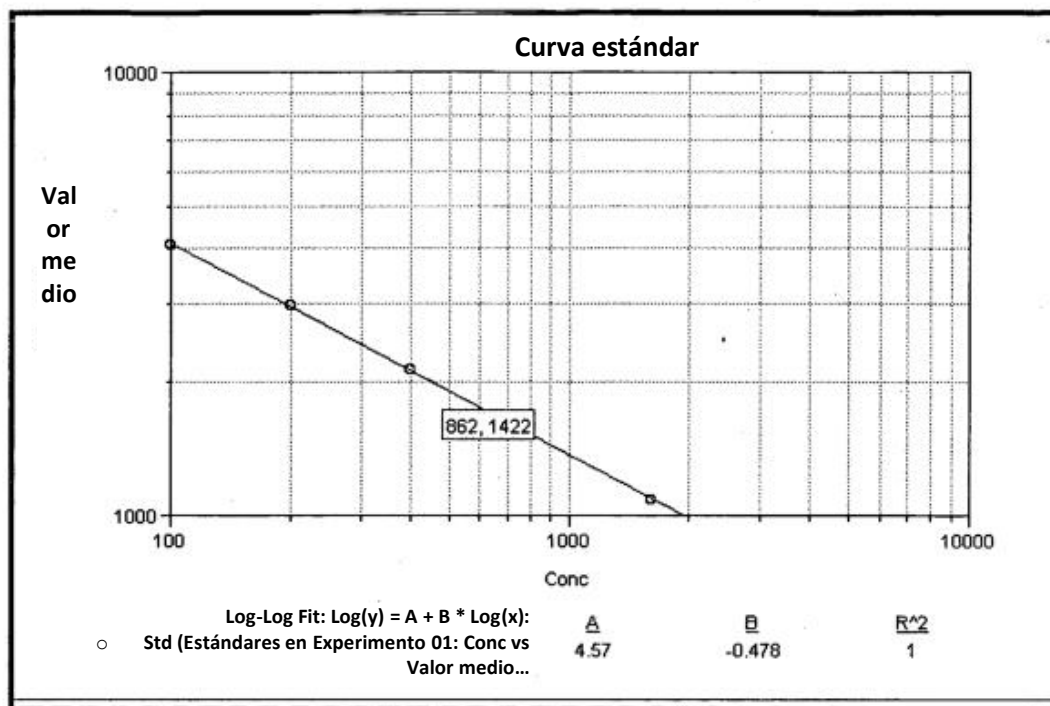
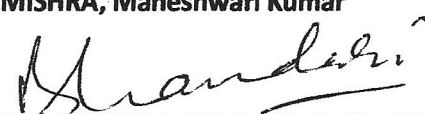
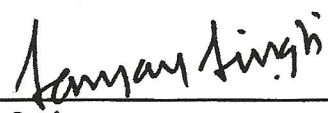


Figura 5.

RESUMEN

La invención se refiere a composiciones farmacéuticas de tenecteplasa que son seguras y efectivas en el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico agudo comparadas con composiciones conocidas. Las composiciones de la invención se inventaron basándose en una serie de ensayos de prueba con diferentes cantidades de TNK y aislando las cantidades específicas que fueron óptimas en términos de los efectos deseados de TNK en el tratamiento de accidente cerebrovascular isquémico agudo. clínicos

MARIN SANTACRUZ & ASOCIADOS SAS

	<u>CESION</u>
MISHRA, Maheshwari Kumar, BHANDARI, Pritiranjan SINGH, Sanjay	MISHRA, Maheshwari Kumar, BHANDARI, Pritiranjan SINGH, Sanjay
by means of this document assign(s) to Gennova Biopharmaceuticals Ltd.	por medio de la presente cedo (cedemos) a Gennova Biopharmaceuticals Ltd.
A company organized under the laws of India,	Una compañía organizada bajo las leyes de India,
Domiciled in P-1, IT-BT Park, MIDC Phase – 2, Hinjewadi, Pune – 411057, India	domiciliada en P-1, IT-BT Park, MIDC Phase – 2, Hinjewadi, Pune – 411057, India
all my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful improvement entitled and as fully set forth and described in: PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS OF TENECTEPLASE	todos mis (nuestros) derechos, título e interés sobre mi (nuestra) invención tal como describe en: COMPOSICIONES FARMACEUTICAS DE TENECTEPLASA
Given and signed this <u>JULY 01</u> , 2013 in <u>PUNE, INDIA</u> by 	Dado y firmado hoy <u>JULIO 01</u> 2013 en <u>PUNE, INDIA</u> por
MISHRA, Maheshwari Kumar  BHANDARI, Pritiranjan  SINGH, Sanjay	MISHRA, Maheshwari Kumar BHANDARI, Pritiranjan SINGH, Sanjay

MARIN SANTACRUZ & ASOCIADOS SAS

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY (for administrative I.P. matters)

REPRESENTACION Y PODER (para asuntos administrativos de P.I.)

I (we), the undersigned / *Yo (nosotros), abajo firmante (s)*

Gennova Biopharmaceuticals Ltd.

A company constituted with the laws of / *una compañía constituida de acuerdo a las leyes de*
India

With domicile in / *Con domicilio en:*

P-1, IT-BT Park, MIDC Phase – 2, Hinjewadi, Pune – 411057, India

hereby appoint **GERMAN MARIN RUALES**, with tpa. No. 64.239, and identity No. 79.155.665 and **ROSA MARGARITA SANTACRUZ CHAVES** with tpa. No 49434 and identity No. 35.501.911, with domicile in Carrera 13 A No. 89-38 oficina 328 of Bogotá D.C., Colombia as per the provisions of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, the first as principal and the later as substitute, as my (our) representative for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The substitute shall replace the principal in case of his absence or his temporal or definitive impediment. In all cases of absolute or temporal absence or impediments of the principal this Power of Attorney shall be substituted to the substituted by the mere exercise she does of the same and with the same powers of representation and empowerment which later will be identified. In addition I (we) grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before the administrative authorities, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models, layout-designs of integrated circuits, industrial designs; registration of marks, registration of commercial slogans, deposit of commercial names and trade emblems, obtainment of the declaration and authorization of denominations of origin; renewal, assignment, change or name or domicile, payment of the annuity fees, registration of licenses of use, voluntary cancellation; protection of trade secrets. b) File and respond oppositions, observations and cancellation actions. The designated representatives and attorneys here have the right to substitute this mandate, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a Power of Attorney, file legal remedies, and in general perform all acts in exercise of the power here granted.

SPANISH TRANSLATION/TRADUCCION AL ESPAÑOL

Por el presente designo (designamos) a: GERMAN HUMBERTO MARIN RUALES con tpa. No. 64.239 y c.c. No. 79.155.665 y ROSA MARGARITA SANTACRUZ CHAVES con tpa. No. 49434 y c.c. 35.501.911, con domicilio en la Carrera 13 A No. 89-38 oficina 328 of Bogotá D.C.,

Colombia , de conformidad con lo dispuesto en el parágrafo 1ro. del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y la que sigue como sustituta, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. La representante sustituta reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquel. En todos los eventos de ausencia absoluta o temporal o impedimentos del principal, el presente poder se sustituye en cabeza de la apoderada sustituta por el simple ejercicio que ella haga de él, con las mismas facultades de representación y apoderamiento que más adelante se identifican. Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial para lo cual autorizo(amos) a los mencionados apoderados para que me (nos) representen ante las autoridades administrativas en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, de los esquemas de trazado de circuitos integrados, diseños industriales; registro de marcas, registro de lemas comerciales, depósito de nombres y enseñas comerciales; obtención de denominaciones de origen, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, pago de anualidades de mantenimiento, registro de licencias de uso, cancelación voluntaria; la protección de nuestros secretos empresariales. b) Presentar o contestar oposiciones u observaciones y acciones de cancelación. Los representantes y apoderados aquí designados tendrán las facultades de sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos, presentar recursos legales y en general realizar todo acto inherente al ejercicio del poder aquí otorgado.

Given and signed this / *Dado y firmado hoy* twenty seventh day of June 2013.
Veintisiete día de junio 2013

In / En INDIA

By / Por SUNIL BHAT

Signature / Firma SBhat.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0063670

Bogotá D.C., Junio 27 de 2013 - 13:07:47

RECIBIDO DE : MARIN SANTACRUZ & ASOCIADOS

NI 900.343.639

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	4776	17/01/2013		750.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			<u>\$500.000.00</u>

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

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

, Junio 27 de 2013 - 13:07:47

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0063671

Bogotá D.C., Junio 27 de 2013 - 13:07:47

RECIBIDO DE : MARIN SANTACRUZ & ASOCIADOS

NI 900.343.639

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	4776	17/01/2013		750.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
5 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	150.000.00
			\$150.000.00

SON: **CIENTO CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

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

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

Junio 27 de 2013 - 13:07:47