



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Organización y
Digitalización CSA Ltd.



P.C.T.

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION



09-8773

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE
CONJUGADOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A
LA INSULINA-1 Y POLIETILENGLICOL"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 47/48

71. SOLICITANTE F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

DOMICILIO : BASILEA, SUIZA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 30 ENE. 2009

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-008773- -00000-0000

Fecha: 2009-01-30 16:11:14 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 97

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 31 Mayo 2009

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

Dirección: Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basilea, Suiza

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

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

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: FISCHER, Stephan; HESSE, Friederike; KNOETGEN, Hendrik; LANG, Kurt; METZGER, Friedrich; REGULA, Joerg, Thomas; SCHANTZ, Christian; SCHAUBMAR, Andreas y SCHOENFELD, Hans Joachim.

Dirección: Jakobifeldweg 11, 82398 Polling; Ganghoferstrasse 23, 80339 München; Agathe-Fleissner-Weg 16 82377 Penzberg; Langoner Strasse 10, 82377 Penzberg; Am Kirchacker 45, 79115 Freiburg; Lierstrasse 15, 80639 Muenchen; Im Wiesfield 11, 82377 Penzberg; St. Klara Strasse 41, 82377 Penzberg y Marienmattenweg 7, 79115 Freiburg.

Nacionalidad o Domicilio: Alemania.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2007/007540

Fecha: 29/08/07

Publicación Internacional No. WO 2008/025528 A1

Fecha: 06/03/08

⑥

Título (54) "MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA-1 Y POLIETILENGLICOL"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 47/48; C07K 14/65; C12N 15/12; C12N 15/62

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

EP

31/08/26

06018170.8

⑨

Comprobante de Pago No. 09-6,902

Fecha: Enero 28 de 2009

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documentos que acreditan la existencia y representación legal cuando los solicitantes sean personas jurídicas.
- ☒ Documentos de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación, Notificación del registro de cambio de Dirección del Inventor KNOETGEN, Hendrik, Opinión Escrita y Listado de Secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

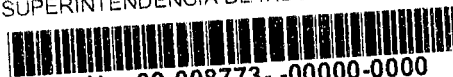
T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 6,902
FECHA : ENERO 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-008773- -00000-0000

Fecha: 2009-01-30 16:11:14 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 97

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	10521453	28/01/2009	2,620,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

ON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

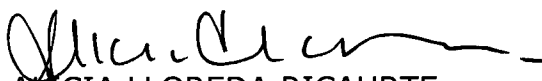
RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud.

En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No.

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

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

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

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

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

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

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

10. Firma

Cancillería de Estado

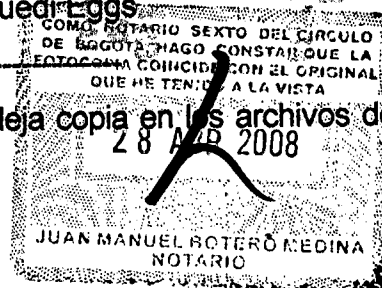
Fdo.: firma ilegible

de la ciudad de Basel (Basilea)

Ruedi Eggs

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

Bogotá, 2 de septiembre 2004



Maria Mercedes Urcochea T.
Maria Mercedes Urcochea T.
 Traductora Juramentada
 Resolución 10607/81 Minjusticia

Los abajo firmados, **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en **4070 Basilea, Suiza**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

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

domiciled at **4070 Basel, Switzerland**

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this *17th day of August 2008*
F. Hoffmann-La Roche AG

[Signature]
Fridolin Klausner
Holder of procuration

[Signature]
Denise Strebel
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Suiza
Basilea

{ss

Hoy 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Stöbel, quienes me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es titular del poder/mandatario

de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Suiza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Suiza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Suiza, ciudad de Basilea, con fecha 19 Junio 1997, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

Switzerland

Basel

{ss

On this 17th day of August, 2004, personally Fridolin Klausner and Denise Stöbel came both Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of

Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Suiza, ciudad de Basel, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of August, two thousand and four)

Dr. P. Kuster
Notar

17.08.2004

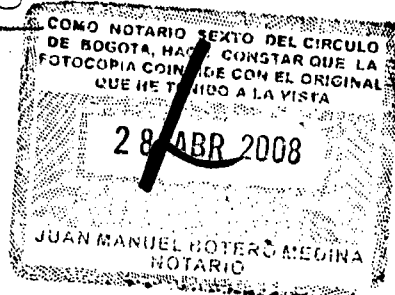
2 Fr.

DR. PETER KUSTER

Allg. Prot.

No. 20

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



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

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by Dr. iur. P. Kusch

3. in his/her function as St. Notar

4. and certified by the seal of the Gemeinde

Certified **18. Aug. 2004**

5. in Basel (Stadt)

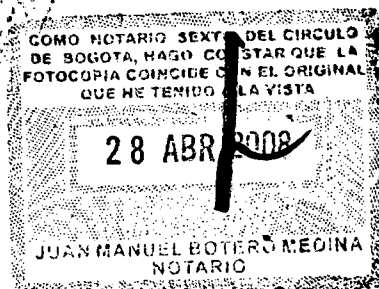
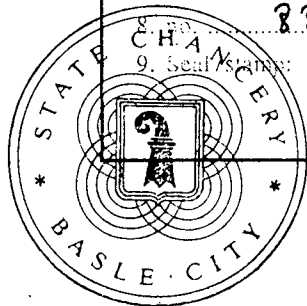
6. on

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

8. No. **8835 / 10 376**

9. Seal/Stamp:

10. Signature: P



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 47/48	
(22) Fecha de solicitud: 30-01-09		(71) Solicitante(s) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 06018170.8	(32) Fecha 31-08-06	(33) País EP
		(72) Inventor(es) FISCHER, Stephan; HESSE, Friederike; KNOETGEN, Hendrik; LANG, Kurt; METZGER, Friedrich; REGULA, Joerg, Thomas; SCHANTZ, Christian; SCHAUBMAR, Andreas y SCHOENFELD, Hans Joachim.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 31-03-09		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 06/03/08
	Fecha de presentación de la solicitud: 29/08/07		N° publicación: WO 2008/025528 A1
	No. de solicitud PCT/EP2007/007540		
(54) Titulo: "MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA-1 Y POLIETILENGLICOL"			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Un método para la producción de un IGF-I o una variante de IGF-I PEGilado en la lisina, y dicha variante comprende uno o dos aminoácido(s) seleccionados del grupo que consiste en lisina 27, 65 y/o 68, que están sustituidos independientemente por otro aminoácido polar, que se caracteriza por

- a) cultivar una célula hospedera procariota que comprende un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende dicho IGF-I o variante de IGF-I unida por el extremo N-terminal al C-terminal de un propéptido,
- b) en el que dicho propéptido finaliza en el extremo C-terminal con los aminoácidos -Y-Pro, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro, o Pro-Arg-Pro,
- c) recuperar y PEGilar dicha proteína de fusión,
- d) escindir dicha proteína de fusión PEGilada con la proteasa IgA, y
- e) recuperar dicho IGF-I PEGilado o variante de IGF-I.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 30/01/09

(51) Clasificación Internacional : A61K 47/48

(71) Solicitante(s) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

(72) Inventor(es) FISCHER, Stephan; HESSE, Friederike; KNOETGEN, Hendrik; LANG, Kurt; METZGER, Friedrich; REGULA, Joerg, Thomas; SCHANTZ, Christian; SCHAUBMAR, Andreas y SCHOENFELD, Hans Joachim.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**
06018170.8

(32) **Fecha**
31-08-06

(33) **País**
EP

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 31-03-09

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **06/03/08**

Fecha de presentación de la solicitud: **29/08/07**

N° publicación: **WO 2008/025528 A1**

No. de solicitud **PCT/EP2007/007540**

(54) Título: "MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA-1 Y POLIETILENGLICOL"



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Industria y Comercio

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION

PCT X

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 30/01/09

(51) Clasificación Internacional : A61K 47/48

(71) Solicitante(s) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

(72) Inventor(es) FISCHER, Stephan; HESSE, Friederike; KNOETGEN, Hendrik; LANG, Kurt; METZGER, Friedrich; REGULA, Joerg, Thomas; SCHANTZ, Christian; SCHAUBMAR, Andreas y SCHOENFELD, Hans Joachim.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**
06018170.8

(32) **Fecha**
31/08/06

(33) **País**
EP

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 31-03-09

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 29/08/07
No. De solicitud **PCT/EP2007/007540**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **06/03/08**

No. Publicación : **WO 2008/025528 A1**

FIGURA CARACTERISTICA

6 x 6 cm

(54) Título: "MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA-1 Y POLIETILENGLICOL"

(57) Resumen:

Reivindicación número 1:

Un método para la producción de un IGF-I o una variante de IGF-I PEGilado en la lisina, y dicha variante comprende uno o dos aminoácido(s) seleccionados del grupo que consiste en lisina 27, 65 y/o 68, que están sustituidos independientemente por otro aminoácido polar, que se caracteriza por

- cultivar una célula hospedera procariota que comprende un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende dicho IGF-I o variante de IGF-I unida por el extremo N-terminal al C-terminal de un péptido,
- en el que dicho péptido finaliza en el extremo C-terminal con los aminoácidos -Y-Pro, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro, o Pro-Arg-Pro,
- recuperar y PEGilar dicha proteína de fusión,
- escindir dicha proteína de fusión PEGilada con la proteasa IgA, y
- recuperar dicho IGF-I PEGilado o variante de IGF-I.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/007540

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K47/48	C07K14/65 C12N15/62 C12N15/12
ADD.	C12N9/52	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 674 113 A (HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 28 June 2006 (2006-06-28)	16-19
A	the whole document	14
X	& WO 2006/066891 A (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; AMREIN BEAT [CH]; FOSEK STEFAN [DE]; LANG KURT) 29 June 2006 (2006-06-29) cited in the application	16-19
A	-----	1-14
X	WO 2004/060300 A (MOUNTAIN VIEW PHARMACEUTICALS [US]) 22 July 2004 (2004-07-22) cited in the application paragraph [0158] - paragraph [0159]; claims 15,37,52,164; sequence 9 ----- -/-	15,17-19
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
E earlier document but published on or after the international filing date		
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
& document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 November 2007		Date of mailing of the international search report 10/12/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wiame, Ilse

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/007540

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	POHLNER J ET AL: "SEQUENCE-SPECIFIC CLEAVAGE OF PROTEIN FUSIONS USING A RECOMBINANT NEISSERIA TYPE 2 IGA PROTEASE" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 10, 1 July 1992 (1992-07-01), pages 799-804, XP002003043 ISSN: 0733-222X cited in the application the whole document -----	1-14
Y	WO 91/11520 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]) 8 August 1991 (1991-08-08) the whole document -----	1-14
Y	WO 91/02807 A (AMGEN INC [US]) 7 March 1991 (1991-03-07) the whole document -----	1-14
Y	& US 5 158 875 A (MILLER JAMES A [US] ET AL) 27 October 1992 (1992-10-27) cited in the application -----	1-14

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-14

Fusion protein consisting of lysine-PEGylated IGF-I or IGF-I variant N-terminally linked to the C-terminus of a propeptide, and use thereof in method for producing lysine-PEGylated IGF-I or IGF-I variant.

2. claims: 15 (completely) and 17-19 (all partially)

Lysine-PEGylated IGF-I, characterized by not comprising an N-terminal methionine, and use thereof.

3. claims: 16 (completely) and 17-19 (all partially)

Lysine-PEGylated IGF-I variant, characterized by not comprising an N-terminal methionine, and use thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/007540

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 19 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/007540

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1674113	A	28-06-2006	AR 052842 A1	04-04-2007
			AU 2005318387 A1	29-06-2006
			CA 2592006 A1	29-06-2006
			WO 2006066891 A2	29-06-2006
			KR 20070088809 A	29-08-2007
			US 2006154865 A1	13-07-2006
WO 2006066891	A	29-06-2006	AR 052842 A1	04-04-2007
			AU 2005318387 A1	29-06-2006
			CA 2592006 A1	29-06-2006
			EP 1674113 A1	28-06-2006
			KR 20070088809 A	29-08-2007
			US 2006154865 A1	13-07-2006
WO 2004060300	A	22-07-2004	AU 2003303636 A1	29-07-2004
			BR 0317752 A	22-11-2005
			CA 2511815 A1	22-07-2004
			EP 1628618 A2	01-03-2006
			IS 7931 A	04-07-2005
			JP 2006519170 T	24-08-2006
			KR 20050089860 A	08-09-2005
			MX PA05006945 A	14-12-2005
WO 9111520	A	08-08-1991	AT 124456 T	15-07-1995
			AT 219518 T	15-07-2002
			AU 638309 B2	24-06-1993
			AU 7149691 A	21-08-1991
			CA 2074943 A1	04-08-1991
			CS 9100241 A2	13-08-1991
			DK 513073 T3	30-10-1995
			EP 0513073 A1	19-11-1992
			ES 2076521 T3	01-11-1995
			ES 2177536 T3	16-12-2002
			FI 923463 A	31-07-1992
			HU 63195 A2	28-07-1993
			HU 217103 B	29-11-1999
			IE 910358 A1	14-08-1991
			JP 2766621 B2	18-06-1998
			JP 7278195 A	24-10-1995
			JP 7089952 B	04-10-1995
			LV 10309 A	20-10-1994
			NO 923010 A	14-09-1992
			NZ 236819 A	27-07-1993
			PT 96658 A	31-10-1991
			US 5427927 A	27-06-1995
WO 9102807	A	07-03-1991	AT 140029 T	15-07-1996
			AU 644105 B2	02-12-1993
			AU 6425490 A	03-04-1991
			CA 2023969 A1	26-02-1991
			DE 69027666 D1	08-08-1996
			DE 69027666 T2	07-11-1996
			DK 441955 T3	07-10-1996
			EP 0441955 A1	21-08-1991
			ES 2089029 T3	01-10-1996
			JP 4501514 T	19-03-1992
			US 5158875 A	27-10-1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2007/007540

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5158875	A	27-10-1992	AT 140029 T	15-07-1996
			AU 644105 B2	02-12-1993
			AU 6425490 A	03-04-1991
			CA 2023969 A1	26-02-1991
			DE 69027666 D1	08-08-1996
			DE 69027666 T2	07-11-1996
			DK 441955 T3	07-10-1996
			EP 0441955 A1	21-08-1991
			ES 2089029 T3	01-10-1996
			JP 4501514 T	19-03-1992
			WO 9102807 A1	07-03-1991

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 March 2008 (06.03.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/025528 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 47/48 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/65 (2006.01) C12N 9/52 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2007/007540

(22) International Filing Date: 29 August 2007 (29.08.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

06018170.8 31 August 2006 (31.08.2006) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG** [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **FISCHER, Stephan** [DE/DE]; Jakobifeldweg 11, 82398 Polling (DE). **HESSE, Friederike** [DE/DE]; Ganghoferstrasse 23, 80339 München (DE). **KNOETGEN, Hendrik** [DE/DE]; Barbarastrasse 33, 82377 Penzberg (DE). **LANG, Kurt** [DE/DE]; Langoner Strasse 10, 82377 Penzberg (DE). **METZGER, Friedrich** [DE/DE]; Am Kirchacker 45, 79115 Freiburg (DE). **REGULA, Joerg,**

Thomas [DE/DE]; Lierstrasse 15, 80639 Muenchen (DE). **SCHANTZ, Christian** [DE/DE]; Im Wiesfeld 11, 82377 Penzberg (DE). **SCHAUBMAR, Andreas** [DE/DE]; St. Klara Strasse 41, 82377 Penzberg (DE). **SCHOENFELD, Hans, Joachim** [DE/DE]; Marienmattenweg 7, 79115 Freiburg (DE).

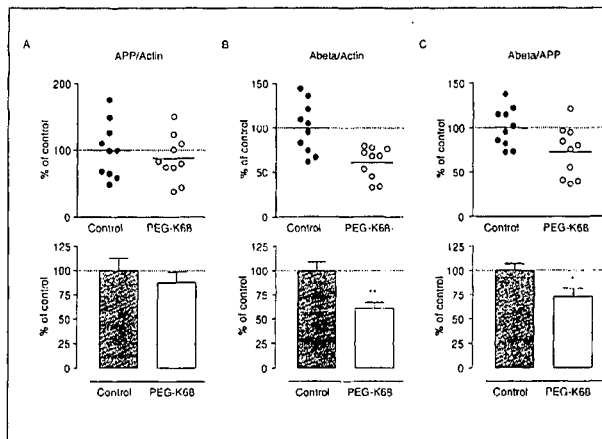
(74) Agent: **SCHREINER, Siegfried**; Roche Diagnostics GmbH, Patent Department (TR-E), Postfach 11 52, 82372 Penzberg (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF CONJUGATES OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I AND POLY(ETHYLENE GLYCOL)



(57) Abstract: Method for the production of a lysine-PEGylated IGF-I or IGF-I variant, said variant comprising one or two amino acid(s) selected from the group consisting of lysine 27, 65 and/or 68 substituted independently by another polar amino acid, characterized in cultivating a prokaryotic host cell comprising an expression vector containing a nucleic acid encoding a fusion protein comprising said IGF-I or IGF-I variant N-terminally linked to the C-terminus of a propeptide, that said propeptide ends C-terminally with amino acids -Y-Pro, wherein Y is selected from the group consisting of Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro, or Pro-Arg-Pro, recovering and PEGylating said fusion protein, cleaving said PEGylated fusion protein with IgA protease, and recovering said PEGylated IGF-I or IGF-I variant. The PEGylated IGF-I or IGF-I variant is useful for the treatment of neurodegenerative disorders like Alzheimer's Disease.

WO 2008/025528 A1



European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

Declaration under Rule 4.17:

- of inventorship (Rule 4.17(iv))

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SCHREINER, Siegfried
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-E)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 04 November 2008 (04.11.2008)	
Applicant's or agent's file reference 23907 WO-WJ	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2007/007540	International filing date (day/month/year) 29 August 2007 (29.08.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address KNOETGEN, Hendrik Barbarastrasse 33 82377 Penzberg Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address KNOETGEN, Hendrik Agathe-Fleissner-Weg 16 82377 Penzberg Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
	☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☒ the designated Offices concerned	
☐ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned	
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Tolu Catherine
Facsimile No. +41 22 338 89 75	e-mail pt05.pct@wipo.int
	Telephone No. +41 22 338 74 05

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

see form PCT/ISA/220

Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzance			
ASK	10. Dez. 2007		
BK			
BUR	HH	HIL	MI

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference

see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2007/007540International filing date (day/month/year)
29.08.2007Priority date (day/month/year)
31.08.2006International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K47/48 C07K14/65 C12N15/62 C12N15/12
ADD. C12N9/52Applicant
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

Termin

30.06.08

(20.05.08)

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
☐ Box No. II Priority
☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☒ Box No. IV Lack of unity of invention
☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐ Box No. VI Certain documents cited
☐ Box No. VII Certain defects in the international application
☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinionsee form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Wiame, Ilse

Telephone No. +31 70 340-8956



Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☒ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 19 (with respect to industrial applicability)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 19 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☒ See Supplemental Box for further details

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-14</u>
	No: Claims	<u>15-19</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-19</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-18</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Reference is made to the following documents:

- D1: EP-A-1 674 113 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 28 June 2006 (2006-06-28)
- D2: WO 2004/060300 A (MOUNTAIN VIEW PHARMACEUTICALS [US]) 22 July 2004 (2004-07-22)
- D3: POHLNER J ET AL: "SEQUENCE-SPECIFIC CLEAVAGE OF PROTEIN FUSIONS USING A RECOMBINANT NEISSERIA TYPE 2 IGA PROTEASE" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 10, 1 July 1992 (1992-07-01), pages 799-804, XP002003043 ISSN: 0733-222X
- D5: WO 91/02807 A (AMGEN INC [US]) 7 March 1991 (1991-03-07)

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claim 19 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of this claim (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item IV

Lack of unity of invention

This Authority considers that there are 3 inventions covered by the claims indicated as follows:

Invention 1: claims 1-14

Fusion protein consisting of lysine-PEGylated IGF-I or IGF-I variant N-terminally linked to the C-terminus of a propeptide, and use thereof in method for producing lysine-PEGylated IGF-I or IGF-I variant.

Invention 2: claims 15 (completely) and 17-19 (all partially)

Lysine-PEGylated IGF-I, characterized by not comprising an N-terminal methionine, and use thereof.

Invention 3: claims 16 (completely) and 17-19 (all partially)
Lysine-PEGylated IGF-I variant, characterized by not comprising an N-terminal methionine,
and use thereof.

The reasons for which the inventions are not so linked as to form a single general inventive
concept, as required by Rule 13.1 PCT, are as follows:

The prior art has been identified as follows:

The document D5 and discloses a fusion protein consisting of IGF-I N-terminally linked to
the C-terminus of a propeptide, and use thereof in method for producing IGF-I (see 2.1
below).

The document D1 discloses lysine-PEGylated IGF-I variants (see 1.1 below).

The document D2 discloses lysine-PEGylated IGF-I which does not comprise an N-
terminal methionine (see 1.2 below).

In view of the prior art above, the problem to be solved by the present invention can be
considered as:

- the provision of further fusion protein consisting of IGF-I N-terminally linked to the
C-terminus of a propeptide, and use thereof in method for producing IGF-I;
- the provision of further lysine-PEGylated IGF-I variants; and
- the provision of further lysine-PEGylated IGF-I which does not comprise an N-terminal
methionine.

The present application provides 3 different solutions to said problem, as listed above.

The common concept linking together the subject-matter of claims 1, 15 and 16 is lysine-
PEGylated IGF-I. This common concept is not novel, see documents D1, D2 and D5 as
described above (1.1).

Moreover, no technical feature could be identified which can be considered a special
technical feature in the meaning of Rule 13.2 PCT. Therefore the present application does
not fulfil the requirements of unity of invention as defined in Rules 13.1 and 13.2 PCT.

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

- 1 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claim 15 to 19 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.
 - 1.1 The document D1 discloses lysine-PEGylated IGF-I variants wherein up to 3 to amino acids at positions 27, 37, 65 or 68 are altered so that 1 or 2 of said amino acids is /are lysine and amino acid 27 is a polar amino acid but not lysine (claims 1-5 and ex. 1-10). Said IGF-I does not comprise an N-terminal methionine (see fig. 3B, aa 1-11 and legend thereto on p. 8). Further disclosed are pharmaceutical compositions comprising said variants and use thereof for the treatment of Alzheimer's disease (claims 13-15).

The subject-matter of claims 16 to 19 is therefore not new (Article 33(2) PCT).

- 1.2 The document D2 discloses lysine-PEGylated IGF-I (par. 158-159). Said IGF-I does not comprise an N-terminal methionine (see SEQ ID NO:9). Further disclosed are pharmaceutical compositions comprising said variants and use thereof for the treatment of Alzheimer's disease (claims 15,37,52,164).

The subject-matter of claims 15 and 17 to 19 is therefore not new (Article 33(2) PCT).

- 2 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1 to 14 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.
 - 2.1 Document D5, which is considered to represent the most relevant state of the art, discloses (ex. 1-5), a method for the production of IGF-I, characterized by
 - a) cultivating a prokaryotic host cell comprising an expression vector containing a nucleic acid encoding a fusion protein comprising IGF-I N-terminally linked to the C-terminus of a propeptide,

- b) whereby said propeptide ends C-terminally with amino acids Met-Lys,
- c) recovering said fusion protein,
- d) cleaving said fusion protein with diaminopeptidase (cathepsin C), and
- e) recovering said IGF-I.

Document D3 (the whole document) discloses a method for the production of a recombinant protein-of-interest, characterized by

- a) cultivating a prokaryotic host cell comprising an expression vector containing a nucleic acid encoding a fusion protein comprising the protein-of-interest N-terminally linked to the C-terminus of a propeptide,
- b) whereby said propeptide ends C-terminally with amino acids Pro-Thr-Pro,
- c) recovering said fusion protein,
- d) cleaving said fusion protein with IgA protease, and
- e) recovering said protein-of-interest.

- 2.2 The subject-matter of claim 1 differs from the method of document D5 in that:
- the propeptide ends with -Y-Pro, wherein Y is selected from the group consisting of Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro, or Pro-Arg-Pro;
 - the fusion protein is cleaved with IgA protease; and
 - the fusion protein is PEGylated and, optionally, IGF is a variant as defined in claim 1.

- 2.3 The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as to provide a further method for the production of IGF-I.

- 2.4 The solution proposed in claim 1 of the present application cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons:

The skilled person would combine document D3 with document D5 and use the method of D3 for the production of IGF-I and thereby obtain a method which is characterized by:

- a) cultivating a prokaryotic host cell comprising an expression vector containing a nucleic acid encoding IGF-I comprising the protein-of-interest N-terminally linked to the C-terminus of a propeptide,

- b) whereby said propeptide ends C-terminally with amino acids Pro-Thr-Pro,
 - c) recovering said fusion protein,
 - d) cleaving said fusion protein with IgA protease, and
 - e) recovering said IGF-I.
- The resulting IGF-I would have an additional N-terminal Thr-Pro dipeptide, but claim 1 does not exclude this.

Furthermore, it is trivial to PEGylate IGF-I fusion proteins (e.g. document D2 as described above in 1.2) or variants thereof (see document D1, as described above in 1.1, which discloses PEGylated IGF-I variants as defined in claim 1).

- 2.5 Dependent claims 2 to 11 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the EPC with respect inventive step, for the following reasons:
- It is trivial to add a linked His-tag for purification of a polypeptide and to add an N-terminal Met for correct expression of a polypeptide.
 - It is trivial to use a polypeptide not containing a lysine residue in order to avoid additional PEGylation of the fusion protein at a lysine residue of the propeptide.
 - The mono- and di-PEGylated variants of claims 4-11 are disclosed in document D1 (claims 1-9).
- 2.6 The same reasoning applies to product claims 12 to 14.

3 Further remarks

- 3.1 The subject-matter of claims 1-3 is not sufficiently disclosed (Art. 5 PCT) because it is not credibly shown in the present application that any IgA protease (E.C 3.4.24.13 or E.C.3.4.21.72, from any organism) is capable of cleaving the amino acid sequence Y-Pro-!-Gly-Pro, thereby releasing mature IGF-I. Furthermore, it is not clear from example 1 of the present application which IgA was used for cleavage.
- 3.2 Claim 1 is not clear, contrary to Article 6 PCT, because there appear to be syntax errors in the preamble of said claim.

- 3.3 The terms RRK, RKR and RKK used in claims are unclear and leave the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which they refer, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claim/s unclear (Article 6 PCT).
- 3.4 For the assessment of the present claim 19 on the question whether it is industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claim. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

**MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS DEL FACTOR
DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA-1 Y POLIETI-
LENGLICOL**

RESUMEN -OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Un método para la producción de IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina, y dicha variante comprende uno o dos aminoácido(s) seleccionados del grupo que consiste en lisina 27, 65 y/o 68 sustituidos independientemente por otro aminoácido polar, que se caracteriza por cultivar una célula hospedera procariota que comprende un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende dicho IGF-I o variante de IGF-I unido en el extremo N-terminal al extremo C-terminal de un propéptido, en el que dicho propéptido finaliza en el C-terminal con los aminoácidos -Y-Pro, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro, o Pro-Arg-Pro, recuperando y PEGilando dicha proteína de fusión, escindiendo dicha proteína de fusión PEGilada con la proteasa IgA, y recuperando dicho IGF-I o variante de IGF-I PEGilado. El IGF-I o variante de IGF-I PEGilado es útil para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer.

MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA-1 Y POLIETI- LENGLICOL

Esta invención está relacionada con los métodos para la producción de conjugados de factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-I) con polietilenglicol (PEG), composiciones farmacéuticas que contienen tales conjugados, y métodos para utilizar tales conjugados.

Antecedentes de la Invención

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una forma de neurodegeneración cuya prevalencia está aumentando y que da lugar aproximadamente a un 50%-60% de todos los casos de demencia entre las personas mayores de 65 años. Actualmente se estima que afecta a 15 millones de personas en todo el mundo y debido al aumento relativo de personas mayores en la población, su prevalencia probablemente aumentará en las próximas 2 o 3 décadas. La EA es un trastorno progresivo con una duración media de alrededor de 8,5 años entre la aparición de los síntomas clínicos y la muerte. La muerte de las neuronas piramidales y la pérdida de sinapsis neuronales en las regiones del cerebro asociadas con las funciones mentales superiores resulta en los síntomas típicos, caracterizados por un deterioro general y progresivo de las funciones cognitivas (Francis, P.T., et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 66 (1999) 137-147). La EA es la forma más común en el mundo de ambos tipos de demencia, la senil y la presenil y está reconocida clínicamente como una de-

mencia progresiva e inexorable que aparece con una pérdida creciente de memoria, de la función intelectual y alteraciones en el habla (Merritt, A Textbook of Neurology, 6ª ed., Lea & Febiger, Philadelphia (1979), págs. 484-489). En
5 relación a la neuropatología, los principales rasgos distintivos de la EA son la presencia de dos lesiones características: la placa amiloide senil y los ovillos neurofibrilares (ONF). Mientras que la placa se deposita extraneuro-
nalmente, los ovillos se observan intraneuronamente en el
10 cerebro post-mortem. Uno de los principales componentes del núcleo de la placa amiloide es el pequeño péptido beta-amiloide (A β) depositado de forma patológica, que se escinde mediante secretasas de la proteína amiloide precursora (APP) (Selkoe, D.J., *Physiol. Rev.* 81 (2001) 741-766; Har-
15 dy, J. y Selkoe, D.J., *Science* 297 (2002) 353-356; Bush, A.I. y Tanzi, R.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 7317-7319). El A β , un péptido auto-agregante de 39 a 43 residuos (PM ~4 kDa), se sintetiza como parte de la APP, más larga (110-120 kDa). La APP es una glicoproteína integral
20 de membrana de tipo I con un gran dominio extracelular N-terminal, un dominio único transmembrana y una pequeña cola citoplasmática. La región A β abarca porciones de los dominios extracelular y transmembrana de la APP. La hipótesis más común sobre la participación de la APP en la muerte de
25 las células neuronales en la EA es la hipótesis amiloide. Esta hipótesis postula que las deposiciones de placa amiloide o A β soluble parcialmente agregada produce una cascada neurotóxica, provocando de esta manera una neurodegene-

ración similar a la patología de la EA (Selkoe, D.J., Physiol. Rev. 81 (2001) 741-766; Hardy, J. y Selkoe, D.J., Science 297 (2002) 353-356).

El factor de crecimiento similar a la insulina-1 humano (IGF-I) es una hormona circulante, que está relacionada en su estructura con la insulina. El IGF-I ha sido considerado tradicionalmente el principal mediador de las acciones de la hormona de crecimiento sobre los tejidos periféricos. El IGF-I consiste en 70 aminoácidos y también se denomina somatomedina C y se define con el N° de SwissProt P01343. Su uso, actividad y producción se mencionan en, por ejemplo, le Bouc, Y., et al., FEBS Lett. 196 (1986) 108-112; de Pagter-Holthuizen, P., et al., FEBS Lett. 195 (1986) 179-184; Sandberg Nordqvist, A. C., et al., Brain Res. Mol. Brain Res. 12 (1992) 275-277; Steenbergh, P. H., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 175 (1991) 507-514; Tanner, J. M., et al., Acta Endocrinol. (Copenh.) 84 (1977) 681-696; Uthne, K., et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 39 (1974) 548-554; EP 0 123 228; EP 0 128 733; US 5,861,373; US 5,714,460; EP 0 597 033; WO 02/32449; WO 93/02695.

La regulación de la función de IGF-I es bastante compleja. En la circulación, sólo el 0,2% del IGF-I existe en forma libre mientras que la mayoría está unido a proteínas de unión a IGF (IGFBP), que presentan una muy alta afinidad hacia los IGF y modulan la función de IGF-I. El factor puede liberarse de forma local mediante mecanismos de liberación de IGF-I como la proteólisis de las IGFBP mediante proteasas.

El IGF-I juega un papel paracrino en el desarrollo y maduración del cerebro (Werther, G.A., et al., Mol. Endocrinol. 4 (1990) 773-778). Los estudios *in vitro* indican que el IGF-I es un potente agente trófico no selectivo para
5 diferentes tipos de neuronas en el SNC (Knusel, B., et al., J. Neurosci. 10(1990) 558-570; Svrzic, D., y Schubert, D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 172 (1990) 54-60), incluyendo las neuronas dopaminérgicas (Knusel, B., et al., J. Neurosci. 10(1990) 558-570) y oligodendrocitos (McMorris, F.
10 A., y Dubois-Dalcq, M., J. Neurosci. Res. 21 (1988) 199-209; McMorris, F. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 822-826; Mozell, R.L., y McMorris, F. A., J. Neurosci. Res. 30 (1991) 382-390)). La US 5,093,317 menciona que la supervivencia de las células neuronales colinérgicas se
15 ve potenciada mediante la administración de IGF-I. También se sabe que el IGF-I estimula la regeneración de los nervios periféricos (Kanje, M., et al., Brain Res. 486 (1989) 396-398) y aumenta la actividad de la ornitina descarboxilasa (US 5,093,317). Las patentes US 5,861,373 y
20 WO 93/02695 mencionan un método para tratar lesiones o enfermedades del sistema nervioso central que predominantemente afectan a las neuronas de la glía y/o neuronas no colinérgicas aumentando la concentración activa de IGF-I y/o análogos del mismo en el sistema nervioso central del
25 paciente. La WO 02/32449 se centra en los métodos para reducir o prevenir el daño isquémico en el sistema nervioso central de un mamífero mediante la administración en la cavidad nasal del mamífero en cuestión, de una composición

farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de IGF-I o de una variante biológicamente activa del mismo. El IGF-I o variante del mismo es absorbido a través de la cavidad nasal y transportado dentro del sistema nervioso central del mamífero en una cantidad efectiva para reducir o prevenir el daño isquémico asociado con un evento isquémico. La PE 0 874 641 reivindica el uso de un IGF-I o un IGF-II para la elaboración de un medicamento para tratar o prevenir el daño neuronal en el sistema nervioso central, debido a la demencia relacionada con el SIDA, EA, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Pick, Enfermedad de Huntington, encefalopatía hepática, síndromes ganglionares cortico-basales, demencia progresiva, demencia familiar con paraparesia espástica, parálisis progresiva supranuclear, esclerosis múltiple, esclerosis cerebral de Schilder o encefalomielitis hemorrágica aguda necrotizante, en la que el medicamento está en una forma de administración parenteral de una cantidad efectiva de dicho IGF fuera de la barrera hematoencefálica o hematomedular.

La reducción de los niveles de IGF-I libre en el cerebro y en el suero, se ha relacionado con la patogénesis de formas esporádicas y familiares de EA. Además, el IGF-I protege las neuronas de la neurotoxicidad inducida por el A β (Niikura, T., et al., J. Neurosci. 21 (2001) 1902-1910; Dore, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 4772-4777; Dore, S., et al., Ann. NY Acad. Sci. 890 (1999) 356-364). Recientemente, se ha visto que el IGF-I administrado periféricamente es capaz de reducir los niveles de A β

en el cerebro de ratas y ratones (Carro, E., et al., Nat. Med. 8 (2002) 1390-1397). Además, el estudio ha demostrado en un modelo de ratón transgénico con EA, que el tratamiento prolongado de IGF-I reduce de forma significativa la carga de placas amiloides en el cerebro. Estos datos apoyan fuertemente la idea de que el IGF-I es capaz de reducir los niveles de A β en el cerebro y la demencia cerebral asociada a las placas mediante el aclaramiento de A β del cerebro.

Se ha demostrado que la modificación covalente de las proteínas con polietilenglicol (PEG) es un método útil para aumentar la vida media de circulación de las proteínas en el organismo (Hershfield, M. S., et al., N. Engl. J. Med. 316 (1987) 589-596; Meyers, F. J., et al., Clin. Pharmacol. Ther. 49 (1991) 307-313; Delgado, C., et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 9 (1992) 249-304; Katre, Advanced Drug Delivery Reviews 10 (1993) 91-114; EP-A 0 400 472; Monfardini, C., et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69; Satake-Ishikawa, R., et al., Cell Struct. Funct. 17 (1992) 157-160; Katre, N. V., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 1487-1491; Tsutsumi, Y., et al., Jpn. J. Cancer Res. 85 (1994) 9-12; Inoue, H., et al., J. Lab. Clin. Med. 124 (1994) 529-536; Chamow, S.M., et al., Bioconjugate Chem. 5 (1994) 133-140).

Otras ventajas de la PEGilación son un incremento de la solubilidad y un descenso en la inmunogenicidad de la proteína (Katre, N.V., J. Immunol. 144 (1990) 209-213). Un método común para la PEGilación de proteínas es la utilización de polietilenglicol activado con reactivos amino-

reactivos como la N-hidroxisuccinimida (NHS). Con tales re-
activos, el polietilenglicol se une a las proteínas en los
grupos amino primarios libres como el grupo N-terminal
 α -amino y los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina. No
5 obstante, la principal limitación de esta aproximación es
que las proteínas normalmente contienen una cantidad consi-
derable de residuos de lisina y por lo tanto, los grupos
polietilenglicol están unidos a la proteína de forma no es-
pecífica a todos los grupos ϵ -amino, resultando en una mez-
10 cla heteróloga de producto de proteínas PEGiladas aleato-
riamente. Por lo tanto, muchas proteínas NHS-PEGiladas no
son adecuadas para su uso comercial debido a su baja acti-
vidad específica. La inactivación resulta de la modifica-
ción covalente de uno o más residuos de lisina o del resi-
15 duo amino N-terminal necesario para la actividad biológica
o de la unión covalente de los residuos de polietilenglicol
cercaños o en el centro activo de la proteína. Por ejemplo,
se ha encontrado que la modificación de la hormona de cre-
cimiento humana utilizando los reactivos de NHS-PEGilación
20 reduce la actividad biológica de la proteína en más de 10
veces (Clark, R., et al., J. Biol. Chem. 271 (1996) 21969-
21977). La hormona de crecimiento humana contiene 9 lisinas
además del aminoácido N-terminal. Algunas de estas lisinas
están localizadas en las regiones de la proteína que se sa-
25 ben que son críticas para la unión del receptor (Cunning-
ham, B.C., et al., Science 254 (1991) 821-825). Además, la
modificación de la eritropoyetina mediante el uso de reac-
tivos de polietilenglicol amino-reactivos, resulta también

en una pérdida casi completa de la actividad biológica (Wojchowski, D.M., et al., Biochim. Biophys. Acta 910 (1987) 224-232). La modificación covalente del Interferón- α 2 con reactivos de PEGilación amino-reactivos, resulta en una pérdida del 40-75% de la bioactividad (Patente Estadou-
5 nidense N° 5,382,657). Una modificación similar del G-CSF resulta en una pérdida de actividad superior al 60% (Tana-ka, H., et al., Cancer Res. 51 (1991) 3710-3714) y de la Interleuquina-2 en más del 90% de su bioactividad (Goodson,
10 R. J., y Katre, N. V., BioTechnology 8 (1990) 343-346).

Las patentes WO 94/12219 y WO 95/32003 reivindican conjugados de polietilenglicol que comprenden PEG y IGF o un IGF mutado en la cisteína, en la que dicho PEG está uni-
do a dicha muteína en una cisteína libre en la región N-
15 terminal de la muteína. La WO 2004/60300 describe el IGF-I PEGilado en el extremo N-terminal.

El sitio de reconocimiento de la Proteasa IgA está descrito como Yaa-Pro.!.Xaa-Pro. Yaa significa Pro (o rara-
mente Pro en combinación con Ala, Gly o Thr: Pro-Ala, Pro-
20 Gly, o Pro-Thr. Xaa significa Thr, Ser o Ala (Pohlner, J., et al., Bio/Technology 10 (1992) 799-804; Pohlner, J., et al., Nature 325 (1987) 458-462; y US 5,427,927). Los sitios de escisión naturales han sido identificados por Wood, S.G. y Burton J., Infect. Immun. 59 (1991) 1818-1822. Los sus-
25 tratos peptídicos sintéticos para la proteasa de la inmunoglobulina A1 de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2) son los sitios autoproteolíticos Lys-Pro-Ala-Pro.!.Ser-Pro, Val-Ala-Pro-Pro.!.Ser-Pro, Pro-Arg-Pro-Pro.!.Ala-Pro, Pro-Arg-Pro-

Pro-!.Ser-Pro, Pro-Arg-Pro-Pro-!.Thr-Pro y los sitios de
escisión IgA1: Pro-Pro-Thr-Pro-!.Ser-Pro y Ser-Thr-Pro-
Pro-!.Thr-Pro.

La patente WO 2006/066891 describe conjugados que con-
sisten en una variante del factor de crecimiento similar a
la insulina-1 (IGF-I) y uno o dos grupos polietilenglicol,
que se caracterizan por que dicha variante de IGF-I posee
una alteración en la secuencia de aminoácidos del IGF-I de
tipo salvaje en hasta tres de las posiciones aminoacídicas
27, 37, 65, 68, de forma que uno o dos de dichos aminoáci-
dos son lisina y el aminoácido 27 es un aminoácido polar
diferente de lisina, y está conjugado mediante el grupo
amino primario de dicha(s) lisina(s) y dicho(s) grupo(s)
polietilenglicol poseen un peso molecular total de 20 a 100
kDa. Tales conjugados son útiles para el tratamiento de
trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzhei-
mer. La patente WO 2006/074390 se refiere a los polipépti-
dos de fusión de IGF-I.

Resumen de la Invención

La invención comprende un método para la producción de
un IGF-I PEGilado en la lisina o una variante de IGF-I PE-
Gilado en la lisina, dicha variante comprende uno o dos
aminoácido(s) seleccionados de entre el grupo que consiste
en la lisina 27, 65 y/o 68 sustituidas independientemente
por otro aminoácido polar, que se caracteriza por

a) cultivar una célula hospedera procariota que com-
prende un vector de expresión que contiene un ácido nucleí-
co que codifica una proteína de fusión, que comprende dicho

IGF-I o variante de IGF-I unida por el extremo N-terminal al C-terminal de un propéptido,

b) en el que dicho propéptido finaliza en el extremo C-terminal con los aminoácidos -Y-Pro, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro, o Pro-Arg-Pro,

c) recuperar y PEGilar dicha proteína de fusión,

d) escindir dicha proteína de fusión PEGilada con la proteasa IgA, y

e) recuperar dicho IGF-I PEGilado o variante de IGF-I.

En una realización, dicho método se caracteriza porque la variante de IGF-I PEGilada en la lisina es RRK y dicha variante está monoPEGilada en el residuo de lisina 68, o la variante de IGF-I PEGilada en la lisina es RKR y dicha variante está monoPEGilada en el residuo de lisina 65.

En otra realización, dicho método se caracteriza porque la variante de IGF-I PEGilada en la lisina es RKK y dicha variante está mono- o diPEGilada en los residuos de lisina 65 y 68.

En otra realización dicho método se caracteriza porque la variante de IGF-I PEGilada en la lisina es una mezcla de RRK, RKR o RKK y dicha variante está mono- o diPEGilada en el(los) residuo(s) de lisina 65 y 68.

Otra realización de la invención es una proteína de fusión que comprende dicho IGF-I o variante de IGF-I unido en el extremo N-terminal al extremo C-terminal de un propéptido, que se caracteriza porque dicho propéptido finali-

za en el extremo C-terminal con los aminoácidos -Y-Pro, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro, o Pro-Arg-Pro. Gracias a la secuencia -Y-Pro, el propéptido
5 puede separarse mediante el tratamiento con la la proteasa IgA de dicho IGF-I o variante de IGF-I.

Preferiblemente la proteína de fusión de acuerdo con la invención se caracteriza por la fórmula Met-X₁-His_n-X₂-Y-Pro-[IGF-I o variante de IGF-I], en la que

10 • IGF-I indica el IGF-I humano y la variante de IGF-I indica un IGF-I en el que uno o dos aminoácido(s) seleccionados del grupo que consiste en lisina 27, 65 y/o 68 están sustituidos independientemente por otro aminoácido polar,

15 • Met indica metionina,
• X₁ es un enlace, serina o asparagina,
• His es histidina,
• n es un número de 0 a 10, preferiblemente de 0 a 6,

20 • X₂ es un péptido enlazante, seleccionado de entre el grupo de péptidos Id. de Sec. N°: 6-10,
• Pro es prolina, y
• Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.
25

Preferiblemente la proteína de fusión de acuerdo con la invención se selecciona del grupo que consiste en las proteínas de fusión Id. de Sec. N°: 2-5 y Id. de Sec. N°:

22-25.

Preferiblemente el propéptido se muestra mediante la fórmula $\text{Met-X}_1\text{-His}_n\text{-X}_2\text{-Y-Pro-}$, en la que

- Met indica metionina
- 5 • X_1 es un enlace, serina o asparagina
- His es histidina,
- n es un número de 0 a 10, preferiblemente de 0 a 6,
- X_2 es un péptido enlazante, seleccionado del grupo
- 10 que consiste en los péptidos Id. de Sec. N°: 6-10,
- Pro es prolina, y
- Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.

15 El propéptido está unido en su extremo C-terminal al extremo N-terminal (glicina) del IGF-I o variante de IGF-I. Preferiblemente el propéptido no incluye un residuo de lisina. El propéptido posee preferiblemente una longitud de hasta 30 aminoácidos. Preferiblemente X_1 es un enlace. Preferiblemente n es 0 o 6. Preferiblemente X_2 es el péptido

20 Id. de Sec. N°:7. Preferiblemente Y es Pro-Arg-Pro.

Otra realización de la invención es un IGF-I PEGilado en la lisina, que se caracteriza porque no comprende una metionina N-terminal.

25 Otra realización de la invención es una variante de IGF-I PEGilado en la lisina, en el que uno o dos aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en lisina 27, 65 y/o 68 están sustituidos independientemente por otro ami-

noácido polar, que se caracteriza porque dicha variante no comprende una metionina N-terminal.

Preferiblemente dicho(s) aminoácido(s) polar(es) es/son independientemente arginina, glutamina o asparagina, especialmente arginina.

La variante de IGF-I y las variantes preferidas de la proteína de fusión son: RKK, RKR, RRK. Las variantes de IGF-I se designan como sigue: K65 indica que el aminoácido 65 es lisina, R27 indica que el aminoácido 27 es arginina, etc. Una variante de IGF-I portadora de los aminoácidos R27, K65, K68 se designa como RKK, y los restantes aminoácidos de dicha variante RRK son los mismos que en el IGF-I de tipo salvaje de Id. de Sec. N°.1. Así, RKK es una variante de IGF-I de tipo salvaje, que se mutó en la posición 27 mediante el cambio de K a R. RKR es una variante del IGF-I de tipo salvaje, que se mutó en las posiciones 27 y 68 mediante el cambio de K a R. RRK es una variante de IGF-I de tipo salvaje, que se mutó en las posiciones 27 y 65 mediante el cambio de K a R. El IGF-I de tipo salvaje, en el que no se ha cambiado ningún aminoácido, se denomina KKK.

El IGF-I PEGilado en la lisina está preferiblemente PEGilada de forma aleatoria en los residuos de lisina 27, 65 y 68, preferiblemente mono- o diPEGilado (uno o dos PEG por molécula de IGF-I). La variante de IGF-I PEGilado en la lisina está preferiblemente mono- o diPEGilado en el(los) residuo(s) de lisina 65 y 68, preferiblemente monoPEGilado en K65 o K68. El(los) grupo(s) polietilenglicol está(n)

conjugado(s) a dicho IGF-I o variante de IGF-I mediante el(los) grupo(s) amino primario de la lisina(s).

5 El método de acuerdo con la invención comprende la preparación de un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina, teniendo dicho(s) grupo(s) polietilenglicol, preferiblemente un peso molecular total de al menos 20 kDa por IGF-I o variante de IGF-I, más preferiblemente entre alrededor de 20 y 100 kDa, y especialmente preferible de 20 a 80 kDa, haciendo reaccionar la proteína de fusión IGF-I de 10 acuerdo con la invención con polietilenglicol activado bajo condiciones en las que dicho polietilenglicol se una químicamente a dicho intermediario de IGF-I mediante el(los) grupo(s) amino primario de la(s) lisina(s) del IGF-I o variante de IGF-I. Preferiblemente el IGF-I o variante de 15 IGF-I PEGilado en la lisina está monoPEGilada. La variante está preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en RKK, RKR, RRK respecto a las posiciones de aminoácido 27, 65 y 68, respectivamente. El PEG preferiblemente posee un peso molecular medio total de 30 a 45 kDa, especialmente de 20 30 kDa o 40 kDa.

La invención además comprende composiciones farmacéuticas que contienen un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina de acuerdo con la invención, preferiblemente junto con un transportador farmacéuticamente aceptable.

25 La invención además comprende métodos para la producción de composiciones farmacéuticas que contienen un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina de acuerdo con la invención.

La invención además comprende la utilización de un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la EA.

5 La invención además comprende métodos para el tratamiento de la EA, que se caracterizan por que una cantidad farmacéuticamente efectiva del IGF-I PEGilado amino-reactivo o variante de IGF-I se administre a un paciente que necesite dicho tratamiento, preferiblemente entre una y
10 dos aplicaciones por semana.

Descripción detallada de la Invención

Se ha hallado con sorpresa que la proteasa IgA, preferiblemente la proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoea*, es capaz de escindir la secuencia de aminoácidos Y-Pro.!.Gly-Pro. Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro, o Pro-Arg-Pro. Es preferiblemente útil el sitio de escisión Pro-Pro.!.Gly-Pro (Id. de Sec. N°:15) o Pro-Arg-Pro-Pro.!.Gly-Pro (Id. de Sec. N°:11) (!. : posición de escisión). El sitio de escisión de la proteasa IgA para el proceso de acuerdo con la presente invención presenta la siguiente secuencia de aminoácidos consenso Y-Pro.!.Gly-Pro, en la que Gly-Pro son los dos primeros aminoácidos de IGF-I. Y preferiblemente representa una secuencia de aminoácidos que finaliza con los aminoácidos Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro. Tales secuencias de aminoácidos Y, especialmente Pro-Arg-Pro pueden prolongarse con otro grupo Ala o Pro-Ala, como por ejemplo en, Ala-Pro-Arg-Pro (Id. de Sec.

15
20
25

N°:12) o Pro-Ala-Pro-Arg-Pro (Id. de Sec. N°:13). Particularmente preferidas son las secuencias de escisión de aminoácidos Pro-Ala-Pro-!.Gly-Pro (Id. de Sec. N°:14), Pro-Pro-!.Gly-Pro (Id. de Sec. N°:15), Pro-Arg-Pro-Pro-!. Gly-Pro (Id. de Sec. N°:16), Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-!.Gly-Pro (Id. de Sec. N°:17) o Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-!.Gly-Pro (Id. de Sec. N°:18).

De acuerdo con la presente invención el término "proteasa IgA" incluye las proteasas que escinden de forma específica IgA y que están descritas por ejemplo por Kornfeld, S. J. y Plaut, A. G. en Rev. Infekt. Dis. 3 (1981) 521-534, como por ejemplo, la proteasa IgA1 de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2). Las proteasas IgA recombinantes, como las descritas en DE-A 36 22 221; Koomey, J.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 7881- 7885; Bricker, J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 2681-2685; Pohlner, J., et al., Nature 325 (1987) 458- 462; y Halter, R., et al., EMBO J. 3 (1984) 1595-1601, también son adecuadas. Preferiblemente dicha proteasa IgA es una proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoea*, preferiblemente de tipo 2. Preferiblemente dicha proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoea*(tipo 2) tiene la secuencia Id. de Sec. N°:26.

El gen que codifica la proteína de fusión se sitúa preferiblemente bajo el control de señales de expresión adecuadas (preferiblemente inducibles) por lo que las proteínas de fusión pueden producirse de acuerdo con los requisitos. Las células adecuadas para utilizar como células hospederas pueden ser células procariotas o eucariotas

(tanto vegetales como animales) para la producción de proteínas de fusión; aunque también son posibles los sistemas libres de células.

5 Una realización preferida del proceso de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque una célula hospedera se transforma con un DNA recombinante o un vector recombinante, en que el DNA o el vector contiene al menos una copia de un gen que codifica para la proteína de fusión de acuerdo con la invención y la célula transformada se
10 cultiva en un medio adecuado, el gen que codifica para la proteína de fusión se construye para que se exprese en la célula transformada, la proteína de fusión está PEGilada y por lo tanto se escinde con la proteasa IgA y se puede aislar el IGF-I PEGilado o variante de IGF-I.

15 La expresión de la proteína de fusión de acuerdo con la invención puede, por ejemplo, mejorarse a nivel de DNA mediante la fusión con fragmentos del gen beta-galactosidasa libre de lisinas, es decir, Y contiene una parte de una proteína beta-galactosidasa libre de lisinas.
20 Otras alternativas para aumentar la expresión de la proteína de fusión son conocidas por el experto. La purificación y separación del producto de expresión puede facilitarse mediante la fusión con otros polipéptidos, en particular, con polipéptidos o proteínas que están altamente cargadas
25 (por ejemplo, poli(Lys, Arg)) o que pueden unirse a sustancias particulares con alta afinidad (por ejemplo, estreptavidina) (véase por ejemplo, EP-A 0 089 626, EP-A 0 306 610). Los péptidos enlazantes especialmente preferidos son

los péptidos Id. de Sec. N°: 6-10, preferiblemente los que su extremo N-terminal está precedido por SHHHHHH (Id. de Sec. N°:19), NHHHHHH (Id. de Sec. N°:20) o HHHHHH (Id. de Sec. N°:21).

5 La presente invención también proporciona un ácido nucleico (recombinante) que codifica para una proteína de fusión de acuerdo con la presente invención y en que un sitio de escisión de una proteasa IgA se incorpora en la región de unión entre el propéptido y el IGF-I o variante de IGF-I.

10

Se puede obtener un DNA recombinante de acuerdo con la presente invención de una forma conocida por un experto en la materia de la biología molecular. Para este propósito, se escinde normalmente un vector que contiene una secuencia

15

de DNA que codifica para la secuencia de aminoácidos del IGF-I o variante de IGF-I con endonucleasa(s) de restricción en la región del extremo 5' de este gen y se religa con oligonucleótidos que contienen la secuencia deseada.

Además, la invención también proporciona un vector recombinante que contiene al menos una copia de un DNA recombinante de acuerdo con la presente invención. Los vectores que son adecuados como base para la expresión de proteínas en organismos procariotas son conocidos por los expertos. Este vector es preferiblemente uno que permita una alta expresión del DNA recombinante de acuerdo con la presente invención. El DNA recombinante en el vector está preferiblemente bajo el control de una señal de expresión inducible (por ejemplo, el promotor lambda, tac, lac o trp).

20

25

El vector de acuerdo con la presente invención puede estar presente de forma extracromosómica (por ejemplo, en forma de plásmido) así como integrado en el genoma del organismo hospedero (por ejemplo, bacteriófago lambda). El vector de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un plásmido. Los vectores que son adecuados en cada caso para la expresión del gen en un organismo hospedero particular son conocidos por los expertos en la materia de la biología molecular. Puede ser un vector eucariota, pero preferiblemente es un vector procariota. Ejemplos de vectores adecuados para la expresión del DNA de acuerdo con la presente invención en procariotas son, por ejemplo, los vectores pUC y pUR disponibles comercialmente.

La invención también proporciona una célula, preferiblemente una célula procariota, particularmente preferida una célula de *E. coli*, que está transformada con el DNA recombinante de acuerdo con la presente invención y/o con un vector recombinante de acuerdo con la presente invención.

Cuando la proteína de fusión se expresa en procariotas, se forman agregados ligeramente solubles (cuerpos refringentes, cuerpos de inclusión) y que son inactivos. Por lo tanto, la proteína de fusión debe transformarse en su forma activa. Utilizando procedimientos familiares a los expertos en la materia (véase por ejemplo, EP-A 0 219 874, EP A 0 114 506, WO 84/03711) se lleva a cabo en primer lugar una solubilización mediante la adición de agentes desnaturalizantes seguida de una renaturalización y, si se desea, otro paso de purificación. El tratamiento de la pro-

teína de fusión con la proteasa IgA tiene lugar después de la PEGilación de la proteína de fusión.

Las condiciones necesarias para el tratamiento del IGF-I PEGilado o variante de IGF-I para escindir con proteasas de IgA no son críticas. En este proceso es preferible, no obstante, que la proporción en peso de IGF-I PEGilado o variante de IGF-I respecto a la proteasa IgA sea de 1:1 a 500:1, preferiblemente, 100:1. La reacción tiene lugar preferiblemente en una solución acuosa tamponada con un pH de 6,5 a 8,5. La concentración de tampón está preferiblemente en el rango de 50 y 500 mmol/ l si se desea, con la adición de 0-100 mmol/ l de cloruro sódico. La escisión se lleva a cabo preferiblemente a temperatura ambiente durante entre al menos 60 min. y hasta 5 días, preferiblemente entre 24 y 72 h.

Tras la solubilización, renaturalización, PEGilación y escisión con proteasa IgA, el producto de escisión PEGilado obtenido de esta manera se purifica preferiblemente por medio de una cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y/o fraccionamiento por tamaño. El IGF-I PEGilado o variante de IGF-I producido de esta manera está libre de metionina en la posición -1 y preferiblemente libre de otras proteínas, como el IGF-I o variante de IGF-I no PEGilado, y preferiblemente libre de propéptido PEGilado en el extremo N-terminal, en un 5%(p/p) o menos.

"IGF-I o variante de IGF-I PEGilado" o "PEGilación amino-reactiva" tal como se utiliza aquí, significa que un

IGF-I o variante de IGF-I está covalentemente unida a los grupos polietilenglicol mediante acoplamiento amino-reactivo. Los grupo(s) PEG está(n) unidos a los sitios de la molécula IGF-I o variante de IGF-I que son los grupos ϵ -amino primarios de las cadenas laterales de lisina. También es posible que la PEGilación suceda además en el grupo α -amino N-terminal del propéptido. Debido al método de síntesis y la proteína de fusión utilizada, el IGF-I o variante de IGF-I PEGilado puede consistir en una mezcla, en la que los sitios de PEGilación pueden ser diferentes en diferentes moléculas o pueden ser sustancialmente homogéneos respecto a la cantidad de cadenas laterales de polietilenglicol por molécula y/o el sitio de PEGilación en la molécula. Preferiblemente el IGF-I o variante de IGF-I están mono- y/o diPEGilados.

La PEGilación amino-reactiva tal como se utiliza aquí designa un método de unión aleatoria de cadenas de polietilenglicol a los grupo(s) amino primario(s) de la lisina del IGF-I o variante de IGF-I, mediante el uso de reactivos (activados) de polietilenglicol, preferiblemente mediante el uso de ésteres de N-hidroxisuccinimilo, preferiblemente de metoxipolietilenglicol. La reacción de acoplamiento une el polietilenglicol a los grupos ϵ -amino primarios reactivos de los residuos de lisina y opcionalmente al grupo α -amino del aminoácido N-terminal de la proteína de fusión. Tal conjugación de grupo amino de PEG a las proteínas se conoce bien en la materia. Por ejemplo, la revisión de tales métodos se describe en Veronese, F.M., Biomaterials 22 (2001)

405-417. De acuerdo con Veronese, la conjugación de PEG a los grupos amino primarios de las proteínas puede realizarse utilizando PEG activado que produce una alquilación de dichos grupos amino primarios. Para esta reacción, pueden
5 utilizarse PEG activados alquilantes, por ejemplo PEG aldehído, PEG-cloruro de tresilo o PEG epóxido. También son reactivos útiles los PEG acilantes como los ésteres de hidroxisuccinimidilo de los PEG carboxilados o PEG en el que el grupo hidroxilo terminal está activado por cloroformatos o carbonilimidazol. Otros reactivos de PEG útiles son
10 los PEG con porciones de aminoácido. Tales reactivos pueden contener las llamadas ramas de PEG, en las que al menos dos moléculas de PEG idénticas o diferentes están enlazadas mediante un espaciador peptídico (preferiblemente lisina) y,
15 por ejemplo, unido a IGF-I o variante de IGF-I como un carboxilato activado del espaciador de lisina.

"PEG o polietilenglicol" tal como se utiliza aquí indica un polímero soluble en agua que está disponible comercialmente o que puede prepararse mediante polimerización
20 por apertura del anillo de etilenglicol de acuerdo con los métodos conocidos en la materia (Kodera, Y., et al., Progress in Polymer Science 23 (1998) 1233-1271; Francis, G.E., et al., Int. J. Hematol. 68 (1998) 1-18). El término "PEG" se utiliza ampliamente para abarcar cualquier molécula
25 de polietilenglicol, en la que el número de unidades de etilenglicol es de al menos 460, preferiblemente entre 460 y 2300, y especialmente preferible entre 460 y 1840 (230 unidades de PEG se refiere a un peso molecular de alrededor

de 10 kDa). El número máximo de unidades de PEG está sólo limitado por la solubilidad del IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina. Normalmente no se utilizan los PEG que son mayores que los PEG que contienen 2300 unidades.

5 Preferiblemente, un PEG utilizado en la invención termina en su extremo con hidroxilo o metoxi (methxi PEG, mPEG) y está en el otro extremo covalentemente unido a una porción enlazante mediante un puente de éter oxígeno. El polímero de PEG puede ser lineal o ramificado. Preferiblemente el

10 polímero de PEG es ramificado. Los PEG ramificados se describen, por ejemplo, en Veronese, F.M., et al., Journal of Bioactive and Compatible Polymers 12 (1997) 196-207. Los reactivos de PEG útiles están, por ejemplo, disponibles de Nektar Therapeutics (www.nektar.com). Los PEG ramificados

15 pueden prepararse, por ejemplo, mediante la adición de óxido de polietileno a varios polioles, incluyendo glicerol, pentaeritriol y sorbitol. Por ejemplo, un PEG ramificado de cuatro brazos puede prepararse a partir de pentaeritriol y óxido de etileno. Los PEG ramificados normalmente presentan

20 entre 2 y 8 brazos y están descritos en, por ejemplo, las patentes EP-A 0 473 084 y US N° 5.932.462. Especialmente preferidos son los PEG con dos cadenas laterales de PEG unidas mediante el grupo amino primario de una lisina (abreviado como PEG2) (Monfardini, C., et al., Bioconjugate

25 Chem. 6 (1995) 62-69).

Puede utilizarse PEG de cualquier masa molecular según sea más práctico, por ejemplo, entre alrededor de 20 kDaltons (Da) y 100 kDa (n es de 460 a 2300). El número de uni-

dades repetitivas "n" en el PEG es aproximado para la masa molecular descrita en Daltons. Por ejemplo, si dos moléculas de PEG están unidas a un enlazante, en la que cada molécula de PEG posee la misma masa molecular de 10 kDa (cada n es de alrededor de 230), entonces la masa molecular total de PEG en el enlazante es de alrededor de 20 kDa. Las masas moleculares del PEG unido al enlazante también son diferentes, por ejemplo, de dos moléculas en un enlazante, una molécula de PEG puede ser de 5 kDa y una molécula de PEG puede ser de 15 kDa. La masa molecular siempre indica la media de la masa molecular.

En los ejemplos posteriores, se describen algunos reactivos preferidos para la producción de IGF-I o variante de IGF-I amino-reactivo. Se entiende que las modificaciones, por ejemplo, basadas en los métodos descritos por Veronese, F.M., Biomaterials 22 (2001) 405-417, pueden realizarse en los procedimientos en tanto que el proceso produzca un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina de acuerdo con la invención.

La invención proporciona los métodos para la producción de las formas PEGiladas de IGF-I o variante de IGF-I con sus propiedades mejoradas. Tales IGF-I o variantes de IGF-I PEGilados en la lisina contienen PEG lineal o ramificado de forma aleatoria unido a ésta, en la que el peso molecular total de todos los grupos PEG en el IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina es preferiblemente entre alrededor de 20 y 80 kDa. Será obvio para un experto en la materia que son posibles pequeñas desviaciones en este ran-

go de peso molecular mientras que el IGF-I o variante de IGF-I PEGilado muestre actividad en la disminución de los niveles de péptido Abeta en el cerebro. También el PEG con pesos moleculares de más de 80 kDa resulta en una mayor bioadisponibilidad. No obstante, se espera que tal actividad disminuya a medida que el peso molecular aumente debido a una reducción de la activación del receptor de IGF-I y del transporte en la barrera hemato-encefálica. Por lo tanto, el rango de 20 a 100 kDa para el peso molecular de PEG debe entenderse como el rango optimizado para un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina útil para un tratamiento eficaz de un paciente que padece la EA.

Se produce preferiblemente una variante de IGF-I mono-PEGilada, seleccionada del grupo que consiste en RKK, RKR y RRR en la que el grupo PEG ramificado posee un peso molecular de 30-45, preferiblemente de 40-45 kDa (alrededor de 920 unidades de PEG). Por ejemplo, en base al peso molecular medio de 44 kDa para el PEG y un peso molecular de 7,6 kDa para el IGF-I, el peso molecular medio calculado para dicho monoPEG-IGF-I es de alrededor de 51,6 kDa. Especialmente preferido es el uso de un éster de PEG ramificado activado de N-hidroxisuccinimidilo (mPEG2-NHS) de un peso molecular de 40 kDa (Monfardini, C., et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69; Veronese, F. M., et al., J. Bioactive Compatible Polymers 12 (1997) 197-207; Patente US 5.932.462). También se produce preferiblemente un IGF-I monoPEGilado en el que el PEG posee un peso molecular medio de 30 o 40 kDa.

Tal como se utiliza aquí, "peso molecular" significa el peso molecular medio del PEG.

Las siguientes formas PEGiladas de IGF-1 o variante de IGF-I son productos preferido y disponibles mediante los
5 métodos de acuerdo con la invención:

- La variante monoPEGilada de IGF-I K68, preferiblemente la variante RRK o RKK, más preferiblemente la variante RRK, en la que el grupo PEG posee un peso molecular de 20 a 80 kDa (460 a 1840 unidades de PEG);

10 - La variante monoPEGilada de IGF-I K65, preferiblemente la variante RKR o RKK, más preferiblemente la variante RKR, en la que el grupo PEG posee un peso molecular de 20 a 80 kDa (460 a 1840 unidades de PEG);

- La variante diPEGilada de IGF-I, preferiblemente la
15 variante RKK, en la que los grupos PEG poseen un peso molecular de alrededor de 10 a 50 kDa (230 a 1150 unidades de PEG) cada uno;

y mezclas de los mismos;

- La variante monoPEGilada de IGF-I K68, preferiblemente
20 mente la variante RRK o RKK, más preferiblemente la variante RRK, que comprende un grupo PEG2 de un peso molecular de 40 kDa;

- La variante monoPEGilada de IGF-I K65, preferiblemente
25 mente la variante RKR o RKK, más preferiblemente la variante RKR, que comprende un grupo PEG2 de un peso molecular de 40 kDa;

- El IGF-I monoPEGilado, en el que el grupo PEG posee un peso molecular de 20 a 80 kDa (460 a 1840 unidades de

PEG);

- El IGF-I diPEGilado, en el que los grupos PEG poseen un peso molecular de alrededor de 10 a 50 kDa (230 a 1150 unidades de PEG) cada uno;

5 - El IGF-I monoPEGilado, que comprende un grupo PEG2 de un peso molecular de 40 kDa.

El IGF-I PEGilado o variante de IGF-I es sustancialmente homogéneo. La preparación puede contener pequeñas cantidades de proteína sin reaccionar (es decir, a las que le falta el grupo PEG). Tal como se determinó mediante el mapeo peptídico, la pureza de la variante es de al menos del 90% (p/p). Se puede realizar, además, una posterior purificación de tales preparaciones, incluyendo la separación de los IGF-I o variante de IGF-I mono- y/o diPEGilados, mediante los métodos de purificación normales, preferiblemente mediante cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrofóbica y/o mediante cromatografía de intercambio iónico, especialmente mediante cromatografía de intercambio catiónico.

20 "MonoPEGilado" tal como se utiliza aquí significa que el IGF-I o variante de IGF-I está PEGilado en sólo una lisina por molécula de IGF-I o variante de IGF-I.

Los "PEG activados o reactivos PEG activados" son bien conocidos en el estado de la materia. Preferiblemente se utilizan PEG activados electrofílicamente como los ésteres de succinimidilo de polietilenglicol del ácido alcoxibutírico ("alcoxi inferior-PEG-SBA") o los ésteres de succinimidilo de polietilenglicol del ácido alcoxi propiónico ("al-

coxi inferior-PEG-SPA") o PEG activados de N-hidroxisuccinimida. Se puede utilizar cualquier método convencional para hacer reaccionar un éster activado con una amina para formar una amida. En la reacción del PEG activa-
5 do con IGF-I, el éster de succinimidilo del ejemplo es un grupo saliente que provoca la formación de la amida. La utilización de ésteres de succinimidilo para producir conjugados con proteínas se describe en la Patente US N° 5.672.662.

10 Las condiciones de reacción utilizadas poseen una influencia sobre la cantidad relativa de IGF-I o variantes de IGF-I PEGilados de forma diferente. Si se manipulan las condiciones de reacción (por ejemplo, la proporción de re-
activos, pH, temperatura, concentración de proteína, tiempo
15 de reacción, etc.), pueden variar las cantidades relativas de las diferentes especies PEGiladas. Preferiblemente la reacción se realiza en una solución acuosa tamponada a pH 8-10, opcionalmente puede contener hasta un 30% (v/v) de etanol. La relación molar de proteína:PEG está preferible-
20 mente entre 1:1 y 1:6, preferiblemente entre 1:2 y 1:5. La temperatura de reacción y el tiempo de reacción puede variar de acuerdo con el conocimiento del experto, en los que un aumento de la temperatura y de los tiempos de reacción resultan en un aumento de la PEGilación. Si se producen
25 proteínas monoPEGiladas, se prefiere por lo tanto trabajar entre 4°C y 22°C y durante hasta 30 minutos o hasta 60 minutos. Cuando el reactivo de PEGilación se combina con IGF-I o variante de IGF-I en un tampón de reacción, que preferi-

blemente consiste en borato sódico 50 mM y etanol al 25%, a un pH de alrededor de 9,0 - 9,5, con una proporción de proteína:PEG de alrededor de 1:3 a 1:4, y una temperatura de reacción de 4°C, se produce una mezcla de mono-, di- y cantidades traza de las especies tri-PEGiladas dependiendo de la presencia de residuos Lys en la proteína.

El IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina de acuerdo con la invención, puede prepararse mediante la reacción covalente de un grupo amino primario de lisina de un IGF-I o variante de IGF-I con un reactivo bifuncional para formar un intermediario con un enlace amida, y la reacción covalente del intermediario que contiene el enlace amida con un derivado de polietilenglicol activado para formar un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina. En el anterior proceso, el reactivo bifuncional es preferiblemente N-succinimidil-S-acetiltiopropionato o N-succinimidil-S-acetiltioacetato, y el derivado de polietilenglicol activado se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en yodo-acetil-metoxi-PEG, metoxi-PEG-vinilsulfona, y metoxi-PEG-maleimida.

Los derivados de PEG activados, son conocidos en la materia y están descritos en, por ejemplo, Morpurgo, M., et al., J. Bioconjugate Chem. 7 (1996) 363-368 para PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal o ramificada son adecuadas para la preparación de los compuestos de fórmula I. Ejemplos de PEG reactivos son yodo-acetil-metoxi-PEG y metoxi-PEG-vinilsulfona. La utilización de estas sustancias yodo-activadas es conocido en la materia y

están descritas en, por ejemplo, Hermanson, G.T., en Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996), págs. 147-148.

5 Un "aminoácido polar" tal como se utiliza aquí, se refiere a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), histidina (H), asparagina (N), glutamina (Q), arginina (R), serina (S) y treonina (T). La lisina también es un aminoácido polar, pero se excluye, ya que la lisina se sustituye
10 de acuerdo con la invención. La arginina se utiliza preferiblemente como un aminoácido polar.

Formulaciones Farmacéuticas

El IGF-I o variante de IGF-I PEGilado producido de acuerdo con la invención proporciona una estabilidad mejorada en la circulación, permitiendo un acceso sostenido a
15 los receptores de IGF-I a lo largo del organismo con intervalos de aplicación bajos.

Los compuestos de la presente invención pueden formularse de acuerdo con los métodos para la preparación de composiciones farmacéuticas, y dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia. Para la producción de tales composiciones, un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado de acuerdo con la invención, se combina en una mezcla con un transportador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente
20 mediante diálisis o diafiltración frente una solución acuosa que contiene los ingredientes deseados de las composiciones farmacéuticas. Tales transportadores aceptables se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical
25

Sciences, 18ª edición, 1990, Mack Publishing Company, editado por Oslo et al. (por ejemplo, págs. 1435-1712). Las composiciones típicas contienen una cantidad efectiva de la sustancia de acuerdo con la invención, por ejemplo entre
5 alrededor de 0,1 y 100 mg/ ml, junto con una cantidad adecuada de un transportador. Las composiciones pueden administrarse por vía parenteral. El IGF-I o variante de IGF-I PEGilado de acuerdo con la invención se administra preferiblemente por vía intraperitoneal, subcutánea, intravenosa o
10 intranasal.

Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden prepararse de acuerdo con los métodos conocidos en la materia. Normalmente, las soluciones de IGF-I o variante de IGF-I PEGilado se dializan o diafiltran frente
15 al tampón que se va a utilizar en la composición farmacéutica y la concentración final de proteína se ajusta mediante concentración o dilución.

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, pero el verdadero
20 alcance de la misma se describe en las reivindicaciones anexadas. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos descritos, sin alejarse del espíritu de la invención. Los nombres de los aminoácidos están abreviados utilizando tanto el código de una letra (por ejemplo
25 R) o el código de tres letras (por ejemplo Arg).

Listado de secuencias

Id. de Sec. N°: 1 secuencia de aminoácidos de IGF-I humano (aminoácidos 49-118 de SwissProt P01343).

Id. de Sec. N°: 2 secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAG_R K27R K65R K68

Id. de Sec. N°: 3 secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAEE_F1 K27R K65R K68

5 **Id. de Sec. N°: 4** secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F1 K27R K65R K68

Id. de Sec. N°: 5 secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F2 K27R K65R K68

Id. de Sec. N°: 6 -10 enlazante

10 **Id. de Sec. N°: 11-18** secuencias de escisión

Id. de Sec. N°: 19-21 otras

Id. de Sec. N°: 22 secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAG_R K27R K65 K68R

15 **Id. de Sec. N°: 23** secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAEE_F1 K27R K65 K68R

Id. de Sec. N°: 24 secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F1 K27R K65 K68R

Id. de Sec. N°: 25 secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F2 K27R K65 K68R

20 **Id. de Sec. N°: 26** secuencia de aminoácidos de la proteasa IgA1 de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2).

Descripción de las Figuras

25 **Fig 1: Análisis peptídico de la proteína de fusión monoPEGilada.**

Análisis SDS-PAGE de proteína de fusión plegada antes y después de la PEGilación. Carril 1, mezcla de proteínas estándar (aprotinina de pulmón bovino, 6,0 kDa; lisozima de

huevo blanco de gallina, 14,4 kDa; inhibidor de la tripsina de soja, 21,5 kDa; anhidrasa carbónica de eritrocito bovino, 31,0 kDa; lactato deshidrogenasa de músculo porcino, 36,5 kDa; glutámico deshidrogenasa de hígado bovino, 55,4 kDa; albúmina de suero bovino, 66,3 kDa; fosforilasa b de músculo de conejo, 97,4 kDa; β -galactosidasa de *E.coli*, 97,4 kDa; miosina de músculo de conejo, 200 kDa); carril 2, pro-IGF-I antes de la pegilación; carril 3, pro-IGF-I después de la pegilación.

10 **Fig. 2: Análisis peptídico de la variante de IGF-I monoPEGilada.**

Análisis SDS-PAGE de proteína de fusión PEGilada antes y después de la de la escisión con IgA. Carril 1, mezcla de proteínas estándar (igual que en la Figura 1); carril 2, mezcla de reacción antes de la escisión con la Proteasa IgA; carril 3, mezcla de reacción después de la escisión con la Proteasa IgA.

Fig. 3: SDS PAGE.

20 Análisis SDS-PAGE de proteína de fusión plegada antes y después de la PEGilación.

Carril 1, mezcla de proteínas estándar (igual que en la Figura 1); carril 2, mezcla de reacción antes de la CII; carril 3, flujo a través de CII; carriles 4-19, fracciones únicas eluidas de la CII.

25 **Fig. 4: Disminución In vivo del Abeta mediante PEG-RRK en ratones B6.152H.**

Se trataron ratones B6.152H doble transgénicos de 9-10 meses de edad con vehículo (NaCl) o con PEG-RRK (5 μ g/ kg

s.c., dos veces a la semana) durante 14 días. Se prepararon extractos solubles de cerebro y se evaluaron los niveles de APP, Abeta y Actina como se describe. Las proporciones de APP/Actina, Abeta/Actina y Abeta/APP se calcularon y se expresaron como % del control. A, APP/Actina; B, Abeta/Actina, C, Abeta/APP. Las gráficas superiores muestran puntos de datos de animales individuales, las gráficas inferiores muestran representación en barras (medias $\pm$ EEM) incluyendo las diferencias estadísticas (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs. control sin tratar, $n=10$).

Ejemplos

Ejemplo 1

Se produjeron los siguientes mutantes (lo que comprende la variante IGF-I - RRK) con los péptidos de (fórmula I)):

Mutante	X ₁	X ₂	n	Y
Px3036_ IAG K27R K65R K68	ninguno	KAKRFKKH	6	PRPP
Px3036_IAG_R K27R K65R K68	ninguno	RARRFRRH	6	PRPP
Px3036_IAEE_F1 K27R K65R K68	S	NTEHNREH	6	PRPP
Px3036_IAFX_F1 K27R K65R K68	N	IEGRH	6	PRPP
Px3036_IAFX_F2 K27R K65R K68	N	TEFENIEH	6	PRPP

Preparación de variante IGF-I-mono-PEGilada K68 (variante RRK)

El vector de expresión y la cepa *E. coli* utilizados, se describen en la EP 0 972 838. A partir de un clon de *E. coli*, que expresa la proteína de fusión px3036_IAG_R K27R K65R K68, px3036_IAEE_F1 K27R K65R K68, px3036_IAFX_F1 K27R K65R K68 o px3036_IAFX_F2 K27R K65R K68, cultivado en una

placa de agar selectiva, se transfirió una punta de inóculo a (100 ml) de medio selectivo y se cultivó durante 13 h a 37°C hasta una densidad óptica (578 nm) de 2 - 4. Este cultivo se guardó en hielo durante las siguientes 6 horas antes de la inoculación automatizada del cultivo principal que se realizó a 37°C. La expresión del mutante IGF-I se inició a una densidad óptica (578 nm) de 50 con la adición de IPTG 1,0 mM. La fermentación total duró hasta 16 horas. La cantidad de proteína se determinó mediante densitometría comparando la intensidad volumétrica de la banda de proteína del producto con la banda de un IGF estándar en un gel de SDS-PAGE. El medio de cultivo se separó mediante centrifugación.

Para obtener material de cuerpos de inclusión (CI) purificado, la biomasa recogida de la fermentación estándar se trató con el siguiente procedimiento: la biomasa se resuspendió con tampón TrisMgSO₄ pH7 y se suplementó con 0,3 g de lisozima /100 g de biomasa en peso seco y 5 U de Benzonasa /1 g de biomasa en peso seco. Se incubaron durante 20 min. y se homogeneizaron. Se añadieron 30 U de Benzonasa /1 g de biomasa en peso seco y se incubó durante 60 min. a 37°C. Se añadió 0,5 L de tampón Brij/ litro y se incubó durante 30 min. a TA. Tras la centrifugación el botón se resuspendió en 300 ml de tampón Tris-EDTA /100 g de biomasa en peso húmedo (CI purificados en peso húmedo), se incubó durante 30 min. a TA y se centrifugó. Se solubilizaron 1 g de CI/ litro a temperatura ambiente durante la noche en guanidina-HCl 6,8 M, TrisHCl 0,1 M, DTT 0,1 M, pH 8,5. La

solución turbia se dializó a 4°C frente a guanidina-HCl 6,8 M, TrisHCl 0,1 M, pH 8,0. Tras la diálisis, los componentes insolubles se eliminaron por centrifugación. Se realizó el plegamiento mediante la dilución de 50 veces de la solución de pro-IGF-I en arginina 0,8 M, TrisHCl 0,1 M, guanidina-HCl 0,1 M, GSH 1 mM, GSSG 1 mM, pH 8,5 a temperatura ambiente. Tras dos horas, la solución se suplementó con cloruro sódico 2 M, se filtró y se aplicó a una tasa de flujo de 10 ml/min a una columna de CIH (Butil Sefarosa 4 Flujo rápido; GE, Amersham Biosciences), que se equilibró a temperatura ambiente con tampón, que contiene NaCl 2 M, arginina 0,8 M, TrisHCl 0,1 M, guanidina-HCl 0,1 M, pH 8,5. La columna se lavó con tampón de equilibrado hasta alcanzar la línea basal y después se eluyó con diez volúmenes de columna de un gradiente lineal, empezando con tampón de equilibrado y finalizando con tampón que contiene TrisHCl 0,1 M, etilenglicol al 5%, pH 8,5. Las fracciones eluidas se analizaron mediante cromatografía en fase reversa de alta resolución (rpHPLC). Las fracciones que contenían proteína con los puentes SS correctamente formados, se agruparon. El conjunto de fracciones se dializó a 4°C frente a borato sódico 50 mM, pH 9,0. Se solubilizó PEG ramificado de 40 kDa activado con NHS (éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) de mPEG PM 20.000 (mPEG2NHS, US 5,932,462, Nektar Shearwater Polymers, Huntsville, AL)) en HCl 2 mM frío y se añadió inmediatamente a la solución de proteína dializada (proporción molar reactivo-PEG/proteína 2:1). Tras 1 h y 2 h de incubación en hielo, se añadió la misma cantidad de solu-

ción acídica de mPEG2-NHS a la mezcla de reacción proteí-
na/PEG. Tras una tercera adición de la misma cantidad de
solución mPEG2-NHS acídica (exceso molar total de 6 veces
el reactivo PEG), se incubó la reacción en hielo durante
5 otra hora más. La reacción se paró mediante la adición de
cloruro de amonio sólido, se incubó durante otros 45 minu-
tos y después se ajustó a pH 8,0 (véase la Figura 1). La
mezcla de reacción de proteína/PEG se suplementó con pro-
teasa IgA1 de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2) (proporción p/p
10 1:50) y se incubó durante la noche a temperatura ambiente
(véase Figura 2). La mezcla de reacción se diluyó 1:2 con
ácido acético 50 mM pH 4,5 y después se aplicó a una colum-
na de intercambio de cationes (MacroCap SP support; GE,
Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), que había sido
15 equilibrada con ácido acético 50 mM. La columna se lavó
hasta alcanzar la línea basal y después se eluyó con 20 vo-
lúmenes de columna de un gradiente lineal, comenzando con
ácido acético 50 mM y finalizando con ácido acético 50 mM
suplementado con cloruro sódico 1 M. Las fracciones eluídas
20 se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que conte-
nían una sola banda con un tamaño molecular relativo esti-
mado de alrededor de 60 kDa, se agruparon como IGF-I mono-
PEGilado K68 (véase Figura 3). La identidad de IGF-I mono-
PEGilado K68 se verificó mediante cromatografía analítica
25 de exclusión por tamaño (CET) con detección de la disper-
sión de la luz estática, análisis por EM de las digestiones
con tripsina, análisis por EM de las digestiones Asp-N y
análisis de la CII de cationes. No se pudieron encontrar

isovariantes de PEGilación al margen de IGF-I monoPEGilado K68.

Ejemplo 2

5 Se produjeron los siguientes mutantes (lo que compren-
de la variante IGF-I RKR) con los propéptidos de (fórmula
I)):

Mutante	X ₁	X ₂	n	Y
Px3036_ IAG K27R K65 K68R	ninguno	KAKRFKKH	6	PRPP
Px3036_IAG_R K27R K65 K68R	ninguno	RARRFRRH	6	PRPP
Px3036_IAEE_F1 K27R K65 K68R	S	NTEHNREH	6	PRPP
Px3036_IAFX_F1 K27R K65 K68R	N	IEGRH	6	PRPP
Px3036_IAFX_F2 K27R K65 K68R	N	TEFENIEH	6	PRPP

**Preparación de la variante IGF-I-mono-PEGilada K65
(variante RKR)**

10 El vector de expresión y la cepa *E. coli* utilizados,
se describen en la EP 0 972 838. A partir de un clon de *E.*
coli, que expresaba la proteína de fusión px3036_IAG_R K27R
K65 K68R, px3036_IAEE_F1 K27R K65 K68R, px3036_IAFX_F1 K27R
K65 K68R o px3036_IAFX_F2 K27R K65 K68R, cultivado en una
15 placa de agar selectiva, se transfirió una punta de inóculo
a (100 ml) de medio selectivo y se cultivó durante 13 h a
37°C hasta una densidad óptica (578 nm) de 2 - 4. Este cul-
tivo se guardó en hielo durante las siguientes 6 horas an-

tes de la inoculación automatizada del cultivo principal que se realizó a 37°C. La expresión del mutante IGF-I se inició a una densidad óptica (578 nm) de 50 con la adición de IPTG 1,0 mM. La fermentación total duró hasta 16 horas.

5 La cantidad de proteína se determinó mediante densitometría, comparando la intensidad volumétrica de la banda de proteína del producto con la banda de un IGF estándar en un gel de SDS-PAGE. El medio de cultivo se separó mediante centrifugación.

10 Para obtener material de cuerpos de inclusión (CI) purificado, la biomasa recogida de la fermentación estándar se trató con el siguiente procedimiento: la biomasa se re-suspendió con tampón TrisMgSO₄ pH7 y se suplementó con 0,3 g de lisozima /100 g de biomasa en peso seco y 5 U de Benzo-

15 nasa /1 g de biomasa en peso seco, se incubaron durante 20 min. y se homogeneizaron. Se añadieron 30 U de Benzonasa /1 g de biomasa en peso seco y se incubó durante 60 min. a 37 °C. Se añadió 0,5 L de tampón Brij/ litro y se incubó durante 30 min. a TA. Tras la centrifugación el botón se re-

20 suspendió en 300 ml de tampón Tris-EDTA /100 g de biomasa en peso húmedo (CI purificados en peso húmedo), se incubó durante 30 min. a TA y se centrifugó. Se solubilizaron 1 g de CI/ litro a temperatura ambiente durante la noche en guanidina-HCl 6,8 M, TrisHCl 0,1 M, DTT 0,1 M, pH 8,5. La

25 solución turbia se dializó a 4°C frente a guanidina-HCl 6,8 M, TrisHCl 0,1 M, pH 8,0. Tras la diálisis, los componentes insolubles se eliminaron por centrifugación. Se realizó el plegamiento mediante la dilución de 50 veces de la solución

de pro-IGF-I en arginina 0,8 M, TrisHCl 0,1 M, guanidina-HCl 0,1 M, GSH 1 mM, GSSG 1 mM, pH 8,5 a temperatura ambiente. Tras 2 a 48 horas, preferiblemente tras 2 horas, la solución se suplementó con cloruro sódico 2 M, se filtró y se aplicó a una tasa de flujo de 10 ml/ min a una columna de CIH (Butil Sefarosa 4 Flujo rápido; GE, Amersham Biosciences) que se equilibró a temperatura ambiente con tampón, que contiene NaCl 2 M, arginina 0,8 M, TrisHCl 0,1 M, guanidina-HCl 0,1 M, pH 8,5. La columna se lavó con tampón de equilibrado hasta alcanzar la línea basal y después se eluyó con diez volúmenes de columna de un gradiente lineal, empezando con tampón de equilibrado y finalizando con tampón que contiene TrisHCl 0,1 M, etilenglicol al 5%, pH 8,5. Las fracciones eluídas se analizaron mediante cromatografía en fase reversa de alta resolución (rpHPLC). Las fracciones que contenían proteína con los puentes SS correctamente formados, se guardaron juntas. El conjunto de fracciones se dializó a 4°C frente a borato sódico 50 mM, pH 9,0. Se solubilizó PEG ramificado de 40 kDa activado con NHS (éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) de mPEG PM 20.000 (mPEG2NHS, US 5,932,462, Nektar Shearwater Polymers, Huntsville, AL)) en HCl 2 mM frío y se añadió inmediatamente a la solución de proteína dializada (proporción molar reactivo-PEG/proteína 2:1). Tras 1 h y 2 h de incubación en hielo, se añadió la misma cantidad de solución acídica de mPEG2-NHS a la mezcla de reacción proteína/PEG. Tras una tercera adición de la misma cantidad de solución mPEG2-NHS acídica (exceso molar total de 6 veces el reactivo PEG), se incubó

la reacción en hielo durante otra hora más. La reacción se paró mediante la adición de cloruro de amonio sólido y se incubó durante otros 45 minutos y después se ajustó a pH 8,0 (véase la Figura 1). La mezcla de reacción de proteína/PEG se suplementó con proteasa IgA1 de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2) (proporción p/p 1:50) y se incubó durante la noche a temperatura ambiente (véase Figura 2). La mezcla de reacción se diluyó 1:2 con ácido acético 50 mM pH 4,5 y después se aplicó a una columna de intercambio de cationes (MacroCap SP support; GE, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), que había sido equilibrada con ácido acético 50 mM. La columna se lavó hasta alcanzar la línea basal y después se eluyó con 20 volúmenes de columna de un gradiente lineal, comenzando con ácido acético 50 mM y finalizando con ácido acético 50 mM suplementado con cloruro sódico 1 M. Las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían una sola banda con un tamaño molecular relativo estimado de alrededor de 60 kDa, se juntaron como IGF-I monoPEGilado K65. La identidad de IGF-I monoPEGilado K65 se verificó mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (CET) con detección de la dispersión de la luz estática, análisis por EM de las digestiones con tripsina, análisis por EM de las digestiones Asp-N y análisis de la CII de cationes.

25 Ejemplo 3

Reducción de Abeta soluble en cerebro mediante la variante IGF-I-monoPEGilada K68 RRK *in vivo*

Para la evaluación de la potencia de la variante IGF-

I-monoPEGilada K68 RRK (40kD, PEG2) (PEG-RRK) para disminuir los niveles de Abeta soluble, se trataron de forma repetitiva ratones B6.152H de 9-10 meses de edad (ratones dobles transgénicos que expresan los mutantes humanos APP y PS2) con una carga pesada de placas amiloides, con una inyección s.c., dos veces por semana, de 5 μ g/ kg de PEG-RRK. Se detectaron los niveles de APP cortical, Abeta y Actina tras 14 días. La proporción de APP/actina no cambió significativamente con PEG-RRK (Fig. 4A) sugiriendo que el PEG-RRK no tiene efecto en la expresión del transgén tras 14 días. Por el contrario, las proporciones Abeta/Actina (Fig. 4B) y Abeta/APP (Fig. 4C) disminuyeron de forma significativa gracias a PEG-RRK. Esto indica un efecto positivo de PEG-RRK sobre el aclaramiento de Abeta, independiente de su producción por el transgén.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de un IGF-I o una variante de IGF-I PEGilado en la lisina, y dicha variante
5 comprende uno o dos aminoácido(s) seleccionados del grupo que consiste en lisina 27, 65 y/o 68, que están sustituidos independientemente por otro aminoácido polar, que se caracteriza por

a) cultivar una célula hospedera procariota que comprende un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende dicho IGF-I o variante de IGF-I unida por el extremo N-terminal al C-terminal de un propéptido,

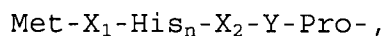
b) en el que dicho propéptido finaliza en el extremo C-terminal con los aminoácidos -Y-Pro, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro, o Pro-Arg-Pro,

c) recuperar y PEGilar dicha proteína de fusión,

d) escindir dicha proteína de fusión PEGilada con la proteasa IgA, y

e) recuperar dicho IGF-I PEGilado o variante de IGF-I.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza porque el propéptido se muestra mediante la
25 fórmula



en la que

- Met indica metionina

- X_1 es un enlace, serina o asparagina
 - His es histidina,
 - n es un número de 0 a 10,
 - X_2 es un péptido enlazante, seleccionado de entre
- 5 el grupo que consiste en los péptidos Id. de Sec. N°: 6-10,
- Pro es prolina, y
 - Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.

10 3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, que se caracteriza porque dicho propéptido no comprende un residuo de lisina.

4. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, que se caracteriza porque dicho(s) aminoácido(s) polar(es) es/ son independientemente arginina, glutamina o

15 asparagina.

5. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, que se caracteriza porque la variante de IGF-I PEGilada en la lisina está mono- o diPEGilada en el(los) residuo(s)

20 de lisina 65 y 68.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que se caracteriza porque la variante de IGF-I PEGilada en la lisina es RRK y dicha variante está monoPEGilada en el residuo de lisina 68 o la variante de IGF-I PEGilado en la

25 lisina es RKR y dicha variante está monoPEGilada en el residuo de lisina 65.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que se caracteriza porque la variante de IGF-I PEGilada en la

lisina es RKK y dicha variante está mono- o diPEGilada en los residuos de lisina 65 y 68.

5 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que se caracteriza porque la variante de IGF-I PEGilada en la lisina es una mezcla de RRK, RKR o RKK y dicha variante está mono- o diPEGilada en el(los) residuo(s) de lisina 65 y 68.

10 9. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, que se caracteriza porque el IGF-I PEGilado en la lisina está aleatoriamente mono- o diPEGilado.

10. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9, que se caracteriza porque dicho PEG presenta un peso molecular total de alrededor de 20 a 100 kDa.

15 11. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, que se caracteriza porque el(los) grupo(s) polietilenglicol es(son) grupo(s) polietilenglicol ramificado(s).

20 12. Una proteína de fusión que comprende un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina, y dicha variante comprende uno o dos aminoácido(s) seleccionados de entre el grupo que consiste en lisina 27, 65 y/o 68, y están sustituidos independientemente por otro aminoácido polar, unido del extremo N-terminal al C-terminal de un propéptido, que se caracteriza porque dicho propéptido finaliza en C-terminal con los aminoácidos -Y-Pro, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro, o Pro-Arg-Pro.

25 13. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 12, que se caracteriza porque dicho propéptido posee

una longitud de hasta 30 aminoácidos.

14. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, que se caracteriza por la fórmula

Met-X₁-His_n-X₂-Y-Pro-[IGF-I o variante de IGF-I],

5 en la que

• IGF-I indica IGF-I humano y variante de IGF-I indica IGF-I, en el que uno o dos aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste en lisina 27, 65 y/o 68 están sustituidos independientemente por otro aminoácido polar,
10

• Met indica metionina,
• X₁ es un enlace, serina o asparagina ,
• His es histidina,
• n es un número de 0 a 10,
15 • X₂ es un péptido enlazante, seleccionado de entre el grupo, que consiste en los péptidos Id. de Sec. N°: 6-10,

• Pro es prolina, y
• Y se selecciona del grupo que consiste en Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro, o Pro-Arg-Pro.
20

15. El IGF-I PEGilado en la lisina, que se caracteriza porque no comprende una metionina N-terminal.

16. La variante de IGF-I PEGilado en la lisina, en el
25 que uno o dos aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste en lisina 27, 65 y/o 68 están sustituidos independientemente por otro aminoácido polar, que se caracteriza porque dicha variante no comprende una metionina N-

terminal.

17. Una composición farmacéutica que comprende un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina de acuerdo con las reivindicaciones 15 o 16.

5 18. La utilización de un IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina de acuerdo con las reivindicación 15 o 16 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA).

10 19. Un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA), que se caracteriza porque se administra una cantidad farmacéuticamente efectiva de IGF-I o variante de IGF-I PEGilado en la lisina de acuerdo con la reivindicación 15 o 16 a un paciente que necesite dicho tratamiento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Método para la producción de conjugados de factor de crecimiento similar a la insulina-1 y polietilenglicol

5 <130> 23907 FT

<150> EP06018170

<151> 2006-08-31

<160> 25

<170> PatentIn version 3.2

10 <210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> característica misc

<223> secuencia de aminoácidos de IGF-I humana (aminoácidos 49-118 de SwissProt P01343)

<400> 1

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe

20 1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly

20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys

35 40 45

25 Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu

50 55 60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala

65 70

<210> 2

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAG_R

K27R K65R K68

<400> 2

Met His His His His His Arg Ala Arg Arg Phe Arg Arg His Pro

10 1 5 10 15

Arg Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala

20 25 30

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr

35 40 45

15 Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp

50 55 60

Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys

65 70 75 80

Ala Pro Leu Arg Pro Ala Lys Ser Ala

20 85

<210> 3

<211> 88

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAEE_F1

K27R K65R K68

<400> 3

Met Ser His His His His His His Asn His Asn Arg Glu His Pro Arg
1 5 10 15
Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu
20 25 30
5 Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr Gly
35 40 45
Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu
50 55 60
Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala
10 65 70 75 80
Pro Leu Arg Pro Ala Lys Ser Ala
85
<210> 4
<211> 87
15 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F1
K27R K65R K68
20 <400> 4
Met Asn His His His His His His Ile Glu Gly Arg His Pro Arg Pro
1 5 10 15
Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln
20 25 30
25 Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr Gly Tyr
35 40 45
Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys
50 55 60

Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro

65

70

75

80

Leu Arg Pro Ala Lys Ser Ala

85

5 <210> 5

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F2

K27R K65R K68

<400> 5

Met Asn His His His His His His Thr Glu Phe Glu Asn Ile Glu His

1

5

10

15

15 Pro Arg Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp

20

25

30

Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro

35

40

45

Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val

20 50

55

60

Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr

65

70

75

80

Cys Ala Pro Leu Arg Pro Ala Lys Ser Ala

85

90

25 <210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> enlazante

<400> 6

Lys Ala Lys Arg Phe Lys Lys His

5 1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> enlazante

10 <220>

<223> enlazante

<400> 7

Arg Ala Arg Arg Phe Arg Arg His

1 5

15 <210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> enlazante

<400> 8

Asn Thr Glu His Asn Arg Glu His

1 5

<210> 9

25 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> enlazante
<400> 9
Ile Glu Gly Arg His
1 5
5 <210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
10 <223> enlazante
<400> 10
Thr Glu Phe Glu Asn Ile Glu His
1 5
<210> 11
15 <211> 6
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia de escisión
20 <400> 11
Pro Arg Pro Pro Gly Pro
1 5
<210> 12
<211> 4
25 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia de escisión

<400> 12
Ala Pro Arg Pro
1
<210> 13
5 <211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia de escisión
10 <400> 13
Pro Ala Pro Arg Pro
1 5
<210> 14
<211> 5
15 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia de escisión
<400> 14
20 Pro Ala Pro Gly Pro
1 5
<210> 15
<211> 4
<212> PRT
25 <213> Artificial
<220>
<223> secuencia de escisión
<400> 15

Pro Pro Gly Pro

1

<210> 16

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de escisión

<400> 16

10 Pro Arg Pro Pro Gly Pro

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de escisión

<400> 17

Ala Pro Arg Pro Pro Gly Pro

20 1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> secuencia de escisión

<400> 18

Pro Ala Pro Arg Pro Pro Gly Pro

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> otra

<400> 19

Ser His His His His His His

10 1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> otra

<400> 20

Asn His His His His His His

1 5

20 <210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> otra

<400> 21

His His His His His His

1 5

<210> 22

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAG_R

K27R K65 K68R

<400> 22

Met His His His His His His Arg Ala Arg Arg Phe Arg Arg His Pro

10 1 5 10 15

Arg Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala

20 25 30

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr

35 40 45

15 Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp

50 55 60

Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys

65 70 75 80

Ala Pro Leu Lys Pro Ala Arg Ser Ala

20 85

<210> 23

<211> 88

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAEE_F1

K27R K65 K68R

<400> 23

Met Ser His His His His His His Asn His Asn Arg Glu His Pro Arg
1 5 10 15
Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu
20 25 30
5 Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr Gly
35 40 45
Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu
50 55 60
Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala
10 65 70 75 80
Pro Leu Lys Pro Ala Arg Ser Ala
85
<210> 24
<211> 87
15 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F1
K27R K65 K68R
20 <400> 24
Met Asn His His His His His His Ile Glu Gly Arg His Pro Arg Pro
1 5 10 15
Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln
20 25 30
25 Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr Gly Tyr
35 40 45
Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys
50 55 60

Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro

65 70 75 80

Leu Lys Pro Ala Arg Ser Ala

85

5 <210> 25

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión px3036_IAFX_F2

K27R K65 K68R

<400> 25

Met Asn His His His His His His Thr Glu Phe Glu Asn Ile Glu His

1 5 10 15

15 Pro Arg Pro Pro Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp

20 25 30

Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro

35 40 45

Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val

20 50 55 60

Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr

65 70 75 80

Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Arg Ser Ala

85 90

25

<210> 26

<211> 960

<212> PRT

<213> Neisseria gonorrhoeae

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> secuencia de aminoácido de una proteasa IgA1 de Neisseria gonorrhoeae (tipo 2)

<400> 26

Met Ala Leu Val Arg Asp Asp Val Asp Tyr Gln Ile Phe Arg Asp Phe
1 5 10 15

Ala Glu Asn Lys Gly Lys Phe Phe Val Gly Ala Thr Asp Leu Ser Val
20 25 30

Lys Asn Lys Arg Gly Gln Asn Ile Gly Asn Ala Leu Ser Asn Val Pro
35 40 45

Met Ile Asp Phe Ser Val Ala Asp Val Asn Lys Arg Ile Ala Thr Val
50 55 60

Val Asp Pro Gln Tyr Ala Val Ser Val Lys His Ala Lys Ala Glu Val
65 70 75 80

His Thr Phe Tyr Tyr Gly Gln Tyr Asn Gly His Asn Asp Val Ala Asp
85 90 95

Lys Glu Asn Glu Tyr Arg Val Val Glu Gln Asn Asn Tyr Glu Pro His
100 105 110

Lys Ala Trp Gly Ala Ser Asn Leu Gly Arg Leu Glu Asp Tyr Asn Met
115 120 125

Ala Arg Phe Asn Lys Phe Val Thr Glu Val Ala Pro Ile Ala Pro Thr
130 135 140

Asp Ala Gly Gly Gly Leu Asp Thr Tyr Lys Asp Lys Asn Arg Phe Ser
145 150 155 160

Ser Phe Val Arg Ile Gly Ala Gly Arg Gln Leu Val Tyr Glu Lys Gly
165 170 175

Val Tyr His Gln Glu Gly Asn Glu Lys Gly Tyr Asp Leu Arg Asp Leu
180 185 190

Ser Gln Ala Tyr Arg Tyr Ala Ile Ala Gly Thr Pro Tyr Lys Asp Ile
195 200 205

Asn Ile Asp Gln Thr Met Asn Thr Glu Gly Leu Ile Gly Phe Gly Asn
210 215 220

His Asn Lys Gln Tyr Ser Ala Glu Glu Leu Lys Gln Ala Leu Ser Gln
225 230 235 240

Asp Ala Leu Thr Asn Tyr Gly Val Leu Gly Asp Ser Gly Ser Pro Leu
245 250 255

Phe Ala Phe Asp Lys Gln Lys Asn Gln Trp Val Phe Leu Gly Thr Tyr
260 265 270

Asp Tyr Trp Ala Gly Tyr Gly Lys Lys Ser Trp Gln Glu Trp Asn Ile
275 280 285

Tyr Lys Lys Glu Phe Ala Asp Lys Ile Lys Gln His Asp Asn Ala Gly
290 295 300

Thr Val Lys Gly Asn Gly Glu His His Trp Lys Thr Thr Gly Thr Asn
305 310 315 320

Ser His Ile Gly Ser Thr Ala Val Arg Leu Ala Asn Asn Glu Gly Asp
325 330 335

Ala Asn Asn Gly Gln Asn Val Thr Phe Glu Asp Asn Gly Thr Leu Val
340 345 350

Leu Asn Gln Asn Ile Asn Gln Gly Ala Gly Gly Leu Phe Phe Lys Gly
355 360 365

Asp Tyr Thr Val Lys Gly Ala Asn Asn Asp Ile Thr Trp Leu Gly Ala
370 375 380

Gly Ile Asp Val Ala Asp Gly Lys Lys Val Val Trp Gln Val Lys Asn
385 390 395 400

Pro Asn Gly Asp Arg Leu Ala Lys Ile Gly Lys Gly Thr Leu Glu Ile
405 410 415

Asn Gly Thr Gly Val Asn Gln Gly Gln Leu Lys Val Gly Asp Gly Thr
420 425 430

Val Ile Leu Asn Gln Lys Ala Asp Ala Asp Lys Lys Val Gln Ala Phe
435 440 445

Ser Gln Val Gly Ile Val Ser Gly Arg Gly Thr Leu Val Leu Asn Ser
450 455 460

Ser Asn Gln Ile Asn Pro Asp Asn Leu Tyr Phe Gly Phe Arg Gly Gly
465 470 475 480

Arg Leu Asp Ala Asn Gly Asn Asp Leu Thr Phe Glu His Ile Arg Asn
485 490 495

Val Asp Glu Gly Ala Arg Ile Val Asn His Asn Thr Asp His Ala Ser
500 505 510

Thr Ile Thr Leu Thr Gly Lys Ser Leu Ile Thr Asn Pro Asn Ser Leu
515 520 525

Ser Val His Ser Ile Gln Asn Asp Tyr Asp Glu Asp Asp Tyr Ser Tyr
530 535 540

Tyr Tyr Arg Pro Arg Arg Pro Ile Pro Gln Gly Lys Asp Leu Tyr Tyr
545 550 555 560

Lys Asn Tyr Arg Tyr Tyr Ala Leu Lys Ser Gly Gly Arg Leu Asn Ala
565 570 575

Pro Met Pro Glu Asn Gly Val Ala Glu Asn Asn Asp Trp Ile Phe Met
580 585 590

Gly Tyr Thr Gln Glu Glu Ala Arg Lys Asn Ala Met Asn His Lys Asn
595 600 605

Asn Arg Arg Ile Gly Asp Phe Gly Gly Phe Phe Asp Glu Glu Asn Gly
610 615 620

Lys Gly His Asn Gly Ala Leu Asn Leu Asn Phe Asn Gly Lys Ser Ala
625 630 635 640

Gln Asn Arg Phe Leu Leu Thr Gly Gly Ala Asn Leu Asn Gly Lys Ile
645 650 655

Ser Val Thr Gln Gly Asn Val Leu Leu Ser Gly Arg Pro Thr Pro His
660 665 670

Ala Arg Asp Phe Val Asn Lys Ser Ser Ala Arg Lys Asp Ala His Phe
675 680 685

Ser Lys Asn Asn Glu Val Val Phe Glu Asp Asp Trp Ile Asn Arg Thr
690 695 700

Phe Lys Ala Ala Glu Ile Ala Val Asn Gln Ser Ala Ser Phe Ser Ser
705 710 715 720

Gly Arg Asn Val Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ile Thr Ala Thr Asp Asn
725 730 735

Ala Lys Val Asn Leu Gly Tyr Lys Asn Gly Asp Glu Val Cys Val Arg
740 745 750

Ser Asp Tyr Thr Gly Tyr Val Thr Cys Asn Thr Gly Asn Leu Ser Asp
755 760 765

Lys Ala Leu Asn Ser Phe Asp Ala Thr Arg Ile Asn Gly Asn Val Asn
770 775 780

Leu Asn Gln Asn Ala Ala Leu Val Leu Gly Lys Ala Ala Leu Trp Gly
785 790 795 800

Lys Ile Gln Gly Gln Gly Asn Ser Arg Val Ser Leu Asn Gln His Ser

805	810	815
Lys Trp His Leu Thr Gly Asp Ser Gln Val His Asn Leu Ser Leu Ala 820 825 830		
Asp Ser His Ile His Leu Asn Asn Ala Ser Asp Ala Gln Ser Ala Asn 835 840 845		
Lys Tyr His Thr Ile Lys Ile Asn His Leu Ser Gly Asn Gly His Phe 850 855 860		
His Tyr Leu Thr Asp Leu Ala Lys Asn Leu Gly Asp Lys Val Leu Val 865 870 875 880		
Lys Glu Ser Ala Ser Gly His Tyr Gln Leu His Val Gln Asn Lys Thr 885 890 895		
Gly Glu Pro Asn Gln Glu Gly Leu Asp Leu Phe Asp Ala Ser Ser Val 900 905 910		
Gln Asp Arg Ser Arg Leu Phe Val Ser Leu Ala Asn His Tyr Val Asp 915 920 925		
Leu Gly Ala Leu Arg Tyr Thr Ile Lys Thr Glu Asn Gly Ile Thr Arg 930 935 940		
Leu Tyr Asn Pro Tyr Ala Gly Asn Arg Arg Pro Val Lys Pro Ala Pro 945 950 955 960		

Fig. 1

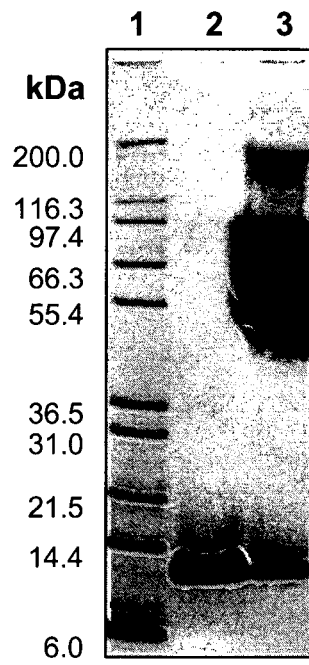


Fig. 2

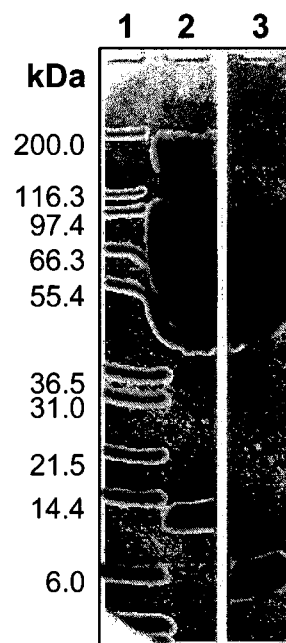


Fig. 3

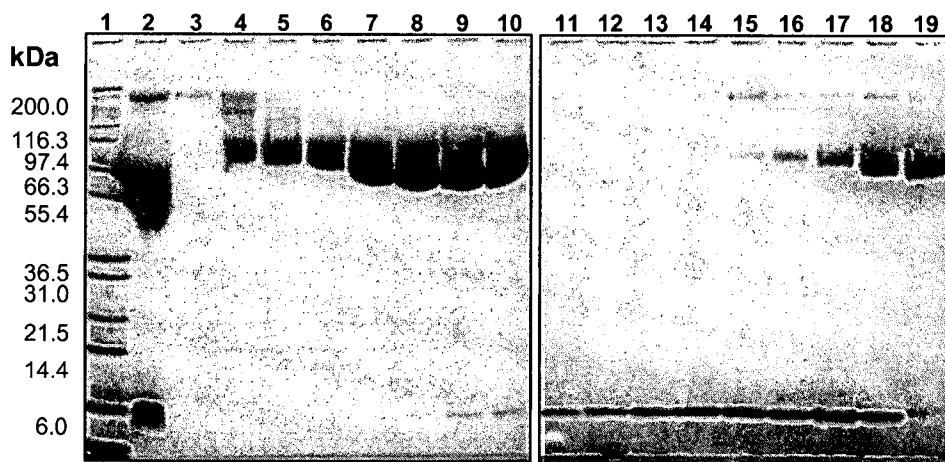
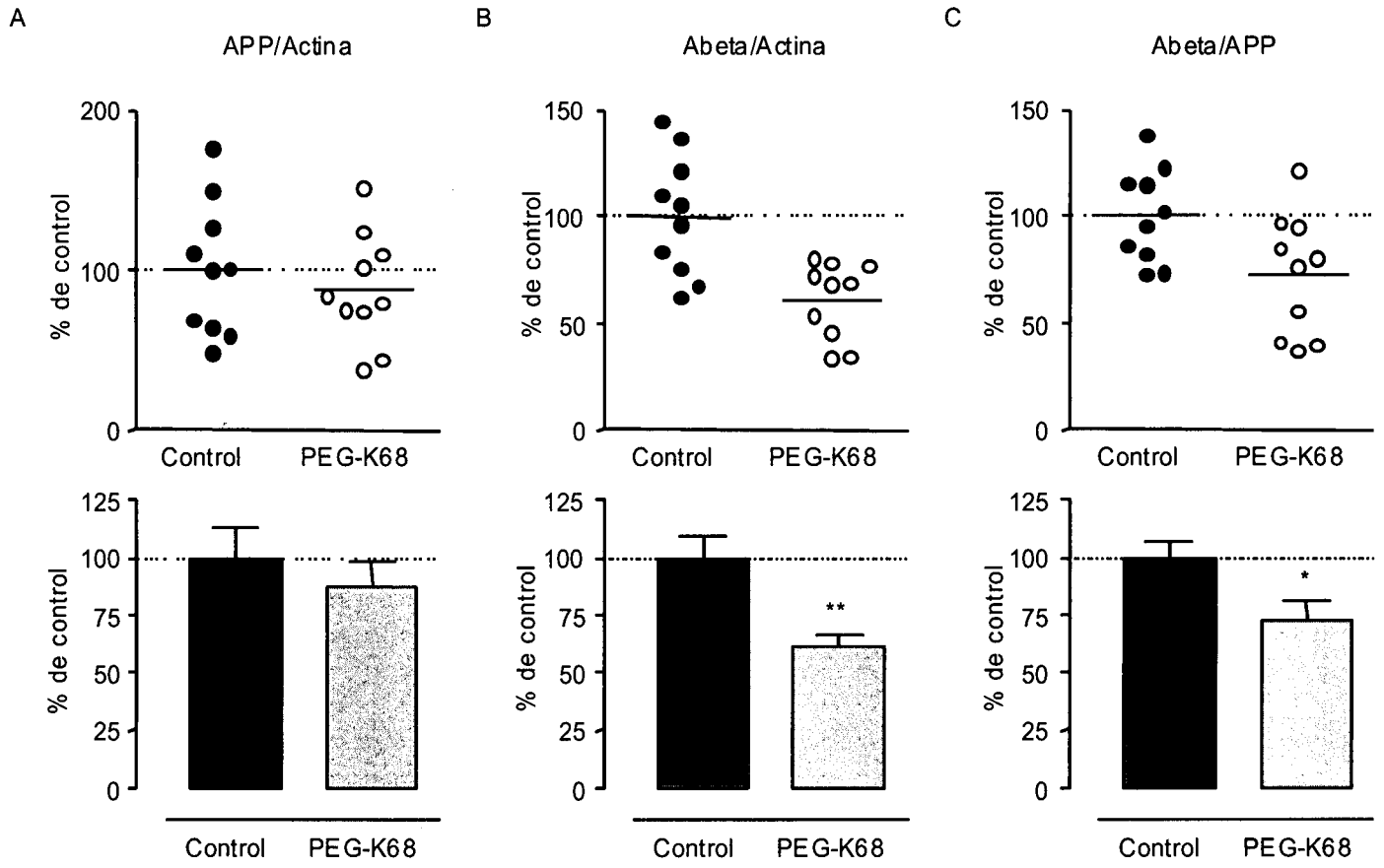


Fig. 4





No. 09-008773- -00000-0000

Fecha: 2009-01-30 16:11:14 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 97

SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

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

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

SANDRA ROSARIO
Firma Responsable

Fecha ENERO 30-09

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