

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00048531 00000033

Folios: 36

Fecha (A/D): 2000-12-28 16:02:11

Tramite : C32 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA

Dependencia: 2320 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: P1.-F. HOFFMANN-LA ROCHE A.G..-Patente de Invención para
"DERIVADOS DE ERITROPOYETINA".-Clase A.61.-Expediente
número 00-048.531.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por Estado el 5 de Octubre de 2000 y a mi memorial de plazo de 16 de Noviembre del mismo año.
2. En relación con las objeciones del Señor Examinador según las cuales "La reivindicación 1 no es clara, porque en primer lugar el texto de la reivindicación esta recargado de comentarios y términos que no contienen un significado específico como "análogos de la misma", no es lo suficientemente claro para determinar de manera inequívoca a que compuestos se refiere, tampoco es claro lo que se quiere significar con "alcoxi-inferior"; tampoco es aceptable definir cantidades con términos ambiguos como "....entre alrededor de...y alrededor de...." y "La reivindicación 29 no es clara porque es una composición que se refiere a "...cada uno de dichos conjugados" y no se refiere a esta altura de la reivindicación a ningún conjugado específico para que utilice estos términos, además trata de definir los compuestos por los resultados farmacológicos a obtener, por demás conteniendo los mismos defectos de la reivindicación 1", atentamente me permito manifestar que se han modificado las reivindicaciones 1 y 29, con el objeto de reemplazar los términos objetados "alcoxi inferior" y "alquilo inferior" por las expresiones "alcoxi C₁-C₆ lineal o ramificado" y "alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado", respectivamente, de conformidad con lo establecido en la página 12 de la descripción. De igual manera, se ha eliminando la expresión objetada "alrededor de" en el capítulo reivindicatorio.

En relación con la expresión "análogos de la misma" objetada por el señor Examinador, me permito aclarar que dicha expresión es perfectamente conocida por las personas versadas en la materia y por consiguiente su significado es completamente claro. En efecto, tal como se establece en la página 21 del libro "A Dictionary of Genetics" (KING, R. C., STANSFIELD, W. D., 5ª Edición. Oxford

University Press, New York, 1997, copia adjunta de la página citada), un análogo es un compuesto relacionado con, pero estructuralmente ligeramente diferente, una molécula de importancia biológica, tal como un amino ácido (ver azaserina), una piridimidina o purina (ver análogos de base) o una hormona (ver ZR515). En el presente caso, los análogos de la eritropoyetina humana son compuestos relacionados con la eritropoyetina humana pero que poseen una ligera modificación en su estructura, la cual se describe claramente en la descripción y en las reivindicaciones. En efecto, tal como se observa a través de las páginas 6 a 12 de la descripción, los análogos de la eritropoyetina humana de la presente invención presentan uno o más cambios en la secuencia aminoacídica de la eritropoyetina humana. Tales modificaciones implican, por ejemplo, proteínas con sitios de glucosilación adicionales a los de la eritropoyetina, o por ejemplo, son análogos con una secuencia aminoacídica que incluya una nueva disposición de al menos un sitio para la glucosilación, etc. Estas modificaciones estructurales se encuentran claramente descritas en el capítulo reivindicatorio y por consiguiente, establecer el empleo de análogos de la eritropoyetina humana es necesario y apropiado para hacer referencia a dichas moléculas modificadas.

Particularmente, las reivindicaciones 1 y 29, establecen claramente las modificaciones estructurales de dichos análogos. En efecto, tal como se observa en el contexto de las reivindicaciones 1 y 29, los análogos de la eritropoyetina humana en la presente invención se seleccionan de aquellos que "presenten la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glicosilación o mediante una nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación...". Además, reivindicaciones como la reivindicación 22 que dependen de la reivindicación 1, describen aún más dichos análogos de la eritropoyetina humana al establecer las modificaciones específicas que son llevadas a cabo en su secuencia. De esta manera, dado que la reivindicación 1 señala el empleo de la eritropoyetina humana y de moléculas relacionadas con la eritropoyetina humana (análogos) con modificaciones específicas, es clara la necesidad de establecer el empleo de la expresión "**análogos**" de la eritropoyetina humana dentro de las reivindicaciones.

→ ?
especulativo

De acuerdo con lo anterior, es claro que la expresión "análogos de la misma" no solo es correcta y ampliamente empleada por la persona versada en la materia, sino que además dicha expresión es necesaria para señalar el empleo de moléculas de eritropoyetina humana modificadas y cuyas modificaciones se establecen con claridad en el capítulo reivindicatorio. Por lo tanto, muy

comedidamente se solicita al señor examinador que la expresión "análogos de la misma" permanezca dentro del capítulo reivindicatorio.

En relación con la objeción del señor Examinador a la expresión "cada uno de dichos conjugados" de la reivindicación 29, atentamente me permito llamar su atención al hecho de que el objeto de dicha reivindicación 29 es proteger una composición caracterizada en que contiene diferentes conjugados, es decir, uno o más conjugados que comprenden una glucoproteína eritropoyetina, la cual es claramente definida en la misma reivindicación 29. Tales conjugados, a diferencia de lo establecido por el señor Examinador, no son caracterizados únicamente por los resultados farmacológicos a obtener, dichos compuestos son completamente caracterizados en términos estructurales en dicha reivindicación 29, toda vez que se establece que los mismos comprenden glucoproteína eritropoyetina que se selecciona del grupo que consiste en eritropoyetina humana y análogos de la misma, los cuales se encuentran completamente caracterizados **en términos estructurales y no en función única de sus resultados farmacológicos**.

Al observar la descripción estructural de la glucoproteína eritropoyetina en la reivindicación 29, se observa que dicha glucoproteína en cada uno de los conjugados está covalentemente unida desde uno a tres grupos alcoxi inferior poli(etilenglicol) (PEG). Esta pegilación ó unión de los grupos poli(etilen glicol) se obtiene mediante el proceso de producción específico ejemplificado en los Ejemplos 2 y 3. Como puede notar el señor Examinador, cada vez que se obtiene una mezcla de, por ejemplo, especies de eritropoyetina, mono-, di- y tri-pegiladas, las cuales podrían ser separadas por los métodos mencionados en los Ejemplos con lo cual se obtienen **diferentes conjugados**. Además, la pegilación podría tomar lugar en diferentes grupos amino de la proteína eritropoyetina recombinante. Por lo tanto, el término "cada uno de dichos conjugados" es un término apropiado que refleja la obtención de varios conjugados diferentes en el proceso de producción de la glucoproteína.

Teniendo en cuenta los argumentos anteriormente expuestos, de la manera más atenta solicito al señor Examinador aceptar las reivindicaciones 1 y 29 como han sido modificadas.

3. De otra parte, respecto a la objeción del señor Examinador según la cual "La reivindicación 18 no es clara en la parte donde dice "eritropoyetina humana expresada mediante activación génica endógena", porque no es suficiente para definir de manera inequívoca un compuesto químico,

entonces sino se sabe inequívocamente a que compuesto se refiere no está delimitado el alcance de la invención", atentamente me permito llamar la atención del señor Examinador al hecho de que la eritropoyetina humana es un compuesto específico, muy conocido por la persona versada en la materia y cuya estructura y propiedades han sido ampliamente estudiadas por los expertos en la bioquímica. Hablar de eritropoyetina humana es designar de manera inequívoca un compuesto químico el cual ha sido extensamente discutido en revistas científicas como Nature 179: 6331-4 (1957) y en otras referencias citadas en la página 2 de la descripción. Por consiguiente, no puede afirmarse que la eritropoyetina humana no designa un compuesto específico inequívoco.

esto
si
son
los
analizar
sin
especificar
analizar
con.

En este sentido, el objeto de la reivindicación 18 como reivindicación dependiente busca ampliar las características de la eritropoyetina humana empleada en los conjugados de la presente invención al establecer que la misma ha sido preparada mediante expresión génica endógena. Tal caracterización es completa y adecuada, toda vez que tanto la eritropoyetina humana como los procesos de expresión génica endógena son bien conocidos por las personas versadas en la materia, más aún si se tiene en cuenta los extensos estudios llevados a cabo en el estado de la técnica sobre dicha proteína.

De acuerdo con lo anterior, es claro que la expresión "eritropoyetina humana expresada mediante activación génica endógena" si define de manera inequívoca al compuesto eritropoyetina humana, el cual ha sido preparado mediante activación ó expresión génica endógena, con lo cual se delimita el alcance de la invención. Por consiguiente, muy comedidamente se solicita al señor Examinador aceptar dicha expresión de la reivindicación 18, como ha sido presentada inicialmente.

4. Respecto a la objeción del señor Examinador de acuerdo con la cual en "La reivindicación 17 no es claro el compuesto que se quiere significar con "conjugado" de la reivindicación 16 en donde la nueva disposición comprende la **delección de cualquiera de los sitios de glicosilación con unión N en la eritropoyetina humana y la adicción de un sitio de glicosilación con unión N..**", atentamente me permito señalar al señor Examinador que la reivindicación 17 de la presente solicitud **no contiene el texto indicado en su concepto técnico**. En efecto, tal como se observa en el capítulo reivindicatorio de la presente invención, la reivindicación 17 protege "El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la glucoproteína eritropoyetina es una eritropoyetina humana" y **no un "conjugado de la reivindicación 16, en donde**

la nueva disposición comprende....", como lo afirma erróneamente el señor Examinador.

Es importante señalar que no existe un texto idéntico al citado por el señor Examinador en todo el capítulo reivindicatorio de la presente solicitud. El único texto *similar* es el encontrado en la reivindicación 27, la cual protege "el conjugado de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la nueva disposición comprende la delección de cualquiera de los sitios de unión N a carbohidrato en la eritropoyetina humana y la adición de un sitio de unión N a carbohidrato en la posición 88 de la secuencia de eritropoyetina humana". No obstante, dicha reivindicación 27 es perfectamente clara, toda vez que hace referencia a un conjugado en el cual la eritropoyetina humana es modificada mediante la nueva disposición de al menos un sitio de glicosilación.

Tal como se observa en la página 12 de la descripción, las glucoproteínas de la presente invención **también incluyen análogos** que tienen una secuencia aminoacídica que incluye una nueva disposición de al menos un sitio para la glicosilación. **Dicha nueva disposición del sitio de glucosilación involucra la delección de uno o más sitios de glucosilación en la eritropoyetina humana y la adición de uno o más sitios de glucosilación que no se dan de forma natural.** Dicha nueva disposición puede comprender una delección de cualquiera de los sitios de unión N a carbohidrato en la eritropoyetina humana y una adición de un sitio de unión N de carbohidrato en la posición 88 de la secuencia aminoacídica de la eritropoyetina humana, como así se señala en dicha página 12 de la descripción y en la reivindicación 27.

Es decir, que la reivindicación 27 describe el conjugado de la presente invención que comprende la glucoproteína que tiene la secuencia de eritropoyetina humana que ha sido modificada mediante la delección de cualquiera de los sitios de glucosilación con unión N en la eritropoyetina humana y la adición de un sitio de glucosilación con unión N en la posición **específica 88** de la secuencia de eritropoyetina humana. Como tal, la reivindicación 27 es perfectamente clara para el experto en la materia.

De acuerdo con lo anterior, de la manera más atenta solicito al señor Examinador que la reivindicación 17 y la reivindicación 27 permanezcan como fueron inicialmente presentadas.

340

5. Finalmente, respecto a las objeciones del señor Examinador según las cuales **"En las reivindicaciones 30 a 32 no es claro lo que se quiere significar con la expresión "...el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa por ciento"** y **"En la reivindicación 33 no es claro lo que se quiere significar con "el porcentaje de conjugados donde n es 1 está comprendido entre el noventa por ciento..."**, atentamente me permito manifestar que las reivindicaciones 30 y 33 han sido modificadas con el fin de hacerlas dependientes de las reivindicaciones "2 a 27" y "30 ó 32", respectivamente. Con dicha modificación se aclara al señor Examinador el significado de la expresión "...el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa por ciento." En efecto, tal como lo puede observar el señor Examinador, por ejemplo, en la reivindicación 2 de la cual depende ahora la reivindicación 30, se señala que n se encuentra comprendido entre 1 y 3, siendo "n" una variable que designa el número de grupos que se encuentran unidos a la glucoproteína eritropoyetina para formar el conjugado. De acuerdo con lo anterior y basándonos en la naturaleza de la reacción de pegilación, la composición de las reivindicaciones 30 a 33 pueden contener un pequeño porcentaje de conjugados con $n=2$ ó 3, dependiendo de la reacción de pegilación y de las etapas de purificación. De esta manera, una composición como la de la reivindicación 33 que comprende conjugados en donde $n=1$ (es decir, mono pegilados) esta entre el 90 y el 96 por ciento de todos los conjugados, quiere decir que del 10 al 4 por ciento restante pueden ser conjugados con por ejemplo, $n=2$ ó $n=3$ (es decir, di ó tri pegilados).

Por consiguiente, las reivindicaciones de composición 30 a 33 reflejan perfectamente las características de la composición que será obtenida, esto es, composiciones en las cuales los conjugados con n igual a 1 (mono pegilados) se encuentran en un 90% con respecto al total de conjugados.

Teniendo en cuenta los hechos anteriormente expuestos, muy comedidamente se solicita al señor Examinador aceptar las reivindicaciones 30 y 33, como han sido modificadas.

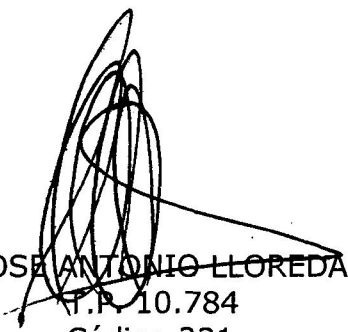
6. Anexas me permito presentar a usted:

- (1) Nuevo Resumen, Objeto y Finalidad de la invención en el cual se ha hecho una corrección mecanográfica y se ha realizado la conversión de unidades al Sistema Internacional;
- (2) Nuevas páginas 3, 5, 14, 16, 17, 20, 27, 41, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 y 61 de la descripción y las reivindicaciones, **que reemplazan las originalmente presentadas**, en las cuales:

- (a) Se han modificado las reivindicaciones 1 y 29 como anteriormente se explicó;
 - (b) Se ha modificado la dependencia de las reivindicaciones 30 y 33, como se expuso anteriormente:
 - (c) Se han modificado las reivindicaciones 1, 12, 13, 16 y 29, con el fin de eliminar el término objetado "alrededor de";
 - (d) Se han modificado las reivindicaciones 1, 2, 14 y 29, con el objeto de reemplazar las expresiones objetadas "alcoxi inferior" y "alquilo inferior" por las expresiones "alcoxi C₁-C₆ lineal o ramificado" y "alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado", respectivamente, de conformidad con lo establecido en la página 12 de la descripción.
 - (e) Se han colocado las secuencias "SEQ ID NO:1" y "SEQ ID NO:2" de las figuras 1 y 2, respectivamente en la Reivindicación 19, como así lo solicito el señor Examinador. El sustento para dicha modificación se encuentra en las páginas 6, 56 y 57 de la descripción y de las figuras;
 - (f) Se ha colocado la secuencia "SEQ ID NO:1" de la figura 1 en la Reivindicación 20, como así lo solicito el señor Examinador. El sustento para dicha modificación se encuentra en las páginas 6 y 56 de la descripción y de las figuras;
 - (g) Se ha hecho la conversión de unidades al Sistema Internacional en las páginas 3, 5, 14, 16, 17, 20, 27 y 41 de la descripción y en las reivindicaciones 1, 12, 13, 16 y 29; y
 - (h) Se han reenumerado las páginas de las figuras 1, 2 y 3.
- (3) Página 21 del libro "A Dictionary Genetics". KING, R.C., STANFIELD, W.D., 5ª Edición. Oxford University Press, New York, 1997.
- (4) En original y dos copias, una de ellas de 6cm x 6cm, Arte Final de la fórmula química característica del invento, para la publicación en la Gaceta de la Propiedad Industrial.
- (5) Nuevo extracto en sus dos formas, **que reemplaza el originalmente presentado**, el cual incluye la reivindicación 1 que ha sido modificada.

7. Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y proceder de conformidad.

Señor Superintendente,



JOSE ANTONIO LLOREDA
T.P. 10.784
Código 231



FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Expediente No		00.048.531	No de Folio
Item		No de unidades	√
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA X		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones: Arte final

352

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

ABOGADOS

CALLE 72 No. 5-83 - 5o. PISO

APARTADO AEREO 12304

TELEFAX: 212 6426 - 235 8846 - 346 1279 - 3458042

BOGOTA - COLOMBIA S.A.

F. HOFFMANN-LA ROCHE A.G.

SOLICITUD DE PATENTE

EXPEDIENTE No. 00-048.531

ARTE FINAL

RESUMEN OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Se revelan conjugados de la glucoproteína eritropoyetina, dichos conjugados comprenden una glucoproteína eritropoyetina que presenta al menos un grupo amino libre, que presenta una actividad biológica *in vivo* con la que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos y que se selecciona del grupo de la eritropoyetina humana y análogos de la misma, que presentan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación o mediante la nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación; dicha glucoproteína se encuentra unida de forma covalente a de uno a tres grupos alcoxi - inferior poli(etilen glicol), cada grupo poli(etilen glicol) se encuentra unido covalentemente a la glucoproteína mediante un conector con la fórmula $-C(O)-X-S-Y-$, con el C(O) del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino, en donde X e Y son tal como se han definido en la descripción y revelaciones, el valor medio del peso molecular de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre alrededor 20 kilodaltons ($3,322 \times 10^{-20}$ g) y alrededor de 40 kilodaltons ($6,644 \times 10^{-20}$ g) y el peso molecular del conjugado se encuentra entre alrededor de 51 kilodaltons ($8,47 \times 10^{-20}$ g) y alrededor de 175 kilodaltons ($2,91 \times 10^{-19}$ g).

ce de forma natural en primer lugar es traducida a una cadena polipeptídica de 166 aminoácidos con arginina 166. Por una modificación post-traducciona, la arginina 166 es escindida por una carboxipeptidasa. La estructura primaria de la EPO humana (165 aminoácidos) se ilustra en la Figura 1. La estructura primaria de la EPO humana (166 aminoácidos) se ilustra en la Figura 2. Hay dos puentes disulfuro entre Cys⁷-Cys¹⁶¹ y Cys²⁹-Cys³³. El peso molecular de la cadena polipeptídica de la EPO humana sin las porciones de los azúcares es 18.236 Da ($3,03 \times 10^{-20}$ g). En la molécula intacta de EPO, aproximadamente el 40% del peso molecular viene dado por los grupos de carbohidrato (Sasaki, H. Bothner, B, Dell, A and Fukuda, M (1987) J. Biol. Chem. 262: 12059).

Debido a que la eritropoyetina humana es esencial en la formación de glóbulos rojos, la hormona es útil en el tratamiento de los trastornos sanguíneos caracterizados por la baja o defectiva producción de glóbulos rojos. Clínicamente, la EPO es utilizada en el tratamiento por ejemplo de anemia en pacientes con fallo renal crónico (CRF) (Eschbach, JEW, Egri, JC, Downing, MR et al. (1987) NEJM 316: 73-78; Eschbach, JEW, Abdulhadi, MH, Browne, JK et al. (1989) Ann. Intern. Med. 111: 992; Egrie, JC, Eschbach, JW, McGuire, T. Adamson, JEW (1988) Kidney Intl. 33: 262; Lim, VS, Degowin, RL, Zavala, D et al. (1989) Ann. Intern. Med. 110: 108-114) y en pacientes con SIDA y cáncer que han sido tratados con quimioterapia (Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI In: MB, Garnick, ed. Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY: Marcel



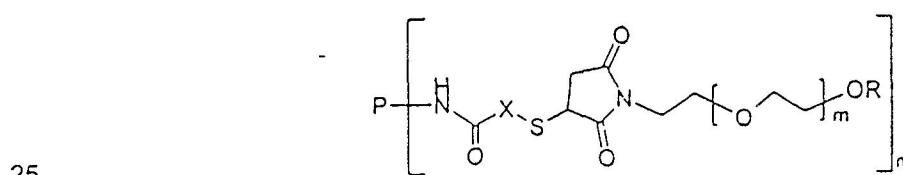
Si se comparan con las EPO no modificadas (es decir, EPO sin un PEG unido) y con los conjugados EPO-PEG convencionales, los presentes conjugados tienen tanto una vida media de circulación como un tiempo de residencia en el plasma mayores, un menor aclaramiento, y una mayor actividad clínica *in vivo*. Los conjugados de esta invención presentan los mismos usos que la EPO. En concreto, los conjugados de esta invención son útiles para tratar pacientes mediante la estimulación de la división y diferenciación de los progenitores eritrocíticos específicos en la médula ósea por la misma vía por la que se utiliza EPO para el tratamiento de los pacientes.

La presente invención también incluye un método para

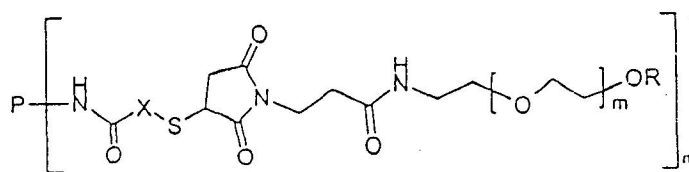
un peso molecular de alrededor de 44 daltons ($7,31 \times 10^{-23}$ g). Así, el peso molecular del conjugado (excluyendo el peso molecular de la EPO) depende del número m. Un peso molecular de "alrededor" de un cierto número significa que se encuentra dentro de un rango razonable de dicho número tal como se ha determinado mediante técnicas analíticas convencionales. m es un número entero que se encuentra
 5 entre 450 y alrededor de 900 (correspondiendo al peso molecular de entre 20 kDa ($3,322 \times 10^{-20}$ g) y 40 kDa ($6,644 \times 10^{-20}$ g)), preferiblemente m se encuentra entre alrededor de 550 y alrededor 800 (alrededor de 24 kDa ($3,986 \times 10^{-20}$ g) a 35 kDa ($5,814 \times 10^{-20}$ g)), y más preferiblemente m se
 10 encuentra entre alrededor de 650 y alrededor de 700 (alrededor de 29 kDa ($4,82 \times 10^{-20}$ g) y alrededor de 31 kDa ($5,15 \times 10^{-20}$ g)).

En la Fórmula 1, el número n es el número de grupos ϵ -amino de un aminoácido de lisina en una proteína eritropoyetina unida covalentemente a una unidad de PEG mediante un
 15 enlace amida. Un conjugado de esta invención puede tener uno, dos o tres unidades de PEG por molécula de EPO. n es un número entero que se encuentra comprendido entre 1 y 3, preferiblemente n es 1 ó 2, y más preferiblemente n es 1.

20 Los productos de glucoproteína eritropoyetina se encuentran representados por las fórmulas:



y



357

en donde P y n son como se han definido anteriormente.

Los compuestos preferidos son aquéllos en los que X es $-(CH_2)_k-$, especialmente aquellos en los que k se encuentra entre 1 y 4, más preferiblemente aquéllos en los que X es $-CH_2-$.

La invención también se refiere a los conjugados anteriores en donde m es un entero que se encuentra comprendido entre 550 y 800, preferiblemente m es un entero entre 650 y 700.

Los compuestos preferidos de la presente invención son aquéllos en los que n es 1 y/o R es metilo.

Además, la invención se refiere a los compuestos anteriores en los que el peso molecular medio de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre alrededor de 24 kilodaltons ($3,986 \times 10^{-20}$ g) y alrededor de 35 kilodaltons ($5,814 \times 10^{-20}$ g), más preferiblemente alrededor de 30 kilodaltons ($4,983 \times 10^{-20}$ g).

Además, la presente invención se refiere a compuestos en los que la glucoproteína se encuentra unida covalentemente a uno o dos porciones de poli(etilen glicol) cuyo extremo es un alcóxilo inferior, más preferiblemente a una porción de poli(etilen glicol) cuyo extremo sea un alcóxilo inferior.

En una realización preferida, las porciones de poli(etilen glicol) presentan en su extremo un grupo metoxilo.

En la realización más preferida, la invención se refiere a los compuestos anteriores en los que X es $-CH_2-$, m es un entero que se encuentra entre 650 y 700, n es 1, R es

metilo, y en los que el peso molecular medio de cada porción de poli(etilen glicol) es alrededor de 30 kilodaltons ($4,983 \times 10^{-20}$ g).

Todavía en otra realización, la invención se refiere a un método para el tratamiento de anemia en humanos que comprende la administración a humanos de una cantidad terapéu-
5 ticamente efectiva de un producto de glucoproteína eritropoyetina representado por la Fórmula 1.

Todavía en otra realización, la invención se refiere a un método para la preparación de un producto de glucoproteína eritropoyetina, que presenta una actividad biológica
10 *in vivo* que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos, dicho método comprende los pasos de:

(a) la reacción de forma covalente entre un grupo ϵ -amino de un aminoácido de lisina de una proteína eritropoyetina representada por la fórmula $P-[NH_2]_n$ con un reactivo
15 bifuncional representado por la fórmula $Z-CO-X-S-Q$, para formar un intermediario que presenta un enlace amida representado por la fórmula:



en donde P es una proteína eritropoyetina menos el grupo amino que forma un enlace amida; n es un entero que se encuentra comprendido entre 1 y 3; Z es un grupo reactivo, por ejemplo un éster del ácido carboxílico-NHS; X es -
25 $(CH_2)_k$ - ó $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, en donde k se encuentra comprendido entre alrededor de 1 y alrededor de 10; y Q es un grupo protector, como alcanóilo, por ejemplo acetilo.

b) la reacción de forma covalente entre el intermedia-

359

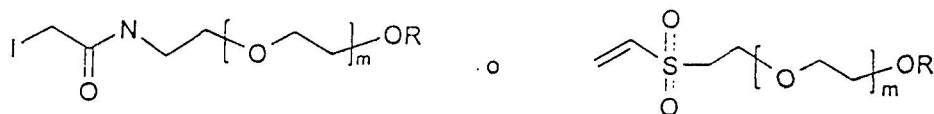
el valor medio del peso molecular de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre alrededor de 20 kilodaltons ($3,322 \times 10^{-20}$ g) y alrededor de 40 kilodaltons ($6,644 \times 10^{-20}$ g) y el peso molecular del conjugado se encuentra entre 51 kilodaltons ($8,47 \times 10^{-20}$ g) y alrededor de 175 kilodaltons ($2,91 \times 10^{-19}$ g); y el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa por ciento. Preferiblemente la composición comprende conjugados como se han definido anteriormente en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa por ciento, más preferiblemente en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa y dos por ciento, e incluso más preferiblemente en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa y seis por ciento, y siendo la forma más preferida en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 se encuentra entre noventa y noventa y seis por ciento.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado o una composición tal como se ha definido anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable y el uso de un conjugado o una composición tal como se ha definido anteriormente para la preparación de medicamentos para el tratamiento o profilaxis de enfermedades relacionadas con la anemia en pacientes con fallo renal crónico (CRF), y para el tratamiento de pacientes con SIDA y cáncer que han sido sometidos a quimioterapia. Además, la invención se refiere a un método para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de trastornos relacionados con la anemia en pacientes con fallo renal

tásico 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,3. El reactivo bifuncional se puede añadir en DMSO. Tras la finalización de la reacción, preferiblemente tras 30 minutos, la reacción se para mediante la adición de lisisna. El exceso de reactivo bi-
5 funcional se puede separar por métodos conocidos en el campo, por ejemplo por diálisis o filtración en columna. El número medio de grupos tiol añadidos a la EPO se pueden determinar mediante métodos fotométricos descritos en, por ejemplo, Grasetti, D.R. and Murray, J.F. en J. Appl. bio-
10 chem. Biotechnol. 119, 41-49 (1967).

La reacción anterior es seguida por el acoplamiento covalente de un derivado de polietilen glicol (PEG) activado. Los derivados de PEG adecuados son moléculas de PEG activadas con un peso molecular medio de entre alrededor de
15 20 kDa ($3,322 \times 10^{-20}$ g) y alrededor de 40 kDa ($6,644 \times 10^{-20}$ g), más preferiblemente entre alrededor de 24 kDa ($3,986 \times 10^{-20}$ g) y alrededor de 35 kDa ($5,814 \times 10^{-20}$ g), y siendo la forma más preferida alrededor de 30 kDa ($4,983 \times 10^{-20}$ g)).

Los derivados de PEG activados son conocidos en el campo y están descritos en, por ejemplo, Morpurgo, M. et
20 al. J. Bioconj. Chem (1966) 7, página 363 ff para PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y de cadena ramificada son adecuadas para la preparación de los compuestos de la Fórmula 1. Los ejemplos de los reactivos de PEG reactivos son yodo-acetil-metoxi-PEG y metoxi-PEG-
25 vinilsulfona:



pegiladas (especies EPO tri-, bi- y mono-pegiladas) se combinó y se filtró (filtración estéril con un filtro de 0,2 μ m).

El contenido y pureza de las especies EPO tri-, di- y
5 mono-pegiladas se evaluó en geles SDS-PAA con tinción de Coomassie (Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)) mientras que la concentración de proteína se midió a 280 nm según la ley de Beer-Lambert. Los pesos moleculares aparentes de las especies EPO determinadas por electroforesis SDS-PAA se encontraban alrededor de 68 kDa ($1,13 \times 10^{-19}$ g) (especies EPO mono-pegiladas), alrededor de 98 kDa ($1,63 \times 10^{-19}$ g) (especies EPO di-pegiladas) y alrededor de 128 kDa ($2,13 \times 10^{-19}$ g) (especies EPO tri-pegiladas).

La separación posterior de las especies EPO tri- di- y mono-pegiladas se puede conseguir mediante cromatografía,
15 por ejemplo mediante cromatografía de exclusión de tamaño (Superdex, pg 200; Pharmacia).

La determinación de la actividad biológica in-vivo del eluido que contenía las especies tri- di- y mono-pegiladas se llevó a cabo por el método descrito en el Ejemplo 4.

20 **EJEMPLO 4: Actividad in-vivo de EPO pegilada determinada mediante el ensayo normocitémico de ratón.**

El bioensayo normocitémico de ratón es conocido en el campo (Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)) y se describe un método en la monografía de eritropoyetina de Ph. Eur. BRP. Las muestras se diluyeron con
25 BSA-PBS. A ratones sanos de 7-15 semanas de edad, se les administraron s.c. 0,2 ml de la fracción de EPO que contenía EPO tri-, di- o mono-pegilada tal como se describe en

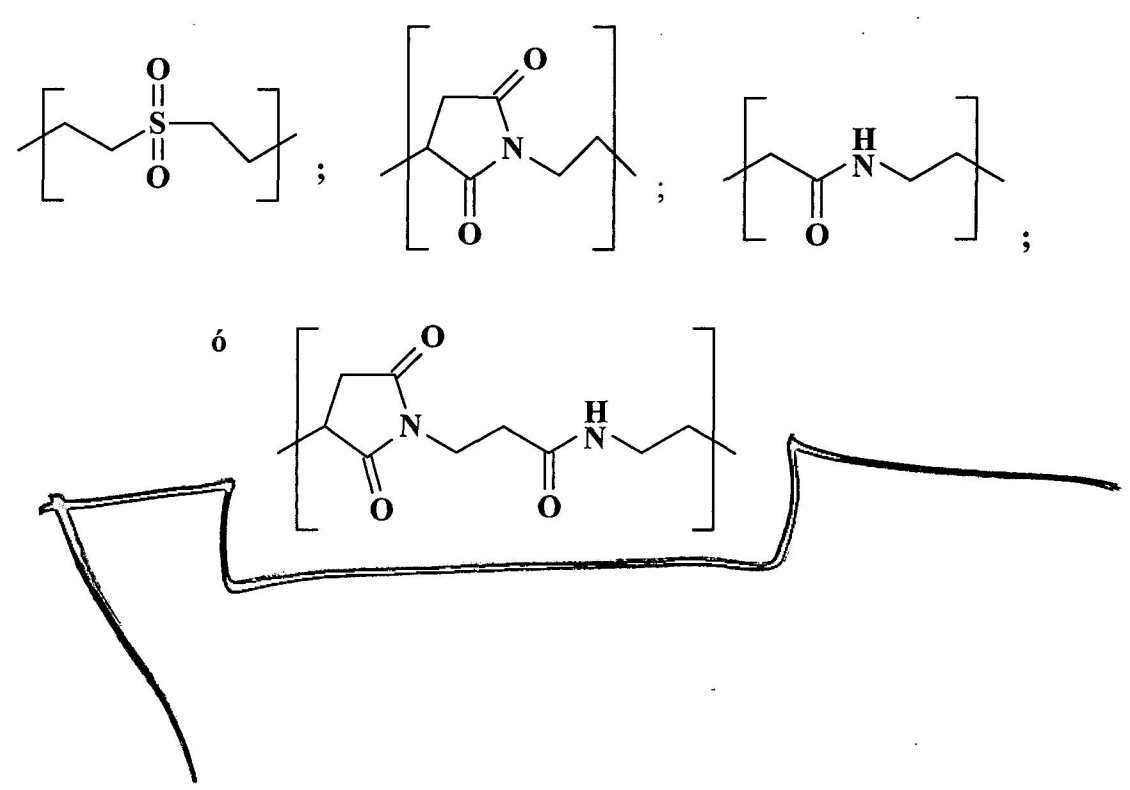
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado, dicho conjugado comprende una glucoproteína eritropoyetina que presenta al menos un grupo amino libre, que presenta una actividad biológica *in vivo* con la que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos y que se selecciona del grupo de la eritropoyetina humana y análogos de la misma que presentan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación o mediante la nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación; dicha glucoproteína se encuentra unida de forma covalente a de uno a tres grupos alcoxi C₁-C₆ lineal o ramificado poli(etilen glicol), cada grupo poli(etilen glicol) se encuentra unido covalentemente a la glucoproteína mediante un conector con la fórmula -C(O)-X-S-Y-, con el C(O) del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino,

X es -(CH₂)_k- ó -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-,

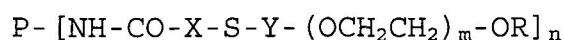
k se encuentra entre 1 y 10;

Y es



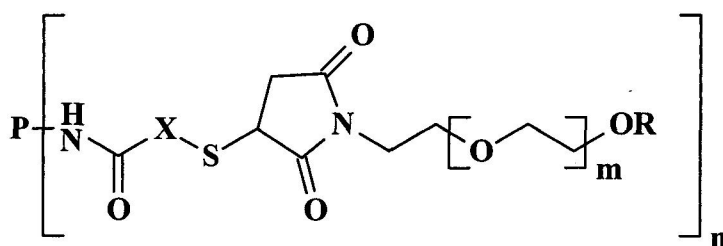
el valor medio del peso molecular de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre 20 kilodaltons ($3,322 \times 10^{-20}$ g) y 40 kilodaltons ($6,644 \times 10^{-20}$ g) y el peso molecular del conjugado se encuentra entre 51 kilodaltons ($8,47 \times 10^{-20}$ g) y 175 kilodaltons ($2,91 \times 10^{-19}$ g).

2. El conjugado de la reivindicación 1, de la fórmula:



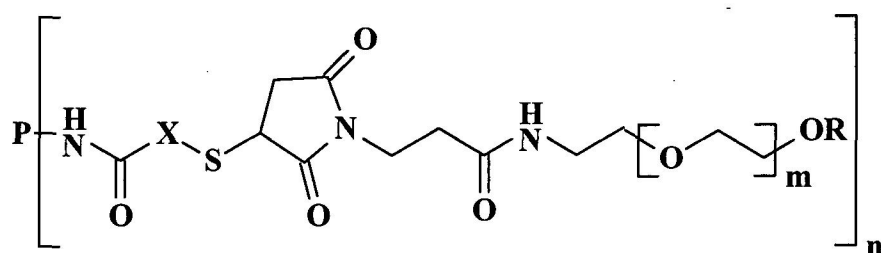
en donde X e Y son tal como se ha definido en la reivindicación 1, m se encuentra comprendido entre 450 y 900, n se encuentra comprendido entre 1 y 3, R es alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado y P es la glucoproteína eritropoyetina menos el grupo amino o grupos amino que forman un enlace amida con x.

3. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, de la fórmula



en donde P, R, X, m y n son tal como se ha definido en la reivindicación 2.

4. El conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, de la fórmula



en donde P, R, X, m y n son tal y como se ha definido en la reivindicación 2.

5. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde X es $-(\text{CH}_2)_k-$.

6. El conjugado de la reivindicación 5, en donde k está comprendido entre 1 y 4.

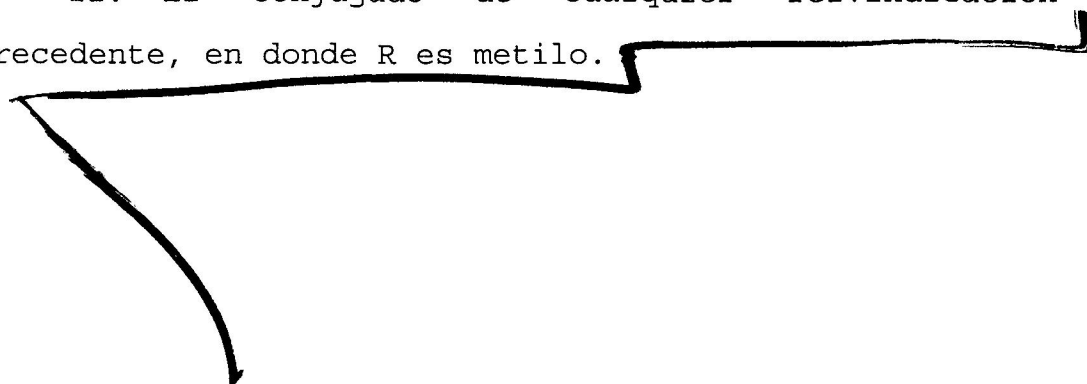
7. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde X es $-(\text{CH}_2)-$.

8. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde m es un número entero que se encuentra comprendido entre 550 y 700.

9. El conjugado de cualquier reivindicación precedente, en donde m es un número entero que se encuentra comprendido entre 650 y 700.

10. El conjugado de cualquier reivindicación precedente, en donde n es 1.

11. El conjugado de cualquier reivindicación precedente, en donde R es metilo.



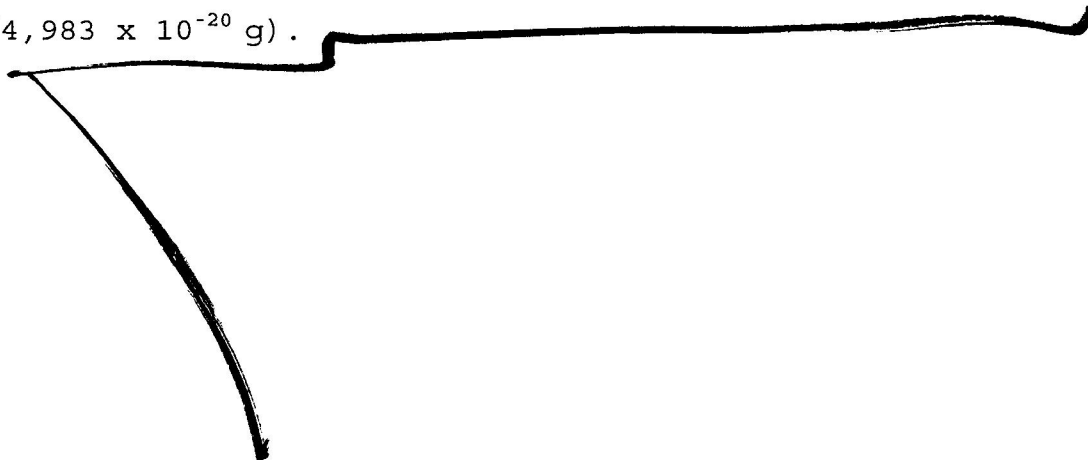
12. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el peso molecular medio de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra comprendido entre 24 kilodaltons ($3,986 \times 10^{-20}$ g) y 35 kilodaltons ($5,814 \times 10^{-20}$ g).

13. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el peso molecular medio de cada porción de poli(etilen glicol) es de 30 kilodaltons ($4,983 \times 10^{-20}$ g).

14. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la glucoproteína se encuentra unida covalentemente a una o dos porciones de poli(etilen glicol) cuyo extremo es alcóxido C_1-C_6 lineal o ramificado.

15. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde las porciones de poli(etilen glicol) presentan en su extremo un grupo metóxido.

16. El conjugado de cualquier reivindicación precedente, en donde X es $-CH_2-$, m es un número entero que se encuentra comprendido entre 650 y 700, n es 1, R es metilo, y en donde el peso molecular medio de cada porción de poli(etilen glicol) es de 30 kilodaltons ($4,983 \times 10^{-20}$ g).



356 AB

17. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la glucoproteína eritropoyetina es una eritropoyetina humana.

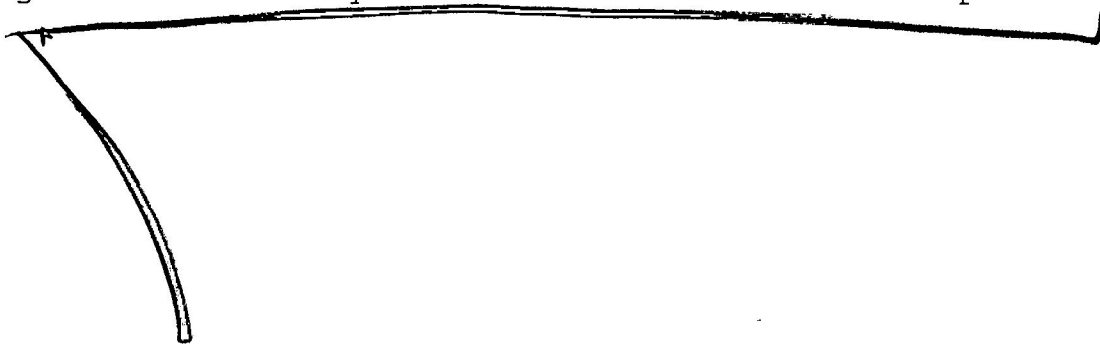
18. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la glucoproteína eritropoyetina se expresa mediante activación génica endógena.

19. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la glucoproteína eritropoyetina tiene la secuencia, SEQ ID NO:1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu
Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰ Glu Ala Glu Asn Ile Thr
Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile
Thr⁴⁰ Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys
Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰ Val Glu Val Trp Gln
Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln
Ala Leu⁸⁰ Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu
Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰ Gly Leu Arg Ser
Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
Ala Ile Ser¹²⁰ Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰
Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰ Leu Phe Arg
Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr
Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰ Cys Arg Thr Gly Asp¹⁶⁵

o la secuencia SEQ ID NO:2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu
Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰ Glu Ala Glu Asn Ile Thr
Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile
Thr⁴⁰ Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys
Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰ Val Glu Val Trp Gln

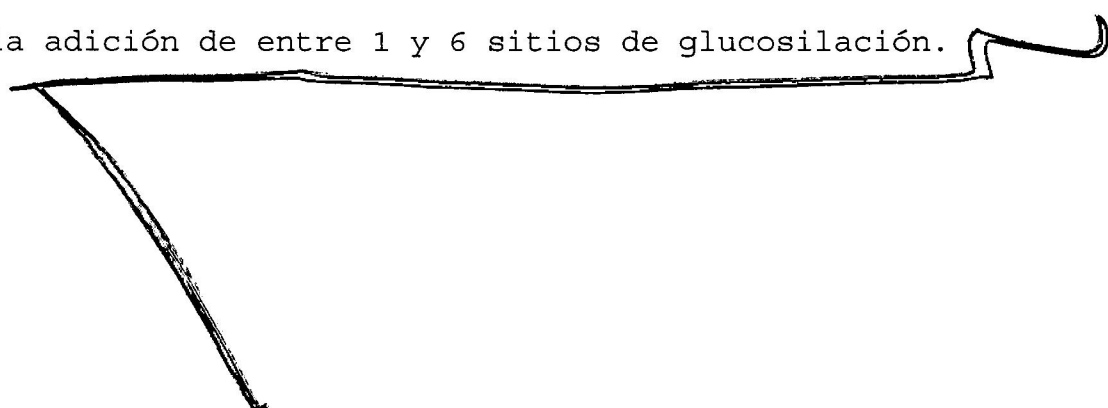


Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln
 Ala Leu⁸⁰ Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu
 Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰ Gly Leu Arg Ser
 Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 Ala Ile Ser¹²⁰ Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰
 Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰ Leu Phe Arg
 Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr
 Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰ Cys Arg Thr Gly Asp Arg¹⁶⁶

20. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la glucoproteína eritropoyetina tiene la secuencia, SEQ ID NO:1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu
 Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰ Glu Ala Glu Asn Ile Thr
 Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile
 Thr⁴⁰ Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys
 Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰ Val Glu Val Trp Gln
 Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln
 Ala Leu⁸⁰ Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu
 Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰ Gly Leu Arg Ser
 Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 Ala Ile Ser¹²⁰ Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰
 Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰ Leu Phe Arg
 Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr
 Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰ Cys Arg Thr Gly Asp¹⁶⁵

21. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la glucoproteína tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación.

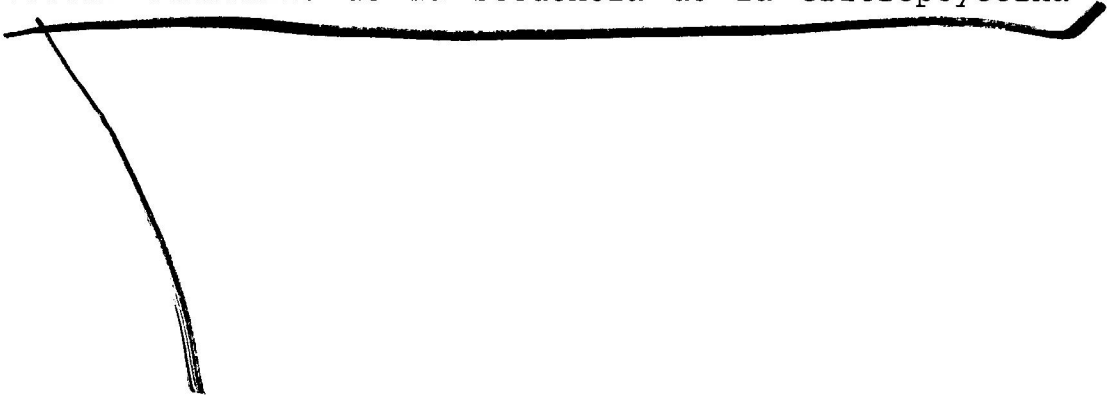


363

22. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8 y 10, en donde la glucoproteína tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

Asn³⁰Thr³²;
Asn⁵¹Thr⁵³;
Asn⁵⁷Thr⁵⁹;
Asn⁶⁹;
Asn⁶⁹Thr⁷¹;
Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;
Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
Asn¹³⁶Thr¹³⁸;
Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
Thr¹²⁵; y
Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

23. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la glucoproteína tiene una secuencia que comprende la secuencia de la eritropoyetina humana y una segunda secuencia en el extremo carboxilo de la secuencia de la eritropoyetina



humana, en donde la segunda secuencia contiene al menos un sitio de glucosilación.

24. El conjugado de la reivindicación 23, en donde la segunda secuencia comprende una secuencia derivada de la secuencia del extremo carboxilo de la gonadotropina coriónica humana. VI.

25. El conjugado de la reivindicación 24, en donde la glucoproteína tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(a) eritropoyetina humana que tiene la secuencia aminoácídica Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln (SEQ ID NO:3), prolongándose desde el extremo carboxilo;

(b) la secuencia en (a) modificado por Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; y

(c) la secuencia en (a) modificado por Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.

26. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la glucoproteína tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante una nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación.

27. El conjugado de la reivindicación 25, en donde la nueva disposición comprende la delección de cualquiera de los sitios de unión N a carbohidrato en la eritropoyetina humana y la adición de un sitio de unión



N a carbohidrato en la posición 88 de la secuencia de la eritropoyetina humana.

28. El conjugado de la reivindicación 14, en donde la glucoproteína tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

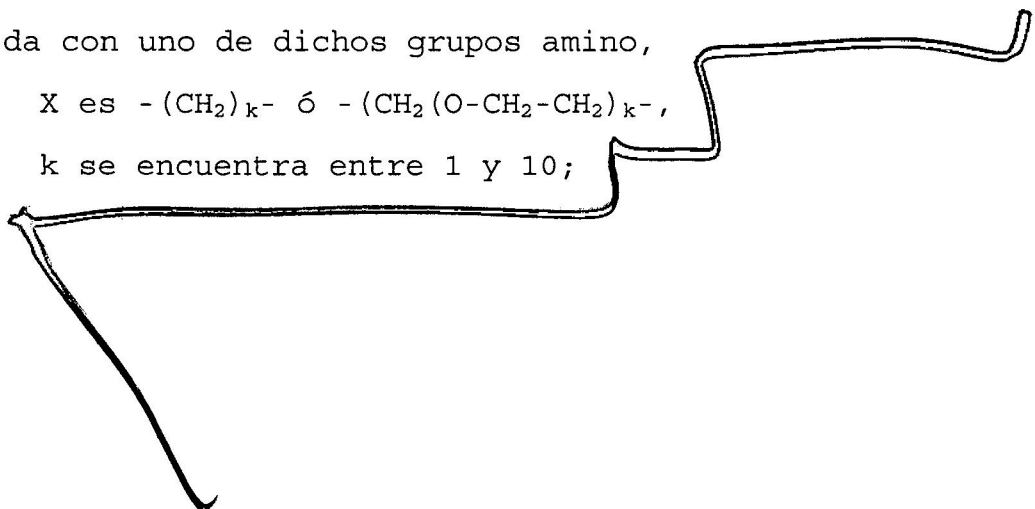
EPO Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰;
 EPO Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; y
 EPO Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.

^

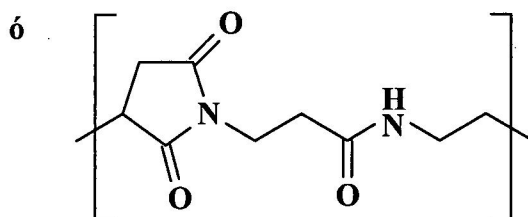
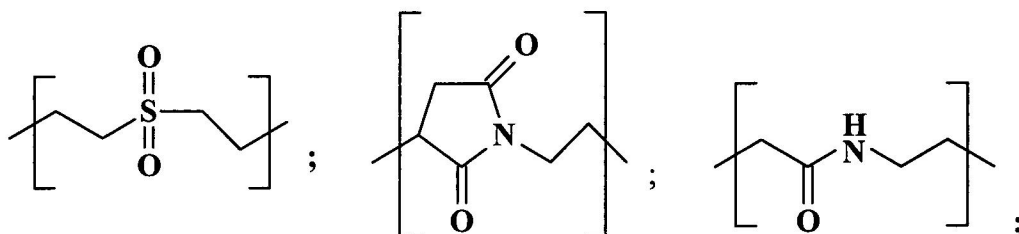
29. Una composición que comprende conjugados, cada uno de dichos conjugados comprende una glucoproteína eritropoyetina que tiene al menos un grupo amino libre, que presenta una actividad biológica *in vivo* con la que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos y que se selecciona del grupo de la eritropoyetina humana y análogos de la misma que presentan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación o por la nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación; dicha glucoproteína se encuentra unida de forma covalente a de uno a tres grupos alcoxi C₁-C₆ lineal o ramificado poli(etilen glicol), cada grupo poli(etilen glicol) se encuentra unido covalentemente a la glucoproteína mediante un conector con la fórmula -C(O)-X-S-Y-, con el C(O) del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino,

X es -(CH₂)_k- ó -(CH₂(O-CH₂-CH₂))_k-,

k se encuentra entre 1 y 10;



Y es



el valor medio del peso molecular de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre 20 kilodaltons ($3,322 \times 10^{-20}$ g) y 40 kilodaltons ($6,644 \times 10^{-20}$ g) y el peso molecular del conjugado se encuentra entre 51 kilodaltons ($8,47 \times 10^{-20}$ g) y 175 kilodaltons ($2,91 \times 10^{-19}$ g) y el porcentaje de conjugados en la que n es 1 es al menos del noventa por ciento.

30. La composición que comprende conjugados tal como han definido en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 27, en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa por ciento.

31. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 28 ó 29, en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos el noventa y dos por ciento.

32 3A

32. La composición de la reivindicación 30 donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos el noventa y seis por ciento.

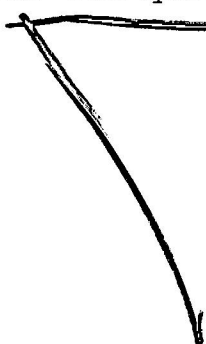
33. La composición de la reivindicación 30 ó 32, en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es entre el noventa por ciento y el noventa y seis por ciento.

34. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35. Un conjugado o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 para ser utilizado en la preparación de medicamentos para el tratamiento o profilaxis de enfermedades relacionadas con la anemia en pacientes con fallo renal crónico (CRF), SIDA y para el tratamiento de pacientes de cáncer que han sido tratados con quimioterapia.

36. Un proceso para la preparación de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, dicho proceso comprende la unión covalente de grupos tiol a una glucoproteína eritropoyetina y el acoplamiento de la glucoproteína eritropoyetina activada resultante con un derivado de poli(etilen glicol) (PEG).

37. Los conjugados y las composiciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, siempre



que se preparen mediante el proceso de la reivindicación 36.

38. Los conjugados y las composiciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, (para el tratamiento de enfermedades que están asociadas con la anemia en pacientes con fallo renal crónico (CRF), y pacientes con SIDA y cáncer que han sido tratados con quimioterapia.

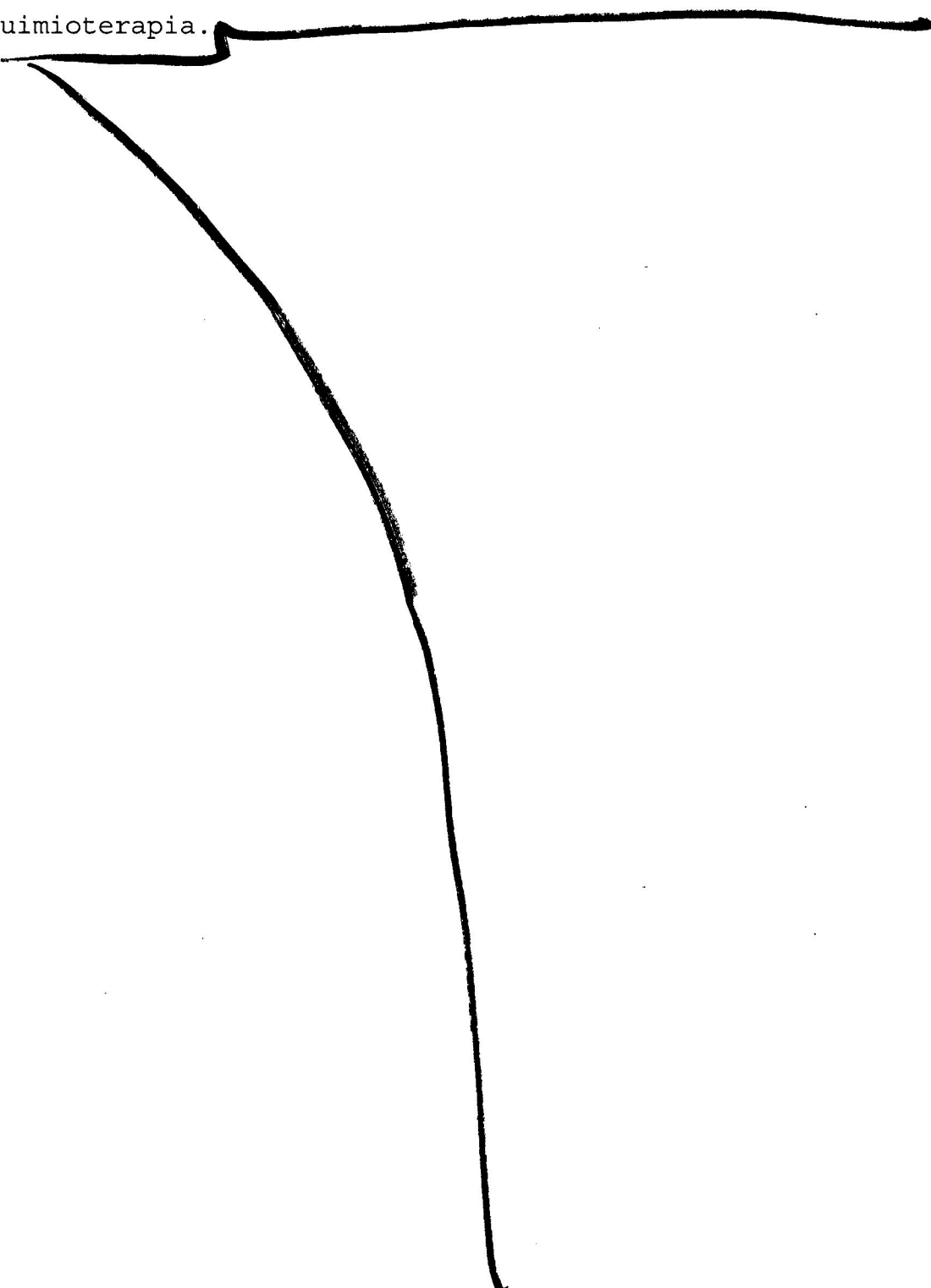


FIGURA 1

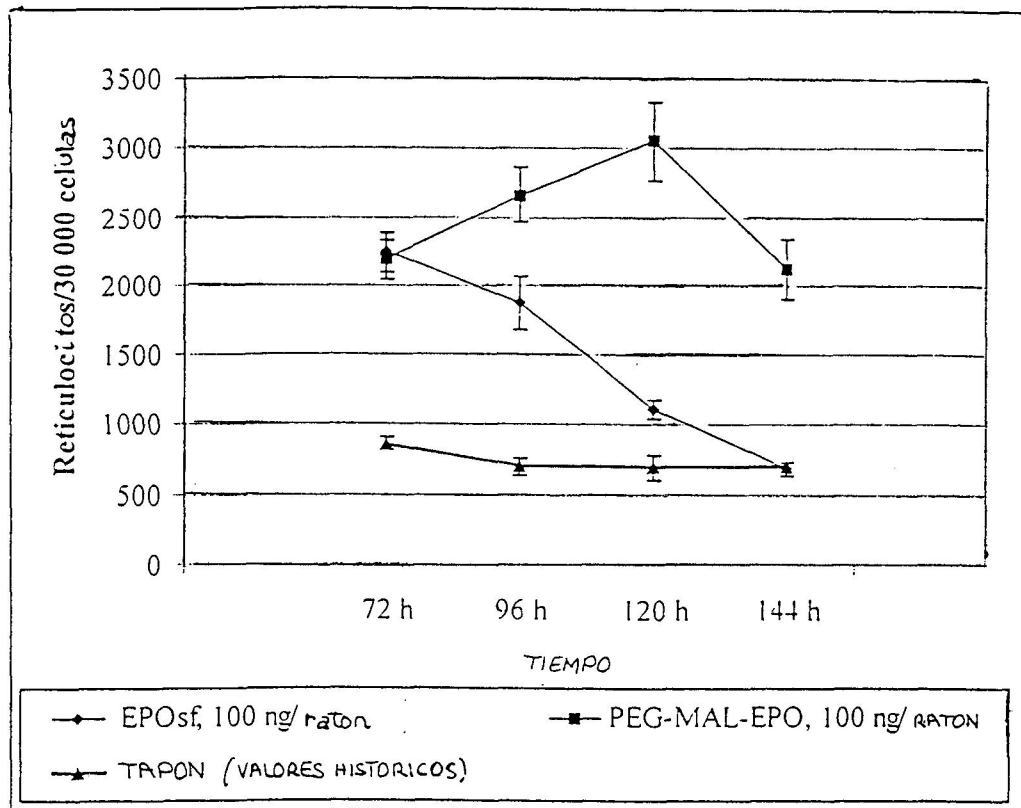
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
Cys Arg Thr Gly Asp¹⁶⁵

FIGURA 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
Cys Arg Thr Gly Asp Arg¹⁶⁶

376 380

FIGURA 3



377

anagenesis phyletic evolution within a single lineage without subdivision or splitting; the opposite of cladogenesis.

analog a compound related to, but slightly different structurally from a biologically significant molecule, such as an amino acid (see *azaserine*), a pyrimidine or purine (see *base analogs*), or a hormone (see *ZR515*).

analogous referring to structures or processes that have evolved convergently, as opposed to the term *homologous* (*q.v.*). Analogous structures have similar functions but are different in evolutionary origin: e.g., the wing of a butterfly and of a bat.

analogue alternative spelling of *analog* (*q.v.*).

analysis of variance a statistical technique that allows the partitioning of the total variation observed in an experiment among several statistically independent possible causes of the variation. Among such causes are treatment effects, grouping effects, and experimental errors. Checking the absence of an effect due to the treatment is often the purpose of the inquiry. The statistical test of the hypothesis that the treatment had no effect is the *F* test, or variance-ratio test. If the ratio of the mean square for treatments to the mean square for error exceeds a certain constant that depends on the respective degrees of freedom of the two mean squares at a chosen significance level, then the treatments are inferred to have been effective. Analysis of variance is particularly useful in judging which sources of uncontrolled variation in an experiment need to be allowed for in testing treatment effects.

anamnestic response See *immune response, immunological memory*.

anaphase See *mitosis*.

anaphase lag delay in the movement of one or more chromosomes from the metaphase plate during anaphase, often resulting in chromosome loss (*q.v.*).

anaphylaxis a systemic allergic or hypersensitivity response leading to immediate respiratory and/or vascular difficulties.

Anas platyrhynchos the mallard duck, ancestor to the domestic or Pekin duck, *A.p. domestica*.

anastomosis the joining of two or more cell processes or tubular vessels to form a branching s.

anastral mitosis the type of mitosis characteristically found in plants. A spindle forms, but no centrioles or asters are observed.

anautogenous insect an adult female insect that must feed for egg maturation. See *autogenous insect*.

anchorage-dependent cells cells (or *in vitro* cell cultures) that will grow, survive, or maintain function only when attached to an inert surface such as glass or plastic; also known as *substrate-dependent cells*. See *microcarriers, suspension culture*.

Anderson disease a hereditary glycogen storage disease of humans arising from a deficiency of the enzyme amylo-(1,4:1,6)-transglucosidase. Inherited as an autosomal recessive. Prevalence 1/500,000.

androdioecy a sexual dimorphism in plants having bisexual and separate male individuals.

androecious referring to plants having only male flowers.

androecium the aggregate of the stamens in a flower.

androgen any compound with male sex hormone activity. In mammals, the most active androgens are synthesized by the interstitial cells of the testis. See *testosterone*.

androgenesis 1. development from a fertilized egg followed by disintegration of the maternal nucleus prior to syngamy. The resulting individual possesses only paternal chromosomes and is haploid. 2. production of an embryo having a diploid set of paternal chromosomes by nuclear transfer (*q.v.*). Compare with *gynogenesis*.

androgenic gland a gland found in most crustaceans belonging to the subclass Malacostraca. When implanted into maturing females, the gland brings about masculinization of primary and secondary sex characters.

androgen insensitivity syndrome a condition in which XY individuals develop as normal-appearing, but sterile, females. Spermatogenesis does not occur in the testes, which are generally located inside the abdomen. See *androgen receptor, androgen receptor gene*.

androgenote a cell or embryo produced by androgenesis. Compare with *gynogenote*.

androgen receptor (AR) a protein belonging to a subfamily of steroid hormone receptors within a larger family of DNA-binding proteins. The human AR is made up of 910 amino acids and contains two centrally located, zinc finger domains and an androgen-binding domain at its C-terminal end. See *androgen, testosterone, vitamin D receptor, zinc finger protein*.

androgen receptor gene a gene residing on the long arm of the human X chromosome near the cen-

2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio 005

Radicación no 00-48531

Concepto Técnico no 725

Clasificación Internacional de Patentes A 61 K 38 / 02 // 35 / 12

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ Contiene un resumen de la invención (Art.26-e).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción de la invención (Art.26-b).
- SI ☒ NO ☐ NO ES APLICABLE ☐ Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d)
- SI ☒ NO ☐ Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c).
- SI ☐ NO ☐ NO ES APLICABLE ☒ Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h).
- SI ☐ NO ☐ NO ES APLICABLE ☒ Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afroamericanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-i).
- SI ☒ NO ☐ La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J).
- SI ☒ NO ☐ La prioridad coincide con la materia reivindicada.
- SI ☒ NO ☐ **CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☐ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

1. Se anexa nuevo Resumen, Objeto y Finalidad de la Invención (Folio 360), nuevos párrafos 3,5,14,16,17,20,27 y 41 de la descripción (Folios 361 a 368) y nuevo capítulo reivindicatorio (Folios 369 a 380).
2. Se presenta también nuevo Extracto para Publicación, nueva Tarjeta de Archivo Temático y los otros finales según lo requerido.

EXAMINADOR TÉCNICO

202040

Bogotá D. C., Abril 10, 2002.

379

Folio 386

416

200 2-07-30

2020
Bogotá, D.C.

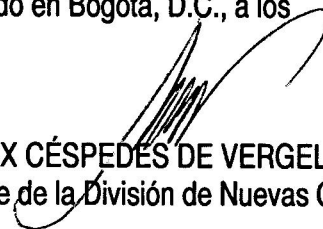
Doctor(a)
JOSÉ ANTONIO LLOREDA
Apoderado(a)

REFERENCIA:	Radicación No.	00-48531
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No.	849
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la comunidad andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase

Dado en Bogotá, D.C., a los


ALIX CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Bogotá, D.C., 04-09-02 El extracto de esta solicitud fue publicado en el número 518 de la Gaceta de Propiedad Industrial, de fecha 30-07-02. El término hábil señalado por la ley expiró el 25-10-02 y SI ☐ NO ☒ se presentaron oposiciones por parte de terceros.

202040