



BT

Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PCT

PATENTE DE INVENCION

08-75688

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

MUTANTES DE FSH

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

LABORATOIRES SERONO S.A.

DOMICILIO

VAUD, SUIZA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-075688- -00000-0000

Fecha: 2008-07-22 16:12:09 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL**

26 Julio 2008

SOLICITUD DE:

1

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

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **LABORATOIRES SERONO S.A.**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Suiza..Dirección: Centre Industriel,
1267 Coinsins,
Vaud,
SuizaDomicilio: Vaud,
Suiza**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Marco MUDA**
279 Havard Street #11,
Massachusetts 02139,
Cambridge,
Estados Unidos de América3. **Sean MCKENNA**
679 Lincoln Street,
Massachusetts 02332,
Duxbury,
Estados Unidos de América2. **Xuliang JIANG**
73 Kelley Drive,
Massachusetts 02184,
Braintree,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2006/048898Fecha: 21 de diciembre de 2006Publicación Internacional No. WO 2008/010840 A3Fecha: 24 de enero de 2008

6

Título (54)**MUTANTES DE FSH**

7

Clasificación Internacional (51) C07K 014/043

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

22 de diciembre de 2005

(31) Número de Solicitud

60/753,637

9

Comprobante de pago No.: 08-35,774
08-45,981Fecha: 6 de mayo de 2008
9 de junio de 2008

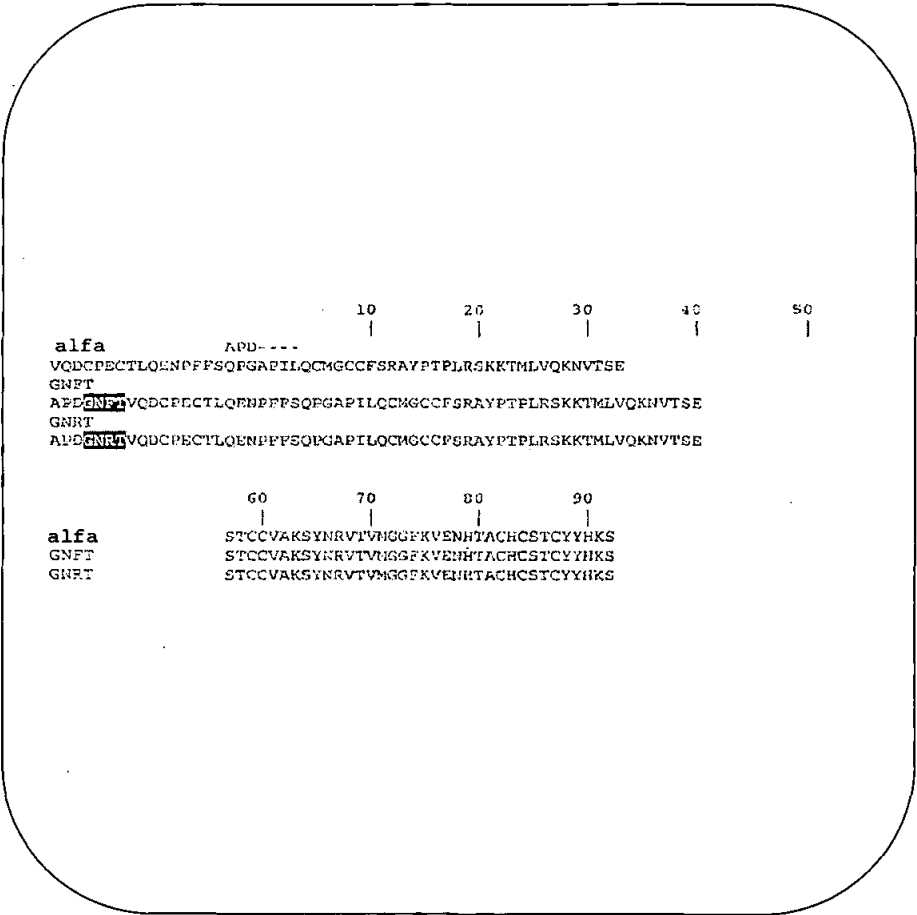
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 501.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ 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 efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar 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.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ 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, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA:

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/010840 A3

Descripción:

Páginas 17 en el idioma original

Páginas 33 en español

Reivindicaciones: Número (s) 18

Figuras: Número (s) 2

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

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

LABORATOIRES SERONO SA

domiciliado (s) en/of

Centre Industriel,

1267 Coinsins.

Suiza

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el párrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad, and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. In any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in

© CAVELIER ABOGADOS
WPP0DE01-179 (MINUTA 12.1.1.2.5)

BLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

5

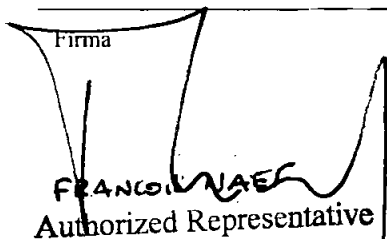
el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

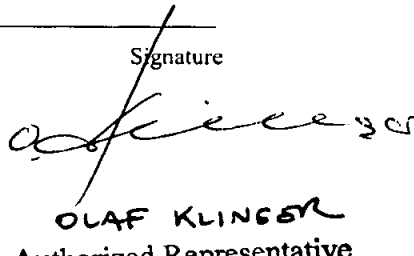
Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la acción de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

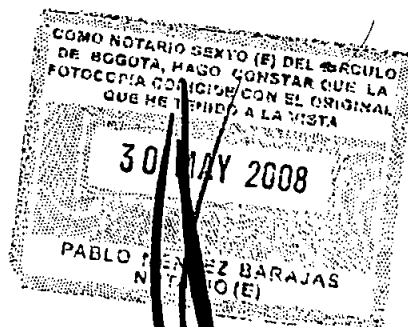
their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 26 February 2008
en/in Geneva
por/by Laboratoires Serono SA

Firma

FRANCO NAEFF
Authorized Representative

Signature

OLAF KLINGER
Authorized Representative



CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de

de la compañía

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de

que la dirección de dicha compañía es

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en

El

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of

Francois Naef and Olaf Klinger

is authentic, that the signatory currently acts in the position of

Authorised Representatives

of the company Laboratoires Sero SA

a company currently existing and organized under the laws of

Switzerland

that the address is Centre Industriel, 1267 Coinins,
Vaud, Switzerland

and that the signatory has the power to grant this document.

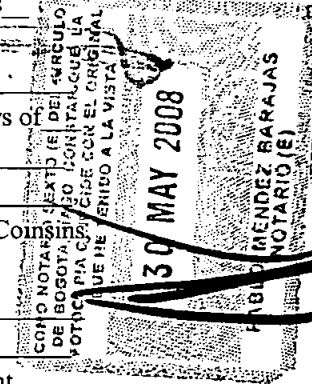
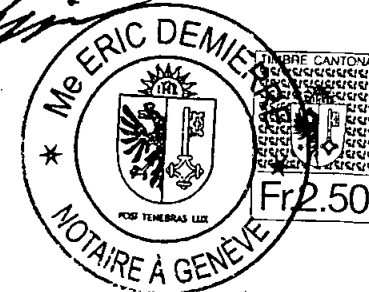
The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

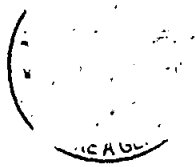
Given and signed in Geneva, Switzerland

On 12th day of March, 2008.

Eric Demierre

El Notario Público - The Notary Public
(Firma-sello) (Signature-seal)





APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Pays: Suisse

Le présent acte pub...

2. a été signé par M. E. Demierre

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de 11

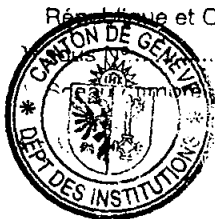
Attesté

5. à Genève

6. le 12 MAR 2008

7.

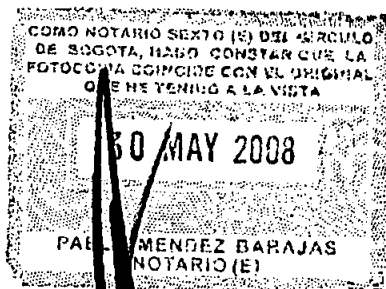
République et Canton de Genève



10. Signature

Gj

Goran JOVANOVIĆ



TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 270/2008-.

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCES. LLEVA SELLO Y FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTÉRPRETE OFICIAL, SEGÚN RESOLUCIÓN No. 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972.-

TRADUCCION DE LOS SELLOS QUE SE ENCUENTRAN EN EL DOCUMENTO DE REPRESENTACION Y PODER OTORGADO POR **LABORATOIRES SERONO S.A** DOMICILIADOS EN CENTRE INDUSTRIEL, 1267 COINSINS, SUIZA, A LOS DOCTORES **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y DANIEL PEÑA**

DADO Y FIRMADO EN GINEBRA EL 26 DE FEBRERO DE 2008.

FIRMADO: FRANCOIS NAEF, REPRESENTANTE AUTORIZADO

FIRMADO: OLAF KLINGER, REPRESENTANTE AUTORIZADO

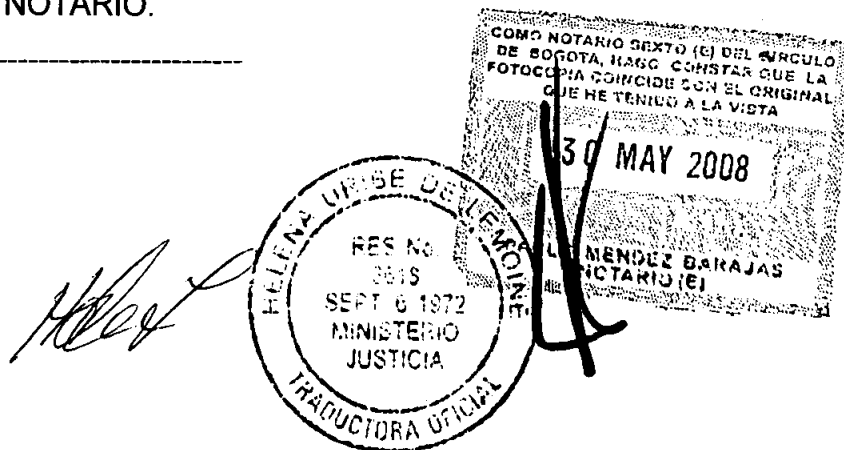
CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

EL INFRASCRITO NOTARIO CERTIFICA QUE LAS FIRMAS QUE ANTECEDEN DE LOS SEÑORES **FRANCOIS NAEF Y OLAF KLINGER** SON AUTÉNTICAS; QUE LOS SIGNATARIOS DESEMPEÑAN ACTUALMENTE LOS CARGOS DE REPRESENTANTES AUTORIZADOS DE LA COMPAÑÍA **LABORATOIRES SERONO SA**, SOCIEDAD QUE ACTUALMENTE EXISTE Y ESTÁ ORGANIZADA DE ACUERDO A LAS LEYES DE SUIZA; QUE LA DIRECCION DE LA DICHA COMPAÑÍA ES CENTRE INDUSTRIEL, 1267 COINSINS, VAUD, SUIZA Y QUE LOS SIGNATARIOS TIENE FACULTAD PARA OTORGAR ESTE DOCUMENTO. TODOS LOS HECHOS ANTERIORES LE CONSTAN POR HABER EXAMINADO LOS DOCUMENTOS RESPECTIVOS Y DE TODO ELLO DA FE.

DADO Y FIRMADO EN GINEBRA, SUIZA, EL 12 DE MARZO DE 2008

FIRMADO: ERIC DEMIERRE, NOTARIO PUBLICO EN GINEBRA.

HAY SELLO DEL NOTARIO.



APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE 1961)

1. PAÍS: SUIZA

EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO:

2. HA SIDO FIRMADO POR: ABOGADO E. DEMIERRE

3. ACTUANDO EN SU CALIDAD DE: NOTARIO

4. LLEVA EL SELLO DE: NOTARIO

CERTIFICADO

5. EN: GINEBRA

6. EL: 12 DE MARZO DE 2008

7. POR: REPUBLICA Y CANTON DE GINEBRA

8. BAJO EL NO.: 0010

9. SELLO: CANTON DE GINEBRA, DEPARTAMENTO DE INSTITUCIONES.

10. FIRMADO: GORAN JOVANOVIĆ

LA TRADUCTORA OFICIAL

HELENA URIBE DE LEMOINE

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2008 ABR - 2 A 11:22
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

745991
Helena Uribe
CANTON DE GINEBRA
DEPARTAMENTO DE INSTITUCIONES



9

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 January 2008 (24.01.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/010840 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 14/59 (2006.01) A61K 38/24 (2006.01)
C12N 15/16 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2006/048898

(22) International Filing Date:

21 December 2006 (21.12.2006)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/753,637 22 December 2005 (22.12.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): LABO-
RATOIRES SERONO S.A. [CH/CH]; Centre Industriel,
CH-1267 Coinsins (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MUDA, Marco
[US/US]; 8 Perry Street #1, Brookline, MA 02445 (US).
JIANG, Xuliang [US/US]; 73 Kelley Drive, Braintree,
MA 02184 (US). MCKENNA, Sean, D. [US/US]; 679
Lincoln Street, Duxbury, MA 02332 (US).

(74) Agent: BOSSONE, Steven, A.; Serono Research Institute,
One Technology Place, Rockland, MA 02370 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,

CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, 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),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:
20 March 2008

(54) Title: FSH MUTANTS

	10	20	30	40	50
alpha					
APD----					
VQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					
GNFT					
APDGNFTVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					
GNRT					
APDGNRTVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					
	60	70	80	90	
alpha					
GNFT					
GNRT					
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS					
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS					
STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS					

(57) Abstract: FSH mutants with increased glycosylation and longer half-lives are described. The use of FSH mutants for inducing folliculogenesis in human patients is also described.

WO 2008/010840 A3

FSH MUTANTS

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. Field of the Invention

[0001] The present invention relates to human reproduction. More specifically, the present invention relates to fertilization therapies.

2. Description of Related Art

a. Gonadotropins

[0002] Follicle stimulating hormone (FSH) is a member of the family of gonadotrophins that play key roles in human fertility. The gonadotrophins, which also include luteinising hormone (LH) and chorionic gonadotrophin (CG), are heterodimers, each consisting of a common α -subunit (92 amino acids) and a unique β -subunit (111 amino acids in FSH). The amino acid sequences of the mature forms of the α - and β -subunits of FSH are shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, respectively.

[0003] Human FSH has been isolated from pituitary glands and from postmenopausal urine (EP 322,438) and has been produced recombinantly in mammalian cells (US 5,639,640, US 5,156,957, US 4,923,805, US 4,840,896, US 5,767,251, EP 211,894 and EP 521,586). The latter references also disclose the human FSH β -subunit gene. US 5,405,945 discloses a modified human α -subunit gene comprising only one intron.

[0004] Liu et al., J Biol Chem 1993,15; 268 (2): 21613-7, Grossmann et al., Mol Endocrinol 1996 10 (6): 769-79, Roth and Dias (Mol Cell Endocrinol 1995 1; 109 (2): 143-9, Valove et al., Endocrinology 1994; 135 (6): 2657-61, Yoo et al., J Biol Chem 1993 25; 268 (18): 13034-42), US 5,508,261 and Chappel et al., 1998, Human Reproduction, 13 (3): 1835 disclose various structure-function relationship studies and identify amino acid residues involved in receptor binding and activation and in dimerization of FSH.

b. Use of Gonadotropins in Assisted Reproductive Techniques

[0005] The gonadotrophins play crucial roles in the reproductive cycle, and their use in exogenous therapies is essential for assisted reproductive techniques (ART), such as *in vitro* fertilization (IVF), IVF in conjunction with intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) and embryo transfer (ET), as well as for ovulation induction (OI) in anovulatory patients undergoing *in vivo* fertilization either naturally or through intrauterine insemination (IUI).

[0006] US 4,589,402 and US 4,845,077 disclose purified human FSH which is free of LH and the use thereof for *in vitro* fertilization. EP 322 438 discloses a protein with at least 6200

U/mg FSH activity which is substantially free of LH activity, and wherein the FSH α -subunit and the β -subunit, respectively, may be wild type or specified truncated forms thereof.

[0007] Prolonged therapy is necessary to achieve a therapeutic effect, typically for 8-10 consecutive days and sometimes up to 21 days to stimulate folliculogenesis in women, and for up to 18 months in hypogonadotrophic males to induce spermatogenesis. Recombinant hFSH is typically administered as an i.m. or s.c. daily injection, with consequent discomfort and potential for local injection site reaction. Decreasing the frequency of administration would facilitate therapy and render gonadotrophin administration more convenient, more tolerable and patient-friendly.

c. Glycosylation of FSH

[0008] The gonadotrophins are glycoproteins, with each sub-unit having asparagine-linked (N-linked) oligosaccharide side chains that are important for *in vivo* activity and function. Carbohydrate addition (glycosylation) to polypeptides is a post-translational event that results in the addition of sugar chains to specific asparagine (N-linked) or serine/threonine (O-linked) amino acids. In contrast to the invariant amino acid sequence of the protein portion of glycoproteins, the carbohydrate structures are variable, a feature referred to as microheterogeneity. For example, N-glycosylation sites on the same protein may contain different carbohydrate structures. Furthermore, even at the same glycosylation site on a given glycoprotein, different carbohydrate structures may be found. This heterogeneity is a consequence of the non-template-directed synthesis of carbohydrates.

[0009] N-glycosylation of proteins occurs specifically at the consensus pattern Asn-Xaa-Ser/Thr, and to a lesser extent at the consensus pattern Asn-Xaa-Cys, where Xaa can be any amino acid residue. However, the presence of a consensus tripeptide is not sufficient to insure that an asparagine residue will be glycosylated. For example, N-glycosylation of the Asn-Pro-Ser/Thr sequence occurs at a rate 50-times lower than the other consensus patterns of Asn-Xaa-Ser/Thr.

[0010] Human FSH contains four N-linked glycosylation sites: two on the common α -subunit at positions 52 and 78 and two on the β -subunit at positions 7 and 24. Carbohydrates attached to the α -subunit of FSH are critical for dimer assembly, integrity, secretion and signal transduction, whereas β -subunit carbohydrates are important for dimer assembly, secretion and clearance of the heterodimer from the circulation.

[0011] Galway et al., Endocrinology 1990; 127 (1) : 93-100 demonstrate that FSH variants produced in a N-acetylglucosamine transferase-I CHO cell line or a CHO cell line defective in sialic acid transport are as active as FSH secreted by wild type cells or purified pituitary

FSH *in vitro*, but lacked *in vivo* activity, presumably due to rapid clearance of the inadequately glycosylated variants in serum. D'Antonio et al., Human Reprod 1999; 14 (5): 1160-7 describe various FSH isoforms circulating in the blood stream. The isoforms have identical amino acid sequences, but differ in their extent of post-translational modification. It was found that the less acidic isoform group had a faster *in vivo* clearance as compared with the acidic isoform group, possibly due to differences in the sialic acid content between the isoforms. Moreover, Bishop et al. Endocrinology 1995; 136 (6): 2635-40 conclude that circulatory half-life appears to be the primary determinant of *in vivo* activity. These observations led to the hypothesis that the half-life of FSH could be increased by introducing additional glycosylation sites to increase the sialic acid content of the polypeptide.

d. FSH Variants

[0012] FSH agonists with increased half-lives have been developed by fusing the carboxyterminal peptide of hCG (CTP) to native recombinant human FSH (rhFSH). The CTP moiety consists of amino acids 112-118 to 145 with four O-linked glycosylation sites located at positions 121, 127, 132 and 138. US 5,338,835 and US 5,585,345 disclose a modified FSH β -subunit extended at the C-terminal Glu with the CTP moiety of hCG. The resulting modified analogue is stated to have the biological activity of native FSH, but a prolonged circulating half-life. US 5,405,945 discloses that the carboxy terminal portion of the hCG β -subunit or a variant thereof has significant effects on the clearance of CG, FSH, and LH.

[0013] US 5,883,073 discloses single-chain proteins comprised of two α -subunits with agonist or antagonist activity for CG, TSH, LH and FSH. US 5,508,261 discloses heterodimeric polypeptides having binding affinity to LH and FSH receptors comprising a glycoprotein hormone α -subunit and a non-naturally occurring β -subunit polypeptide, wherein the β -subunit polypeptide is a chain of amino acids comprising four joined subsequences, each of which is selected from a list of specific sequences. Klein et al. (2003) discloses a single chain analogue of FSH with an increased half-life, wherein the α - and β -subunits are linked by an oligopeptide containing two N-linked glycosylation sites.

[0014] WO 01/58493 discloses 77 mutations that may be made in the α -subunit of FSH and 51 mutations that may be made in the β -subunit of FSH in an attempt to improve the *in vivo* half-life of FSH. In addition, WO 01/58493 discloses that one or more glycosylation sites may be added to the N-terminus of FSH to improve its half-life or inserted at various sites within the FSH polypeptide. WO 01/58493, while describing that glycosylation sites may be

inserted into the FSH polypeptide, it provided no guidance as the specific site(s) where one could insert a glycosylation site and maintain FSH activity. WO 01/58493 further discloses that the mutant α - and β -subunits may be used individually (1 additional glycosylation site) or in combination (2 additional glycosylation sites). The 128 candidate mutants were identified by using 50 models of the 3D structure of FSH that were generated based solely on the structure of hCG and a sequence alignment of FSH and hCG despite only 32% identity between the β -subunits of hCG and FSH. WO 01/58493 does not disclose the production or testing of any α - or β -subunits of FSH where a glycosylation site was introduced by site directed mutagenesis.

[0015] WO 05/020934 discloses GM1, with mutations in both the α - and β -subunits of FSH, including a double mutation at β E55N/V57T, i.e., the E residue at amino acid position 55 mutated to N and the V residue at amino acid position 57 mutated to T. The amino acid sequence of β E55N/V57T is shown in SEQ ID NO:3.

[0016] A clinical need exists for a product which provides part or all of the therapeutically relevant effects of FSH, and which may be administered at less frequent intervals as compared to currently available FSH products, and which preferably provides a more stable level of circulating FSH activity as compared to that obtainable by current treatment.

[0017] The present invention is directed to such products as well as the means of making such products.

SUMMARY

[0018] The present invention relates to mutant FSH molecules, wherein the FSH α -subunit comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5 and wherein the FSH β -subunit comprises SEQ ID NO: 3. The FSH may be N-glycosylated at 0, 1, 2, 3, 4, 5 or 6 asparagine residues of said mutant FSH. In one embodiment N5 of the mutant α -subunit of SEQ ID NO:4 may be glycosylated. In another embodiment N5 of the mutant α -subunit of SEQ ID NO:5 may be glycosylated. In one embodiment N55 of the mutant β -subunit of SEQ ID NO:3 may be glycosylated.

[0019] The present invention also relates to isolated DNA molecules encoding FSH α -subunit mutants selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5. The present invention also relates to an isolated DNA encoding an FSH β -subunit comprising the sequence of SEQ ID NO:3.

74

[0020] The present invention also relates to a vector comprising DNA encoding an FSH α -subunit mutant selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5. The vector may be an expression vector.

[0021] The present invention also relates to a vector comprising DNA encoding an FSH β -subunit mutant comprising the sequence of SEQ ID NO:3. The vector may be an expression vector.

[0022] The present invention also relates to a vector comprising a first DNA and a second DNA, wherein the first DNA encodes an FSH α -subunit mutant selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5 and wherein the second DNA encodes an FSH β -subunit mutant comprising the sequence of SEQ ID NO:3. The vector may be an expression vector.

[0023] The present invention also relates to a cell comprising a vector comprising DNA encoding an FSH α -subunit mutant selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5. The vector may be an expression vector. The cell may be a mammalian cell, e.g., a CHO cell.

[0024] The present invention also relates to a cell comprising a vector comprising DNA encoding an FSH β -subunit mutant comprising the sequence of SEQ ID NO:3. The vector may be an expression vector. The cell may be a mammalian cell, e.g., a CHO cell.

[0025] The present invention also relates to a cell comprising a vector comprising a first DNA and a second DNA, wherein the first DNA encodes an FSH α -subunit mutant selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5 and wherein the second DNA encodes an FSH β -subunit mutant comprising the sequence of SEQ ID NO:3. The vector may be an expression vector. The cell may be a mammalian cell, e.g., a CHO cell.

[0026] The present invention also relates to a cell comprising a first and a second vector, wherein the first vector comprises DNA encoding an FSH α -subunit mutant selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5 and the second vector comprises DNA encoding an FSH β -subunit mutant comprising the sequence of SEQ ID NO:3. The vector(s) may be an expression vector. The cell may be a mammalian cell, e.g., a CHO cell.

[0027] The present invention also relates to a method for producing an FSH mutant comprising culturing mammalian cells capable of glycosylating proteins, wherein said cells comprise a first expression vector comprising DNA encoding an FSH α -subunit mutant selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5 and a second expression vector comprising DNA encoding an FSH β -subunit mutant comprising the sequence of SEQ ID NO:3. In another embodiment of the present invention said cells comprise a single vector comprising DNA encoding an FSH α -subunit mutant selected from the group consisting of

SEQ ID NOS:4-5 and further comprising DNA encoding an FSH β -subunit mutant comprising the sequence of SEQ ID NO:3.

[0028] The present invention also relates to a composition comprising an FSH mutant and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient, wherein the FSH α -subunit comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5 and wherein the FSH β -subunit comprises SEQ ID NO:3.

[0029] The present invention also relates to a method of treating an infertile mammal, comprising administering to a mammal in need thereof an effective amount of a mutant FSH mutant, wherein the FSH α -subunit comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5 and wherein the FSH β -subunit comprises SEQ ID NO:3.

[0030] The present invention also relates to a method of stimulating folliculogenesis in a mammal, comprising administering to a mammal in need thereof an effective amount of a mutant FSH, wherein the FSH α -subunit comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5 and wherein the FSH β -subunit comprises SEQ ID NO:3. The present invention also relates to a method of inducing ovarian hyperstimulation in a mammal, comprising administering to a mammal in need thereof an effective amount of a mutant FSH, wherein the FSH α -subunit comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS:4-5 and wherein the FSH β -subunit comprises SEQ ID NO:3.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows an alignment of the GNFT (SEQ ID NO: 4), and GNRT (SEQ ID NO:5) α -subunit mutants to the human α -subunit of FSH (SEQ ID NO: 1). The residue numbers refer to the human α -subunit of FSH (SEQ ID NO: 1) with 1 being the first amino acid of the mature polypeptide.

[0031] Figure 2 shows a dose-response curve for the mutant FSH α -subunits compared to wild-type FSH. Clone 10c- α GNRT/GM1 β . Clone 11c- α GNFT/ GM1 β .

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0032] While it has been shown that increasing the carbohydrate content of FSH may lead to increased *in vivo* half-life, improving the half-life of FSH is more complicated than simply adding additional glycosylation sites. While a glycosylation consensus sequence is necessary for carbohydrate addition, it is not sufficient to ensure that a carbohydrate addition site will be utilized. Other factors, such as the local protein folding and conformation during

16

biosynthesis, determine whether an oligosaccharide is attached at a given consensus sequence site. In addition, in order for the additional glycosylation to lead to an increase in the *in vivo* half-life the consensus sequence must be in a position such that glycosylation of the site does not interfere with receptor binding, or compromise the folding, conformation or stability of the glycoprotein. To this point, FSH analogues with increased half-lives have primarily been limited to fusion proteins wherein the fused portion of the polypeptide included additional glycosylation sites.

1. Mutant FSH

[0033] An FSH mutant is provided that has been modified to create additional glycosylation recognition sites. The α -subunit of the FSH mutant may have one of the following mutations, compared to the wild-type α -subunit: an insertion of the amino acid sequence GNFT between amino acid residues 3 and 4 of the wild type α -subunit or an insertion of the amino acid sequence GNRT between amino acid residues 3 and 4 of the wild type α -subunit. A mutant FSH may comprise any of the above mutant α -subunits in combination with mutant β -subunit, e.g. β GM1 containing the following mutation: E55N/V57T. One or more of the additional glycosylation sites of the recombinant FSH may be glycosylated. The one or more additional glycosylation sites of the mutant FSH may be glycosylated *in vitro* or *in vivo*. As used herein, the term "GNFT mutant" refers to a mutant FSH comprising an α subunit as set out in SEQ ID NO:4 and a β subunit as set out in SEQ ID NO:3. As used herein, the term "GNRT mutant" refers to a mutant FSH comprising an α subunit as set out in SEQ ID NO:3 and a β subunit as set out in SEQ ID NO:3

[0034] The FSH mutant may be produced by any suitable method known in the art. These methods include the construction of nucleotide sequences encoding the respective FSH mutants and expressing the amino acid sequence in a suitable transfected host. The FSH mutant may also be produced by chemical synthesis or by a combination of chemical synthesis and recombinant DNA technology.

[0035] The FSH mutant may comprise the α - and β -subunits of FSH in the form of two separate polypeptide chains, where the two chains dimerize *in vivo* so as to form a dimeric polypeptide, or it may comprise a single chain construct comprising the two subunits covalently linked by a peptide bond or a peptide linker. The amino acid residues of the linker peptide may exhibit properties that do not interfere significantly with the activity of the FSH mutant.

[0036] The FSH mutant may have an increased half-life compared to wild type FSH. The FSH mutant may also have increased stability compared to wild type FSH. The FSH mutant

may comprise oligosaccharides at 0, 1, 2, 3, 4, 5 or 6 of the N-linked glycosylation sites. A population of FSH mutants is also provided, which may comprise one or more FSH mutant isoforms, wherein each isoform comprises oligosaccharides at 0, 1, 2, 3, 4, 5 or 6 of the N-linked glycosylation sites.

[0037] The nucleotide sequence encoding the α - or β -subunits of the FSH mutant may be constructed by isolating or synthesizing a nucleotide sequence encoding the parent FSH subunit, such as the hFSH- α or hFSH- β with the amino acid sequences shown in SEQ ID NOS: 1 and 2, respectively. The nucleotide sequence may then be changed so as to effect the substitution or insertion of the relevant amino acid residues. The nucleotide sequence can be modified by site directed mutagenesis. In the alternative, the nucleotide sequence may be prepared by chemical synthesis, wherein oligonucleotides are designed based on the specific amino acid sequence of the FSH mutant.

[0038] The nucleotide sequence encoding the polypeptide may be inserted into a recombinant vector and operably linked to a control sequence necessary for expression of the polypeptide in the desired transfected host cell. The control sequences may be any component that is necessary or advantageous for the expression of a polypeptide. Examples of suitable control sequences for directing transcription in mammalian cells include the early and late promoters of SV40 and adenovirus, *e.g.* the adenovirus 2 major late promoter, the MT-1 (metallothionein gene) promoter and the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter (CMV).

[0039] One of skill in the art may make a selection among these vectors, expression control sequences and hosts without undue experimentation. The recombinant vector may be an autonomously replicating vector, *i.e.* a vector which exists as an extrachromosomal entity, the replication of which is independent of chromosomal replication, *e.g.* a plasmid.

Alternatively, the vector may be one which, when introduced into a host cell, is integrated into the host cell genome and replicated together with the chromosome(s) into which it has been integrated.

[0040] The vector may be an expression vector in which the nucleotide sequence encoding the polypeptide of the invention is operably linked to additional segments required for transcription of the nucleotide sequence. The vector may be derived from plasmid or viral DNA. A number of suitable expression vectors for expression in the host cells mentioned herein are commercially available or described in the literature.

[0041] The recombinant vector may further comprise a DNA sequence enabling the vector to replicate in the host cell in question. An example of such a sequence, (when the host cell is a

mammalian cell) is the SV40 origin of replication. The vector may also comprise a selectable marker, *e.g.* a gene whose product complements a defect in the host cell, such as the gene coding for dihydrofolate reductase (DHFR) or one which confers resistance to a drug, *e.g.* ampicillin, kanamycin, tetracycline chloramphenicol, neomycin, hygromycin or methotrexate.

[0042] The vector may also comprise an amplifiable gene, such as *DHFR*, such that cells having multiple copies of the amplifiable gene and flanking sequences, including the mutant FSH DNA, can be selected for on appropriate media.

[0043] Also provided is a DNA encoding an α -subunit of the FSH mutant. The nucleotide sequence encoding the alpha and beta subunits of the FSH mutant, whether prepared by site-directed mutagenesis, synthesis, PCR or other methods, may optionally also include a nucleotide sequence that encodes a signal peptide. The signal peptide may be present when the polypeptide is to be secreted from the cells in which it is expressed. Such signal peptide, if present, may be one recognized by the cell chosen for expression of the polypeptide. The signal peptide may be homologous (*e.g.* be that normally associated with a hFSH subunit) or heterologous (*i.e.* originating from another source than hFSH) to the polypeptide or may be homologous or heterologous to the host cell, *i.e.* be a signal peptide normally expressed from the host cell or one which is not normally expressed from the host cell.

[0044] Any suitable host may be used to produce the polypeptides, including bacteria, fungi (including yeasts), plant, insect, mammal, or other appropriate animal cells or cell lines, as well as transgenic animals or plants. Examples of suitable mammalian host cells include Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, (*e.g.* CHO-KL; ATCC CCL-61), Green Monkey cell lines (COS) (*e.g.* COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); mouse cells (*e.g.* NSIO), Baby Hamster Kidney (BI-EK) cell lines (*e.g.* ATCC CRL-1632 or ATCC CCL-10), and human cells (*e.g.* BEK 293 (ATCC CRL-1573)), as well as plant cells in tissue culture. Additional suitable cell lines are known in the art and available from public depositories such as the American Type Culture Collection, USA. Methods for introducing exogenous DNA into mammalian host cells include calcium phosphate-mediated transfection, electroporation, DEAE-dextran mediated transfection, liposome-mediated transfection and viral vectors.

[0045] Cells may be cultivated in a nutrient medium suitable for production of the polypeptide using methods known in the art. For example, the cell may be cultivated by shake flask cultivation, small-scale or large-scale fermentation (including continuous, batch, fed-batch, or solid state fermentations) in laboratory or industrial fermenters performed in a suitable medium and under conditions allowing the polypeptide to be expressed and/or

isolated. The cultivation takes place in a suitable nutrient medium comprising carbon and nitrogen sources and inorganic salts, using procedures known in the art. Suitable media are available from commercial suppliers or may be prepared according to published compositions (e.g. in catalogues of the American Type Culture Collection). If the polypeptide is secreted into the nutrient medium, it can be recovered directly from the medium. If the polypeptide is not secreted, it can be recovered from cell lysates. One method of high-yield production of the FSH mutants of the invention is through the use of dihydrofolate reductase (DHFR) amplification in DHFR-deficient CHO cells, by the use of successively increasing levels of methotrexate as described in US Patent No. 4,889,803.

[0046] The resulting mutant FSH polypeptide may be recovered by methods known in the art. For example, it may be recovered from the nutrient medium by conventional procedures including, but not limited to, centrifugation, filtration, extraction, spray drying, evaporation, or precipitation. The mutant FSH polypeptides may be purified by a variety of procedures known in the art including, but not limited to, chromatography (e.g. ion exchange, affinity, hydrophobic, chromatofocusing, and size exclusion), electrophoretic procedures (e.g. preparative isoelectric focusing), differential solubility (e.g. ammonium sulfate precipitation), SDS-PAGE, or extraction.

[0047] Also provided is a pharmaceutical composition comprising the FSH mutant. Such pharmaceutical composition may be used to stimulate folliculogenesis, for example in conjunction with ovulation induction or assisted reproductive techniques (ART). Because the FSH mutant of the present invention may be effective in inducing multiple follicles to develop and mature, it may be particularly suitable for use in ART, in which it is desired to collect multiple oocytes.

[0048] The FSH mutant may be used to induce mono-folliculogenesis for OI, or paucifolliculogenesis (up to about three follicles) for IUI, for *in vivo* fertilization. Mono-folliculogenesis can also be attained with a reduced dose of the FSH mutant, or less frequent dosing as compared with conventional FSH preparations. For example, in OI an FSH preparation of the invention may be administered at 225-400 IU every three days, or lower doses, depending on the patient response. Patient response may be followed by sonography.

[0049] The FSH mutant of the invention may be used in a controlled ovarian hyperstimulation (COH) regimen. Standard regimens for COH include a down-regulation phase in which endogenous luteinising hormone (LH) is down-regulated by administration of a gonadotrophin releasing hormone (GnRH) agonist followed by a stimulatory phase in

20

which follicular development (folliculogenesis) is induced by daily administration of follicle stimulating hormone (FSH), usually at about 150-225 IU/day. Alternatively stimulation may be started with FSH after spontaneous or induced menstruation, followed by administration of a GnRH-antagonist (typically starting around day six of the stimulatory phase). When there are at least 3 follicles >16 mm (one of 18 mm), a single bolus of hCG (5-10,000 IU) may be given to mimic the natural LH surge and induce ovulation. Oocyte recovery may be timed for 36-38 hours after the hCG injection.

[0050] The FSH mutant may also be used for OI and IUI. For example, FSH stimulation may be started after spontaneous or induced menstruation, at a daily dose of 75-150 IU. When 1 or 3 follicles have reached a diameter of at least 16 mm, a single bolus of hCG may be administered to induce ovulation. Insemination may be performed *in vivo*, by regular intercourse or IUI.

[0051] Because the FSH mutant may have an increased half-life with respect to wild type FSH preparations, regimens such as that described above may employ lower IU doses of FSH, and/or may be modified by decreasing the FSH stimulation period, while achieving the same or better response, in terms of number and viability of follicles. For example, adequate folliculogenesis may be achieved with daily doses of at or about 50-150, 50-100 or 50-75 IU FSH. Dosing of FSH may be on a daily or semi-daily basis. The dosing period may be less than or about 14, 12, 11 or 10 days. For OI, the FSH mutant preparation may be administered at doses from 25-150 or 50-125 IU FSH/day. For the treatment of male infertility, an FSH mutant preparation may be administered at 3 X 150 to 300 IU/week until spermatogenesis reaches levels adequate for insemination, either through regular intercourse or ART techniques.

[0052] Because of the longer half-life of the mutant FSH, it may be administered as a long-acting preparation, which may be administered less frequently than every two days. Conventional FSH may be administered at or about 300 IU on every second day, while achieving similar results to administration every day at or about 150 IU. The mutant FSH may be administered every 3, 4, 5, 6 or 7 days, while achieving similar or better results than daily administration of conventional FSH.

[0053] The FSH mutant may be used for the manufacture of a medicament for treatment of diseases, disorders or conditions. In another aspect, the polypeptide or the pharmaceutical composition according to the invention is used in a method of treating a mammal, in particular a human, comprising administering to the mammal in need thereof such polypeptide or pharmaceutical composition.

[0054] It will be apparent to those of skill in the art that an effective amount of a polypeptide, preparation or composition depends, *inter alia*, upon the disease, the dose, the administration schedule, whether the polypeptide or preparation or composition is administered alone or in conjunction with other therapeutic agents, the serum half-life of the compositions, and the general health of the patient. Typically, an effective dose of the preparation or composition is sufficient to ensure a therapeutic effect.

[0055] The FSH mutant may be administered in a composition including one or more pharmaceutically acceptable carriers or excipients. "Pharmaceutically acceptable" means a carrier or excipient that does not cause any untoward effects in patients to whom it is administered. Such pharmaceutically acceptable carriers and excipients are well known in the art, and the polypeptide may be formulated into pharmaceutical compositions by well-known methods (see *e.g.* Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990); Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis (2000); and Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)). Pharmaceutically acceptable excipients that may be used in compositions comprising the polypeptide include, for example, buffering agents, stabilizing agents, preservatives, isotonicifiers, nonionic surfactants or detergents "wetting agents"), antioxidants, bulking agents or fillers, chelating agents and cosolvents.

[0056] The pharmaceutical composition comprising the FSH mutant may be formulated in a variety of forms, including liquids, *e.g.* ready-to-use solutions or suspensions, gels, lyophilized, or any other suitable form, *e.g.* powder or crystals suitable for preparing a solution. The form of the composition may depend upon the particular indication being treated and will be apparent to one of skill in the art.

[0057] The pharmaceutical composition comprising the FSH mutant may be administered intravenously, intramuscularly, intraperitoneally, intradermally, subcutaneously, sublingually, buccally, intranasally, transdermally, by inhalation, or in any other acceptable manner, *e.g.* using PowderJect or ProLease technology or a pen injection system. The mode of administration may depend upon the particular indication being treated and will be apparent to one of skill in the art. The composition may be administered subcutaneously, which may allow the patient to conduct self-administration.

[0058] The pharmaceutical compositions may be administered in conjunction with other therapeutic agents. These agents may be incorporated as part of the same pharmaceutical composition or may be administered separately from the polypeptides, either concurrently or

22

in accordance with any other acceptable treatment schedule. In addition, the polypeptide, preparation or pharmaceutical composition may be used as an adjunct to other therapies.

[0059] The present invention has multiple aspects, illustrated by the following non-limiting examples.

Example 1
FSH Mutants

[0060] The 3D crystal structure of human FSH was used to identify regions in the FSH molecule where a candidate glycosylation site may be inserted. Two FSH molecules (four subunits) are present in each asymmetric unit of the crystal structure. The two FSH molecules were superimposed and compared, with each residue being visually inspected to identify potential sites where an N-glycosylation site may be inserted that would not disrupt the proper folding of the FSH polypeptide or reduce FSH activity. The crystallographic structure of FSH was combined with the knowledge of the FSH/FSHR receptor interaction to further aid in the selection of potential N-glycosylation sites. The principal design criteria were minimal disruption of 3D structure, minimal disruption of predicted binding and activation sites, and predictable 3D structure compatible with glycosylation. Based on the above criteria, the following two insertion mutants of the α -subunit of FSH were prepared:

#	Mutations	SEQ ID NO
1	GNFT insert	4
2	GNRT insert	5

Example 2
Morphological Analysis of FSH Mutants

[0061] Aliquots of concentrated culture supernatants from transient expression of FSH α -subunit mutants 1-2 were analyzed by SDS-PAGE under non-reducing conditions that permits the resolution of intact FSH heterodimers from free α - and β -subunits. By comparing the apparent molecular weights of each mutant heterodimer to that of wild-type FSH, one is able to determine whether the mutant FSH is hyperglycosylated relative to wild-type FSH. Briefly, after electrophoresis, proteins were electrophoretically transferred to PVDF and visualized using Serono antibody 9-14 directed against the α -subunit of FSH. As a control,

23

wild-type human FSH, mutant GM1, FSH-CTP and Gonal F were also analyzed. Table 1 shows the apparent molecular weight of the heterodimer formed by the α -subunit mutants and wild-type β -subunit as calculated based on molecular weight standards.

Table 1

Sample	M _r (kDa)	Fold Conc.
FSH-CTP	45.244	
Gonal F	38.482	37x
GNFT insert	49.375	36x
GNRT insert	49.172	35x
GM1	46.202	40x
wt FSH	45.083	36x

[0062] As shown in Table I, each of the two expressed FSH mutants, i.e. GNFT and GNRT inserts, showed increased glycosylation as evidenced by a shift of the distribution of the apparent molecular weight of the heterodimer compared to wild-type human FSH.

Example 3

In Vitro Function of FSH Mutants

[0063] In order to determine the activity of the FSH mutants, each mutant was tested for the ability to stimulate cAMP production in a CHO cells line that recombinantly expresses the human FSH receptor. CHO-FSHR cells were maintained in FSHR Growth media [MEM α (-) (Gibco, cat#12561-056) + 10% dialyzed FBS (Gibco, cat#26300-020) + 600 μ g/ml Geneticin (Gibco, cat#10131-035) + 0.02 μ M MTX]. CHO-FSHR cells were seeded at 2×10^4 cells/well in 100 μ l/well (2×10^6 cells/10ml = 1 plate) and incubated at 37°C for 24 hours prior to assay. Cells were used for assay if at least 70% confluent.

[0064] A 12-point serial 1:3 dilution was made starting at 67.5 nM for all samples and internal standard (Gonal F was used as an internal standard). All dilutions were made in assay media [DMEM/F12 (phenol free, Gibco, cat #11039-021) + 1mg/ml BSA (Sigma, A-6003) + 0.1 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthone phosphodiesterase inhibitor, Sigma, cat#I-7018)]. Growth media was removed from the assay plate, 25 μ l assay media (supplied with MA6000 cAMP MSD kit- Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) added, the plates recovered and incubated at 37°C for 15 minutes. Wells were then dosed with 25 μ l/well of the test sample, mixed, the plates recovered and incubated for 1 hour at 37°C. After the 1 hour incubation, the sample and media was removed from the wells. 25 μ l of standard lysis buffer (supplied with MA 6000 Meso Scale Discovery kit) was then added to each well, the

24

plates covered with plate sealer (Packard, cat#6005185) and shaken for 5 minutes. After the 5-minute lysis incubation, 25 µl of lysed cell material was transferred to the cAMP Meso Scale Discovery plate (supplied with MA6000 MSD kit) and incubated with gentle mixing at room temperature for 30 minutes. 25 µl of cAMP-AP conjugate was added to each well and mixed. 25 µl of anti-cAMP antibody was then added to each well, the plates covered with plate sealer and shaken for 30 minutes at room temperature. The plates were then washed six times with 350 µl/well of wash buffer on an automated plate washer. 100 µl of Sapphire II RTU (Ready-To-Use) substrate enhancer was then added to each well, the plates covered with plate sealer and incubate 30 minutes in the dark at 25°C. The plates were then read at one second per well with low levels of cAMP showing a high signal and high levels of cAMP showing a low signal. The dose-response curves of the FSH mutants are shown in Figure 2. EC₅₀ values were calculated and shown in Table 2.

[0065] As shown in Figure 2 and Table 2, each of the FSH mutants has *in vitro* activity comparable to that of wild-type FSH.

Table 2

Sample	EC ₅₀ M
FSH wild type	2.16E-10
Clone 10C- α GNRT/β GM1	2.58E-10
Clone 11C- α GNFT/β GM1	2.78E-10

25

Example 4

In vivo half-life of FSH mutants

Two different lots of GNFT mutant and GNRT mutant, were analyzed in separate pharmacokinetic (PK) studies. The two studies were of the same design: 33 immature female SD rats 21-days-old (approx. 40 g body weight; Charles River Laboratories, Wilmington, MA) were randomly divided into 5 treatment groups (n=6) and 1 baseline group (n=3). The choice of immature female rats was based on the use of this age and sex for in vivo biological assessments of FSH activity. Animals in the treatment groups received subcutaneous (s.c.) injections of 4 ug of GM1 (control), GNFT mutant, GNRT mutant or 8 ug of Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (control). Blood was collected from the retro-orbital sinus at 0 hr from the baseline group and at 1, 2, 4, 6, 10, 24, 48 and 72 hr from animals in the treatment groups (n=3/timepoint; rats were alternated so as not to be bled in 2 subsequent sampling points). Approximately 0.1 ml of blood was collected from each rat at each bleed, and plasma was harvested and stored at -80°C until analyzed by ELISA. The assay used for measuring FSH proteins in serum from both studies was the DSL FSH Coated Well ELISA (Diagnostics Systems Laboratories, Webster, TX). Serum samples were each analyzed in triplicate.

The half-life of the GNFT mutant and GNRT mutant is approximately 17 hours whereas that of GM1 and Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) controls is approximately 12 hr and 8 hr, respectively. This indicates that the GNFT mutant and GNRT mutants have a longer half-life than wild type FSH.

Example 5

In vivo Biological Activity

The in vivo model used to assess the biological activity of the GNRT and GNFT mutants is the rat ovarian weight gain assay. Treatment of immature 21 day old female rats with FSH or molecules with FSH-like activity, e.g. GNRT and GNFT mutants, triggers the growth of ovarian follicles and production of oocytes. This growth is easily detected by measurement of ovarian weight at the end of the treatment period. In the model, the substance to be tested is given by injection for three days and the ovaries are collected and weighed after the last dose. This assay was used for several decades as the basis for

assigning FSH potency to clinical products for label purposes. It measures the relevant physiological action of FSH and has a clear correlation to performance of products in the clinic.

The *in vivo* activity of the GNRT and GNFT mutants was compared to that of wild-type FSH. All doses were defined based on predicted equivalence of FSH, taking into account the *in vitro* potency and the half-life in rats. The GNRT and GNFT mutants were found to possess potent FSH activity with a magnitude similar to that of wild-type FSH.

27

CLAIMS

1. A nucleic acid encoding a mutant α -subunit of FSH wherein the α -subunit comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 4-5.
2. A vector comprising the nucleic acid of claim 1.
3. The vector of claim 1 wherein the vector is an expression vector.
4. The vector of claim 1 wherein the vector further comprises a nucleic acid encoding the sequence of SEQ ID NO:3.
5. A host cell comprising the vector of claim 1.
6. The host cell of claim 1 wherein the cell is a mammalian cell.
7. A mutant FSH, wherein the β -subunit comprises the sequence of ID NO:3, and wherein the α -subunit comprises a sequence encoded by the nucleic acid of claim 1.
8. The mutant FSH of claim 1 wherein any one of from 0 to 6 asparagine residues are glycosylated.
9. The mutant FSH of claim 7 ID NO: 4 and wherein N5 is glycosylated.
10. The mutant FSH of claim 7 wherein the α -subunit comprises the sequence of SEQ ID NO:5 and wherein N5 is glycosylated.
11. A method of producing an FHS mutant comprising:
 - (a) providing a cell comprising the nucleic acid of claim 1 and a second nucleic acid encoding SEQ ID NO:3;
 - (b) culturing the cell under conditions that allow expression of the first and second nucleic acids.
12. The method of claim 1 wherein the cell is capable of glycosylating protein.
13. The method of claim 11 wherein the cell comprises a single vector which comprises the nucleic acid of claim 1 and a nucleic acid encoding SEQ ID NO:3.
14. The method of claim 11 wherein the cell comprises a vector comprising the nucleic acid of claim 1 and further comprising a second vector comprising a nucleic acid encoding SEQ ID NO:3.
15. A pharmaceutical composition comprising the mutant FSH of claim 1 and optionally a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.
16. A method of treating an infertile mammal, comprising administering to a mammal in need thereof the pharmaceutical composition of claim 15.
17. A method of stimulating folliculogenesis in a mammal, comprising administering to a mammal in need thereof the pharmaceutical composition of claim 15.

28

WO 2008/010840

PCT/US2006/048898

18. A method of inducing ovarian hyperstimulation in a mammal, comprising administering to a mammal in need thereof the pharmaceutical composition of claim 15.

29

FIGURE 1

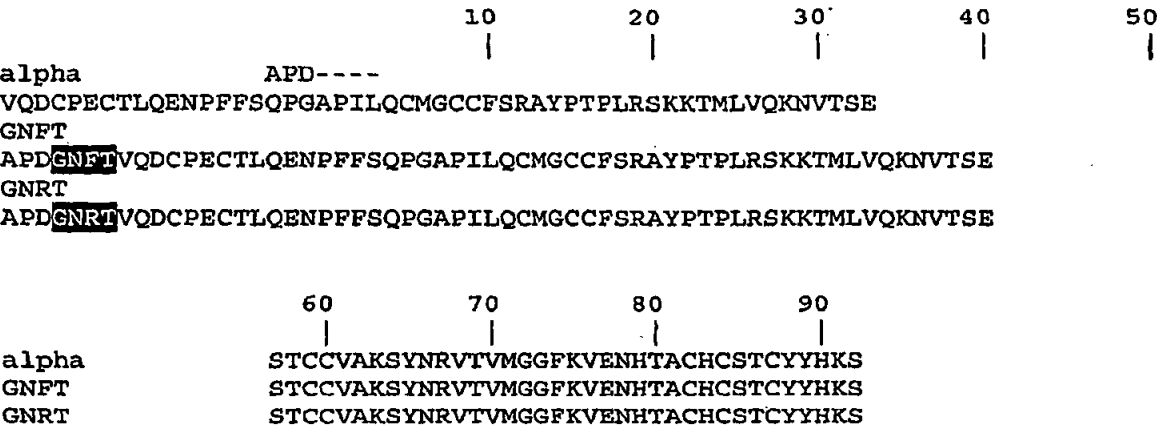
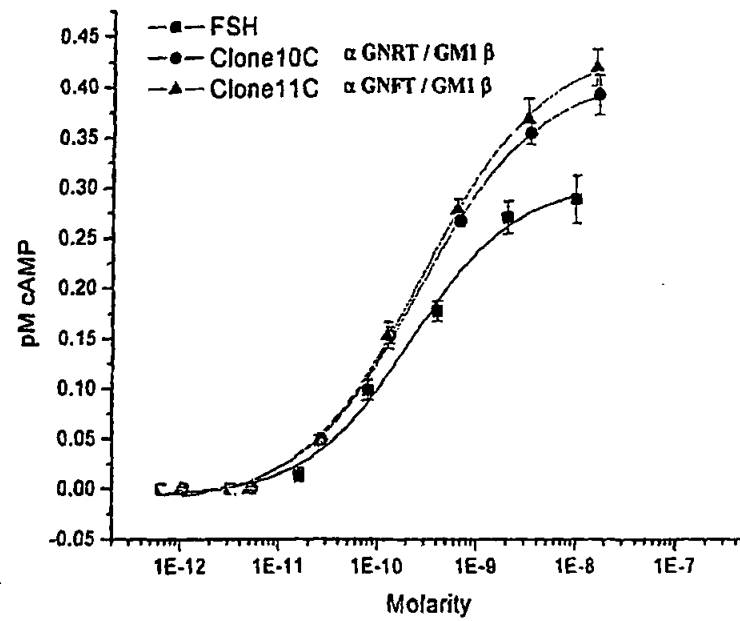


Figure 2



FSH:EC50	2.16E-10
Clone10C:EC50	2.58E-10
Clone11C:EC50	2.78E-10

31

1115 WO seq list.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.

<120> FSH Mutants

<130> 1115 WO

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 92

<212> PRT

<213> Homs sapiens

<400> 1

Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro
1 5 10 15

Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys
20 25 30

Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu
35 40 45

Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser
50 55 60

Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr
65 70 75 80

Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
85 90

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu
1 5 10 15

Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys
20 25 30

Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln
35 40 45

Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro
50 55 60

Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr
65 70 75 80

1115 WO seq list.txt

Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val
85 90 95

Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu
100 105 110

<210> 3
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> beta subunit mutant E55N/V57T

<400> 3

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu
1 5 10 15

Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys
20 25 30

Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln
35 40 45

Lys Thr Cys Thr Phe Lys Asn Leu Thr Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro
50 55 60

Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr
65 70 75 80

Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val
85 90 95

Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu
100 105 110

<210> 4
<211> 96
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> alpha subunit insertion mutant GNFT

<400> 4

Ala Pro Asp Gly Asn Phe Thr Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu
1 5 10 15

Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys
20 25 30

Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys
35 40 45

33

1115 WO seq list.txt

Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys
50 55 60

Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val
65 70 75 80

Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
85 90 95

<210> 5
<211> 96
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> alpha subunit insertion mutant GNRT

<400> 5

Ala Pro Asp Gly Asn Arg Thr Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu
1 5 10 15

Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys
20 25 30

Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys
35 40 45

Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys
50 55 60

Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val
65 70 75 80

Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
85 90 95

1

34

MUTANTES DE FSH

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Ámbito de la invención

La presente invención se refiere a la reproducción humana. Más específicamente, la presente invención se refiere a terapias de fertilización.

Descripción de la técnica relacionada

Gonadotropinas

La hormona de estimulación de folículos (FSH) es un miembro de la familia de las gonadotropinas que desempeñan funciones claves en la fertilidad humana. Las gonadotropinas, que también incluyen hormona luteinizante (LH) y gonadotrofina coriónica (CG), son heterodímeros, en donde cada uno consiste de una subunidad-alfa común (92 aminoácidos) y una subunidad-beta única (111 aminoácidos en FSH). Las secuencias de aminoácidos de las formas maduras de subunidades alfa y beta de FSH se muestran en SEC ID NO:1 y SEC ID NO:2, respectivamente.

La FSH humana ha sido aislada de las glándulas pituitarias y de la orina posmenopáusica (EP 322.438) y se ha producido en forma recombinante en células de mamíferos (US 5.639.640; US 5.156.957; US 4.923.805; US 4.840.896; US 5.767.251; EP 211.894 y EP 521.586). Estas últimas referencias también revelan el gen de subunidad B de FSH. En US 5.405.945 se revela un gen de subunidad-alfa humano modificado que comprende solamente un intron.

Liu y otros, *J Biol Chem* 1993,15; 268 (2): 21613-7, Grossman y otros, *Mol Endocrinol* 1996 10 (6): 769-79, Roth y Dias (*Mol C Endocrinol* 1995 1; 109 (2): 143-9, Valove y otros, *Endocrinol* 1994; 135 (6): 2657-61, Yoo y otros, *JBiol Chem* 1993 25; (18): 13034-42), US 5.508.261 y Chappel y otros, 1998, *Hu Reproduction*, 13 (3): 1835 revelan varios estudios de relación estructura-función e identifican residuos aminoácidos que participan en la unión y activación de receptor y en dimerización de FSH.

Uso de Gonadotropinas en terapias reproductivas asistidas

Las gonadotropinas desempeñan funciones cruciales en el ciclo reproductivo, y el uso de las mismas en terapias exógenas es esencial para las técnicas de reproducción asistida (TRA), como fertilización *in vitro* (FIV), FIV en forma conjunta inyección de espermatozoides intracitoplásmico (FIV/ICSI) transferencia de embriones (TE), así como la inducción de ovulación (IO) en pacientes anovulatorias que se someten a fertilización *in vivo* ya sea naturalmente o a través de inseminación intrauterina (IUI).

US 4.589.402 y US 4.845.077 revelan FSH humana purificada que es libre de LH y el uso de la misma para fertilización *in vitro*. EP 322 438 revela una proteína con por lo menos 6200 unidades de actividad de FSH que es sustancialmente libre de actividad de LH, y en donde la subunidad-alfa y subunidad-beta de la

respectivamente, pueden ser tipo natural o formas truncadas especificadas de las mismas.

La terapia prolongada es necesaria para obtener un efecto terapéutica, generalmente durante 8-10 días consecutivos y algunas veces hasta 21 días para estimular la foliculogénesis en mujeres, y durante hasta 18 meses en masculinos hipogonadotróficos para inducir espermatogénesis. La hFSH recombinante es generalmente administrada como una inyección i.m. o s.c. diaria, con la consecuente incomodidad y con la posibilidad de una potencial reacción en el sitio de inyección local. La reducción de la frecuencia de administración facilitaría la terapia y haría a la de gonadotrofina más conveniente, más tolerable y agradable a la paciente.

Glicosilación de FSH

Las gonadotropinas son glicoproteínas, en donde cada subunidad posee cadenas secundarias de oligosacáridos (unidas en N) de unión con asparagina que son importantes para la actividad y función *in vivo*. La adición de carbohidratos (glicosilación) a polipéptidos es un episodio post-traducciona que produce la adición de cadenas de azúcar a aminoácidos (unidos en O) serina/treonina o de asparagina (unidos en N) específicos. En contraste con la secuencia de aminoácidos invariable de la porción de proteínas de las glicoproteínas, las estructuras de carbohidratos son variables, una característica referida como microheterogenicidad. Por ejemplo, los sitios de N-glicosilación

en la misma proteína pueden contener estructuras carbohidratos diferentes. Además, aún en el mismo sitio glicosilación en una glicoproteína dada, pueden encontrarse diferentes estructuras de carbohidratos. Esta heterogeneidad es una consecuencia de la síntesis dirigida de un patrón de carbohidratos.

La N-glicosilación de proteínas se produce específicamente en un patrón de consenso Asn-Xaa-Ser/Thr, y en una menor medida en un patrón de consenso Asn-Xaa-Cys, en donde Xaa puede ser cualquier residuo de aminoácidos. Sin embargo, la presencia de un tripéptido de consenso no es suficiente para asegurar que un residuo de asparagina será glicosilado. Por ejemplo, la glicosilación de la secuencia Asn-Pro-Ser/Thr se produce a una velocidad 50-veces más baja que otros patrones de consenso Asn-Xaa-Ser/Thr.

La FSH humana contiene cuatro sitios de glicosilación de unión: dos en la subunidad-alfa común en las posiciones 52 y 72 y dos en la subunidad-beta en las posiciones 7 y 24. Los carbohidratos finados a la subunidad-alfa de FSH son críticos para el ensamble, integridad, secreción y transducción de señales de dímeros, mientras que los carbohidratos de subunidad-beta son importantes para el ensamble, secreción y depuración del heterodímero de la circulación.

Galway y otros, *Endocrinology* 1990; 127 (1) : 93-100 demuestran que las variantes de FSH producidas en la línea de células

transferasa-I de N-acetilglucosamina o un línea de células CHO defectuosa en cuanto a transporte de ácido siálico son tan activas como FSH secretada por células tipo naturales o FSH pituitaria purificada *in vitro*, pero carecieron de actividad *in vivo*, presumiblemente debido a la rápida depuración de las variantes glicosiladas inadecuadamente en suero. D'Antonio y otros, *Human Reprod* 1999; 14 (5): 1160-7 describen varias isoformas de FSH que circulan en la corriente sanguínea. Las isoformas poseen secuencias de aminoácidos idénticas, pero difieren en su extensión de modificación post-traducciona. Se encontró que el grupo de isoformas menos ácido tuvo una depuración *in vivo* más rápida según se compara con el grupo de isoformas ácido, posiblemente debido a diferencias en el contenido de ácido siálico entre las isoformas. Además, Bishop y otros, en *Endocrinology* 1995; 136 (6): 2635-40 concluyen que la vida media circulatoria parece ser el determinante primario de la actividad *in vivo*. Estas observaciones llevaron a la hipótesis de que la vida media de FSH podría aumentarse mediante la introducción de sitios de glicosilación adicionales para aumentar el contenido de ácido siálico en el polipéptido.

Variantes de FSH

Los agonistas de FSH con mayores vidas medias se han desarrollado mediante la fusión de péptido carboxiterminal de hCG (CTP) con FSH humana recombinante natural (rhFSH). La porción de CTP consisten en aminoácidos 112-118 a 145 con cuatro

sitios de glicosilación de unión-O ubicados en las posiciones 121, 127, 132 y 138. US 5.338.835 y US 5.585.345 revelan una subunidad-beta de FSH modificada extendida en Glu de terminal C con la porción CTP de hCG. El análogo modificado resultante se establece como poseedor de una actividad biológica de FSH natural o nativa, pero una vida medio circulante prolongada. US 5.405.945 revela que la porción Terminal carboxi de la subunidad-beta de hCG o una variante de la misma posee efectos significativos sobre la depuración de CG, FSH, y LH.

US 5.883.073 revela proteínas de cadena simple que comprenden dos subunidades-alfa con actividad agonista o antagonista para CG, TSH, LH y FSH. US 5.508.261 revela polipéptidos heterodiméricos con afinidad de unión con los receptores de LH y FSH que comprenden una subunidad-alfa de hormona de glicoproteína y un polipéptido de subunidad beta de ocurrencia no natural, en donde el polipéptido de subunidad-beta es una cadena de aminoácidos que comprende cuatro subsecuencias unidas, en donde cada una es seleccionada entre una lista de secuencias específicas.. Klein y otros (2003) revelan un análogo de cadena simple de FSH con una vida media aumentada, en donde las subunidades alfa y beta se unen por un oligopéptido que contiene dos sitios de glicosilación unidos con N.

WO 01/58493 revela 77 mutaciones que pueden hacerse en la subunidad alfa de FSH y 51 mutaciones que pueden hacerse en la subunidad-beta de FSH en un intento por mejorar la vida media in

vivo de FSH. Además, WO 01/58493 revela que uno o más sitios de glicosilación pueden agregarse al término N de FSH para mejorar su vida media o insertarse en varios sitios dentro del polipéptido de FSH. WO 01/58493, mientras describe que los sitios de glicosilación pueden insertarse en el polipéptido de FSH, no provee directivas sobre los sitios específicos en donde se podría insertar un sitio de glicosilación y mantener la actividad de FSH. WO 01/58493 revela además que las subunidades alfa y beta mutantes pueden utilizarse individualmente (1 sitio de glicosilación adicional) o en combinación (2 sitios de glicosilación adicionales). Los 128 mutantes candidatos se identificaron utilizando 50 modelos de la estructura 3D de FSH que se generaron en base solamente a la estructura de hCG y una alineación de secuencia de FSH y hCG a pesar de sólo el 32% de identidad entre las subunidades-beta de hCG y FSH. WO 01/58493 no revela la producción o ensayo de cualquiera de las subunidades alfa o beta de FSH en donde un sitio de glicosilación se introdujo por mutagenesis dirigida al sitio.

WO 05/020934 revela GM1, con mutaciones en las subunidades alfa y beta de FSH, incluyendo una doble mutación en β E55N/V57T, es decir, el residuo E en la posición de aminoácidos 55 mutada con N y el residuo V en la posición de aminoácidos 57 mutada en T. La secuencia de aminoácidos de β E55N/V57T se muestra en SEC ID NO:3.

Existe la necesidad clínica de un producto que provee parte o la totalidad de los efectos terapéuticamente relevantes de FSH, y que pueden administrarse a intervalos menos frecuentes según se compara con los productos de FSH actualmente disponibles, y que preferentemente provee un nivel más estable de actividad FSH circulante según se comprara con la obtenible por el tratamiento actual..

La presente invención se refiere a dichos productos así como a los medios para realizar dichos productos.

RESUMEN

La presente invención se refiere a moléculas de FSH mutantes, en donde la subunidad alfa de FSH comprende una secuencia seleccionada entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5 y en donde la subunidad-beta de FSH comprende SEC ID NO: 3. La FSH puede ser N-glicosilada en 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de asparagina de dicha FSH mutante. En una realización N5 de la subunidad-alfa mutante de SEC ID NO:4 puede glicosilarse. En otra realización N5 de la subunidad-alfa mutante de SEC ID NO:5 puede glicosilarse. En una realización, N5 de la subunidad-beta mutante de SEC ID NO:3 puede glicosilarse.

La presente invención también se refiere a moléculas de ADN aisladas que codifican mutantes de subunidad-alfa de FSH seleccionados entre grupos formados por SEC ID NOS:4-5. La presente invención también se refiere a un ADN aislado que

codifica una subunidad-beta de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO:3.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad-alfa de FSH seleccionado entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5. El vector puede ser un vector de expresión.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad-beta de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO:3.. El vector puede ser un vector de expresión.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende un primer ADN y un segundo ADN, en donde el primer ADN codifica un mutante de subunidad-alfa de FSH seleccionado entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5 y en donde el segundo ADN codifica un mutante de subunidad-beta de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO:3. El vector puede ser un vector de expresión..

La presente invención también se refiere a una célula que comprende un vector que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad-alfa de FSH seleccionado entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5. El vector puede ser un vector de expresión. La célula puede ser una célula de mamíferos, por ejemplo una célula de CHO.

La presente invención también se refiere a una célula que comprende un vector que comprende ADN que codifica un mutante

de subunidad-beta de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO:3. El vector puede ser un vector de expresión. La célula puede ser una célula de mamíferos, por ejemplo, una célula CHO.

La presente invención también se refiere a una célula que comprende un vector que comprende un primer ADN y un segundo ADN, en donde el primer ADN codifica un mutante de subunidad-alfa de FSH seleccionado entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5 y en donde el segundo ADN codifica un mutante de subunidad-beta de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO:3. El vector puede ser un vector de expresión. La célula puede ser una célula de mamíferos, por ejemplo, una célula CHO.

La presente invención también se refiere a una célula que comprende un primer y un segundo vector, en donde el primer vector comprende un ADN que codifica un mutante de subunidad-alfa seleccionado entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5 y el segundo vector comprende un ADN que codifica un mutante de subunidad-beta de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO:3. El vector o los vectores pueden ser vectores de expresión. La célula puede ser una célula de mamíferos, por ejemplo, una célula CHO.

La presente invención también se refiere a un método para producir un mutante de FSH que comprende cultivar células de mamíferos capaces de glicosilar proteínas, en donde dichas células comprenden un primer vector de expresión que comprende un ADN que codifica un mutante de subunidad-alfa de FSH

seleccionado entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5 y un segundo vector de expresión que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad-beta de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO:3. En otra realización de la presente invención dichas células comprende un vector simple que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad-alfa de FSH seleccionado entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5 y que además comprende ADN que codifica un mutante de subunidad-beta de FSH que comprende la secuencia de SEC ID NO:3.

La presente invención también se refiere a una composición que comprende un mutante de FSH y un portador o excipiente farmacéutica mente aceptable del mismo, en donde la subunidad-alfa de FSH comprende una secuencia seleccionada entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5 y en donde la subunidad-beta de FSH comprende SEC ID NO:3.

La presente invención también se refiere a un método para tratar un mamífero infértil, que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad efectiva de un mutante de FSH, en donde la subunidad-alfa de FSH comprende una secuencia seleccionada entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5 y en donde la subunidad-beta de FSH comprende SEC ID NO:3.

La presente invención también se refiere a un método para estimular la foliculogenesis en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad efectiva de una FSH mutante, , en donde la subunidad-alfa de FSH

comprende una secuencia seleccionada entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5 y en donde la subunidad-beta de FSH comprende SEC ID NO:3.

La presente invención también se refiere a un método para inducir hiperestimulación ovárica en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad efectiva de una FSH mutante, en donde la subunidad-alfa de FSH comprende una secuencia seleccionada entre el grupo formado por SEC ID NOS:4-5 y en donde la subunidad-beta de FSH comprende SEC ID NO:3.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una alineación de los mutantes de subunidad-alfa GNFT (SEC ID NO: 4), y GNRT (SEC ID NO:5) con la subunidad-alfa humana de FSH (SEC ID NO: 1). Los números de residuos se refieren a la subunidad-alfa humana de FSH (SEC ID NO: 1) en donde 1 es el primer aminoácido de polipéptido maduro.

La Figura 2 muestra una curva de respuesta-dosis para las subunidades-alfa de FSh mutante comparada con FSH tipo salvaje o natural Clon 10c- α GNRT/GM1 β . Clon 11c- α GNFT/ GM1 β .

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Mientras se ha demostrado que el aumento del contenido de carbohidratos de FSH puede llevar a una mayor vida media in vivo, el mejoramiento de la vida media de FSH es más complicado que la simple adición de sitios de glicosilación adicionales.

Mientras que la secuencia de consenso de glicosilación es necesaria para la adición de carbohidratos, no es suficiente para asegurar que un sitio de adición de carbohidratos será utilizado. Otros factores, tal como el plegado y conformación de proteína local durante la biosíntesis, determinan si un oligosacárido se fija en un sitio de secuencia de consenso dado. Además, a fin de que la glicosilación adicional lleve a un aumento en la vida media *in vivo*, la secuencia de consenso debe estar en una posición tal que la glicosilación del sitio no interfiera con la unión del receptor, o comprometa el plegado, conformación o estabilidad de la glicoproteína. En este punto, los análogos de FSH con mayores vidas medias se han limitado principalmente a las proteínas de fusión en donde la porción fusionada del polipéptido incluía sitios de glicosilación adicionales.

FSH Mutante

Se provee una FSH mutante que se ha modificado para crear sitios de reconocimiento de glicosilación adicionales. La subunidad-alfa del mutante de FSH puede tener una de las siguientes mutaciones, comparado con la subunidad-alfa de tipo natural: una inserción de la secuencia de aminoácidos GNFT entre residuos de aminoácidos 3 y 4 de la subunidad-alfa de tipo salvaje o una inserción de la secuencia de aminoácidos GNRT entre residuos de aminoácidos 3 y 4 de la subunidad-alfa de tipo salvaje o natural. Una FSH mutante puede comprender cualquiera de las

subunidades-alfa mutantes anteriores en combinación con la subunidad-beta mutante, por ejemplo β GM1 que contiene la siguiente mutación: E55N/V57T. uno o más de los sitios de glicosilación adicionales de FSH recombinante pueden ser glicosilados uno o más sitios de glicosilación adicionales de FSH mutante pueden ser glicosilados *in vitro* o *in vivo*. Tal como se utiliza en la presente, el término "mutante GNFT " se refiere a una FSH mutante que comprende una subunidad-alfa según se establece en SEC ID NO:4 y una subunidad-beta según se establece en SEC ID NO:3. Tal como se utiliza en la presente, el término "mutante GNRT" se refiere a una FSH mutante que comprende una subunidad-alfa según se establece en SEC ID NO:3 y una subunidad-beta según se establece en SEC ID NO:3

El mutante de FSH puede producirse mediante cualquier método adecuado que se conozca en el arte. Estos métodos incluyen la construcción de secuencias de nucleótidos que codifican los respectivos mutantes de FSH y que expresan la secuencia de aminoácidos en un huésped transfectado adecuado. El mutante de FSH puede también producirse mediante síntesis química o por una combinación de síntesis química y tecnología de ADN recombinante.

El mutante de FSH puede comprender las subunidades alfa y beta de FSH en la forma de dos cadenas de polipéptidos separadas, en donde las dos cadenas se dimerizan *in vivo* de manera de formar un polipéptido dimérico, o puede comprender un constructo de cadena

simple que comprende las dos subunidades unidas en forma covalente por un enlace de péptido o una unión o enlazador péptido. Los residuos de aminoácidos del péptido de enlace pueden exhibir propiedades que no interfieren significativamente con la actividad del mutante de FSH.

El mutante de FSH puede tener una vida media mayor comparada con la FSH de tipo salvaje. El mutante de FSH puede también tener una estabilidad mayor comparada con la FSH de tipo natural. El mutante de FSH puede comprender oligosacáridos en 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sitios de glicosilación de unión-N. También se provee una población de mutantes de FSH, que puede comprender uno o más isoformas de mutantes FSH, en donde cada isoforma comprende oligosacáridos en 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de los sitios de glicosilación de unión-N.

La secuencia de nucleótidos que codifica las subunidades alfa o beta del mutante de FSH puede construirse aislando o sintetizando una secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad FSH madre, tal como la hFSH-alfa o hFSH-beta con las secuencias de aminoácidos que se muestra en SEC ID NOS: 1 y 2, respectivamente. La secuencia de nucleótidos puede luego cambiarse de modo de efectuar la sustitución o reinserción de los residuos de aminoácidos relevantes. La secuencia de nucleótidos puede modificarse mediante mutagenesis dirigida al sitio. En la alternativa, la secuencia de nucleótidos puede prepararse por síntesis química, en donde los ologonucleótidos

son diseñados en base a la secuencia de aminoácidos específica del mutante de FSH.

La secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido puede insertarse en un vector recombinante y unirse en forma operable a una secuencia de control necesaria para expresión del polipéptido en la célula huésped transfectada deseada. Las secuencias de control pueden ser cualquier componente que sea necesario o ventajoso para la expresión de un polipéptido. Los ejemplos de secuencias de control adecuadas para dirigir transcripción en células de mamíferos incluyen los promotores tempranos o tardíos de SV40 y adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío mayor 2 de adenovirus, el promotor MT-1 (gen de metalotioneína) y el promotor de gen inmediato-temprano de citomegalovirus humano (CMV).

Un experto en el arte puede realizar una selección entre estos vectores, secuencias de control de expresión y huéspedes sin experimentación indebida. El vector recombinante puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, ese integrado en el genoma de célula huésped y replicado junto con el cromosoma en donde se ha integrado.

El vector puede ser un vector de expresión en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención está operativamente unido a segmentos adicionales requeridos para transcripción de una secuencia de nucleótidos. El vector puede derivar de plásmido o ADN viral. Un número de vectores de expresión adecuados para expresión en las células huésped que se mencionan en la presente se encuentran comercialmente disponibles o se describen en la bibliografía.

El vector recombinante puede además comprender una secuencia de ADN que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Un ejemplo de dicha secuencia, (cuando la célula huésped es una célula de mamíferos) es el origen SV40 de replicación. El vector puede también comprender un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped, tal como el gen que codifica reductasa de dihidrofolato (DHFR) o uno que confiere resistencia a una droga, por ej., ampicilina, camamicina, tetraciclina cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

El vector puede también comprender un gen amplificable, tal como *DHFR*, de modo que las células que poseen múltiples copias del gen amplificable y secuencias de flaqueo, incluyendo el ADN de FSh mutante, pueden seleccionarse en medios adecuados.

También se provee un ADN que codifica una subunidad-alfa del mutante FSH. La secuencia de nucleótidos que codifica las subunidades alfa y beta del mutante FSH, ya sea preparada por

mutagenesis dirigida al sitio, síntesis, PCR u otros métodos, puede opcionalmente también incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de señal. El péptido de señal puede estar presente cuando el polipéptido debe ser secretado a partir de las células en donde el mismo es expresado. Dicho péptido de señal, si estuviera presente, puede ser uno reconocido por la célula seleccionada para expresión del polipéptido. El péptido de señal puede ser homólogo (por ejemplo, ser el normalmente asociado con una subunidad hFSH) o heterólogo (es decir, que se origina de otra fuente distinta de hFSH) al polipéptido o puede ser homólogo o heterólogo a la célula huésped, es decir, ser un péptido de señal normalmente expresado a partir de la célula huésped o una que no es normalmente expresada a partir de la célula huésped.

Cualquier huésped adecuado puede utilizarse para producir los polipéptidos, incluyendo bacterias, hongos (incluyendo levaduras), células de plantas, insectos, mamíferos u otras células animales adecuadas, o líneas de células, así como animales transgénicos o plantas. Los ejemplos de células huésped de mamíferos adecuadas incluyen líneas de célula de ovario de hámster chino (CHO), (por ejemplo. CHO-KL; ATCC CCL-61), líneas de células de Mono Verde (COS) (por ejemplo. COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); células de ratón (por ejemplo. NSIO), líneas celulares de riñón de cría de hámster (BI-EK) (por ejemplo. ATCC CRL-1632 o ATCC CCL-10), y células humanas (por

ejemplo. BEK 293 (ATCC CRL-1573)), así como también células de plantas en cultivo de tejidos. Las líneas de células adecuadas adicionales son conocidas en el arte y puestas a disposición por los depositarios públicos, tal el American Type Culture Collection, EE.UU. Los métodos para introducir ADN exógeno en células huésped de mamíferos incluyen transfección mediada por fosfato de calcio, electroporación, transfección mediada por Dextran-DEAE, transfección mediada por liposoma y vectores virales.

Las células pueden cultivarse en un medio nutriente adecuado para producción del polipéptido utilizando los métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, la célula puede cultivarse por cultivo de frasco agitador, fermentación en pequeña y gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, discontinuas, de carga por lote o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales y en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten que el polipéptido sea expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar en un medio de nutrientes adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en el arte. Los medios adecuados se encuentran provistos por proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con las composiciones publicadas (por ejemplo. en catálogos de American Type Culture Collection). Si el polipéptido es secretado en el medio de nutrientes, el mismo puede ser recuperado directamente desde el medio. Si el

polipéptido no es secretado, el mismo puede recuperarse a partir de los lisatos de células. Un método producción de alto rendimiento de los mutantes de FSH de la invención se realiza a través del uso de amplificación de reductasa de dihidrofolato (DHFR) en células CHO con deficiencia en DHFR, mediante el uso de niveles sucesivamente mayores de metotrexato según se describe en la Patente US No. 4.889.803.

El polipéptido de FSH mutante resultante puede recuperarse mediante métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, puede recuperarse a partir del medio nutriente por procedimientos convencionales que incluyen, sin limitarse a ello, centrifugación filtración, extracción, secado por aspersion, evaporación o precipitación. Los polipéptidos de FSH mutantes pueden purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en el arte, que incluyen, sin limitarse a ello, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatofocalizada, y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo. Enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencia (por ejemplo, precipitación de sulfato de amonio), SDS-PAGE, o extracción.

También se provee una composición farmacéutica que comprende el mutante FSH. Dicha composición farmacéutica puede utilizarse para estimular foliculogenesis, por ejemplo, conjuntamente con técnicas de inducción de ovulación o de reproducción asistida (TRA). Debido a que el mutante de FSH de la presente invención

puede ser efectivo en la inducción de múltiples folículos para desarrollar y madurar, puede ser particularmente adecuado para su uso en TRA, en donde se desea recolectar múltiples oocitos.

El mutante de FSH puede utilizarse para inducir monofoliculogenesis para IO, o paucifoliculogenesis (hasta alrededor de tres folículos) para IUI, para fertilización *in vivo*. La monofoliculogenesis puede también lograrse con una dosis reducida del mutante de FSH, o una dosis menos frecuente según se compara con las preparaciones de FSH convencionales. Por ejemplo, en OI una preparación de FSH de la invención puede administrarse a 225-400 IU cada tres días, o dosis menores, dependiendo de la respuesta del paciente. La respuesta del paciente puede ser seguida por sonografía.

El mutante de FSH de la invención puede utilizarse en un régimen de hiperestimulación ovárica controlada (COH). Los regímenes convencionales para COH incluyen una fase de reducción en donde la hormona luteinizante endógena (LH) es reducida mediante la administración de un agonista de hormona de liberación de gonadotropina (GnRH) seguido por una fase estimulatoria en donde se induce el desarrollo folicular (foliculogenesis) por la administración diaria de hormona de estimulación de folículos (FSH), generalmente a alrededor de 150-225 IU/día.

La estimulación alternativa puede iniciarse con FSH después de menstruación espontánea o inducida, por administración de un antagonista de GnRH (que generalmente se inicia alrededor del

SS

día seis de la fase estimulatoria). Cuando hay por lo menos 3 folículos >16 mm (uno de 18 mm), un bolo único de hCG (5-10.000 IU) puede administrarse para imitar la producción natural de LH e inducir la ovulación. La recuperación de oocitos puede durar 36-38 horas después de la inyección de hCG.

El mutante de FSH puede también utilizarse para IO y IUI. Por ejemplo, la estimulación de FSH puede iniciarse después de la menstruación espontánea o inducida, a una dosis diaria de 75-150 IU. cuando 1 o 3 folículos han alcanzado un diámetro de por lo menos 16 mm, un bolo único de hCG puede administrarse para inducir la ovulación. La inseminación puede realizarse *in vivo*, por relación sexual normal o IUI.

Debido a que el mutante de FSH puede tener una vida media incrementada con respecto a las preparaciones de FSH del tipo natural, los regimenes tal como los descritos anteriormente pueden emplear dosis IU menores de FSH, y/o pueden modificarse por reducción del período de estimulación de FSH, mientras se logra una respuesta igual o menor, en términos de número y viabilidad de folículos. Por ejemplo, la foliculogenesis adecuada puede lograrse con dosis diarias de alrededor de 50-150, 50-100 o 50-75 IU FSH. La dosis de FSH puede ser diaria o semi-diaria. El período de dosis puede ser menor que o de alrededor de 14, 12, 11 o 10 días. Para IO, la preparación de mutante de FSH puede administrarse en dosis de 25-150 o 50-125 IU FSH/día. Para el tratamiento de infertilidad masculina,

56

puede administrarse una preparación de mutante de FSH a 3 X 150 a 300 IU/semana hasta que la espermatogénesis alcance niveles adecuados para la inseminación, ya sea a través de relación sexual regular o por técnicas TRA.

Debido a la vida media más larga de la FSH mutante, el mismo puede administrarse como una preparación de actuación prolongada, que puede administrarse menos frecuentemente que cada dos días. La FSH convencional puede administrarse a alrededor de 300 IU en cada segundo día, mientras que se logran resultados similares a la administración cada día a alrededor de 150 IU. La FSH mutante puede administrarse cada 3, 4, 5, 6 o 7 días, mientras se logran resultados similares o mejores que la administración diaria de FSH convencional.

El mutante de FSH puede utilizarse para la fabricación de un medicamento para tratamiento de enfermedades, desórdenes o condiciones. En otro aspecto, el polipéptido o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se utiliza en un método para tratar un mamífero en particular un humano, que comprende administrar al mamífero que lo necesite dicho polipéptido o composición farmacéutica.

Resultará evidente para los expertos en el arte que una cantidad efectiva de un polipéptido, preparación o composición depende, entre otras cosas, de la enfermedad, la dosis, el programa de administración, si el polipéptido o preparación o composición se administra en forma aislada o conjuntamente con otros agentes

57

terapéuticos, la vida media en suero de las composiciones, y la salud general del paciente. En general, una dosis efectiva de la preparación o composición es suficiente para asegurar un efecto terapéutico.

El mutante de FSH puede administrarse en una composición que incluye uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. "Farmacéuticamente aceptable" significa un portador o excipiente que no produce efectos adversos en paciente a los que se administra. Dichos portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en el arte, y el polipéptido puede formularse en composiciones farmacéuticas mediante métodos bien conocidos (ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18° edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990); *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis (2000); y *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3° Edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)). Los excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en composiciones que comprende el polipéptido incluyen, por ejemplo, agentes amortiguantes, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicantes, surfactantes o detergentes no iónicos ("agentes humectantes"), antioxidantes, agentes de relleno, agentes quelantes y cosolventes.

La composición farmacéutica que comprende el mutante de FSH puede ser formulada en una variedad de formas, que incluyen,

líquidos, por ejemplo, soluciones o suspensiones listas para usar, geles, liofilizados, o cualquier otra forma adecuada, por ejemplo, polvo o cristales adecuados para preparar una solución. La forma de la composición puede depender de la indicación particular que se trata y resultará evidente para un experto en el arte.

La composición farmacéutica que comprende el mutante de FSH puede administrarse en forma intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, sublingual, bucal, intranasal, transdérmica, por inhalación o en cualquier otra forma aceptable, por ejemplo, utilizando tecnología PowderJect o ProLease o un sistema de inyección tipo lapicera. El modo de administración puede depender de la indicación particular tratada y resultará evidente para un experto en el arte. La composición puede administrarse subcutáneamente, lo que permitirá al paciente realizar la auto-administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse conjuntamente con otros agentes terapéuticos. Estos agentes pueden incorporarse como parte de la misma composición farmacéutica o pueden administrarse separadamente a partir de los polipéptidos, ya sea en forma concurrente o de acuerdo con otro programa de tratamiento aceptable. Además, el polipéptido, preparación o composición farmacéutica pueden utilizarse como un accesorio a otras terapias.

La presente invención posee múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitativos.

Mutantes de FSH

La estructura de cristal 3D de FSH humana se utilizó para identificar las regiones en la molécula de FSH en donde puede insertarse un sitio de glicosilación candidato. Dos moléculas de FSH (cuatro subunidades) están presentes en cada unidad asimétrica de la estructura de cristal. Las dos moléculas de FSH se superpusieron y se compararon, en donde cada residuo es visualmente inspeccionado para identificar los sitios potenciales en donde puede insertarse un sitio de N-glicosilación que no causaría la disrupción del plegado adecuado del polipéptido de FSH o reduciría la actividad de FSH. La estructura cristalográfica de FSH se combinó con el conocimiento de la interacción FSH/receptor FSHR para asistir en la selección de los potenciales sitios de N-glicosilación. Los principales criterios de diseño fueron la disrupción mínima de estructura 3D, mínima disrupción de sitios de unión y activación esperados, y estructura 3D predecible compatible con glicosilación. En base a los criterios anteriores, se prepararon los siguientes dos mutantes de inserción de la subunidad-alfa de FSH:

#	Mutaciones	SEC ID NO
1	Inserto GNFT	4
2	Inserto GNRT	5

Análisis morfológico de los mutantes de FSH

Las alícuotas de sobrenadantes de cultivo concentrado de expresión temporaria de mutantes de subunidad-alfa de FSH 1-2 se analizaron por SDS-PAGE bajo condiciones de no reducción que permiten la resolución de heterodímeros de FSH intactos a partir de subunidades alfa y beta libres. Al comparar los pesos moleculares aparentes de cada heterodímero mutantes con los de FSH tipo natural, es posible determinar si la FSh mutante es hiperglicosilada con relación a la FSH tipo natural o salvaje. En resumen, después de la electroforesis, las proteínas fueron electroforéticamente transferidas a PVDF y se visualizaron utilizando anticuerpo Serono 9-14 dirigido contra la subunidad-alfa de FSH. Como un control, se analizaron también FSh humana natural, mutante GM1, FSH-CTP y Gonal F. La Tabla 1 muestra el peso molecular aparente del heterodímero formado por los mutantes de subunidad-alfa y subunidad-beta tipo natural según se calcula en base a patrones de peso molecular.

Muestra	M _r (kDa)	Conc. Plegado
FSH-CTP	45,244	
Gonal F	38,482	37x
GNFT inserto	49,375	36x
GNRT inserto	49,172	35x
GM1	46,202	40x
pesoFSH	45,083	36x

Tal como se muestra en la Tabla 1, cada uno de los dos mutantes de FSH expresados, es decir los insertos GNFT y GNRT, demostraron mayor glicosilación según se demuestra mediante un cambio de la distribución del peso molecular aparente del heterodímero comparado con la FSH humana natural.

Función In Vitro de mutantes de FSH

A fin de determinar la actividad de los mutantes de FSH, cada mutante fue sometido a ensayo con respecto a la capacidad para estimular la producción de cAMP en una línea de células CHO que expresa recombinantemente al receptor de FSH humana. Las células CHO-FSHR fueron mantenidas en FSHR El medio de desarrollo [MEM $\square$ (-) (Gibco, cat#12561-056) + 10% dializado FBS (Gibco, cat#26300-020) + 600 μ g/ml Geneticin (Gibco, cat#10131-035) + 0,02 μ M MTX]. Las células CHO-FSHR fueron sembradas a 2×10^4 células/receptáculo en 100 μ l/receptáculo (2×10^6 células/10ml = 1 placa) y se incubaron a 37°C durante 24 horas antes del ensayo.

Las células se utilizaron para ensayo si eran por lo menos 70% confluentes..

Se realizó una dilución 1:3 serial de 12 puntos a partir de 67,5 nM para todas las muestras y patrón interno (se utilizó Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) como un patrón interno). Todas las diluciones se realizaron en medios de ensayo [DMEM/F12 (libre de fenol, Gibco, cat #11039-021) + 1mg/ml BSA (Sigma, A-6003) + 0,1 mM IBMX (inhibidor de 3-isobutil-1-metilxantina fosfodiesterasa, Sigma, cat#I-7018)].

Los medios de desarrollo se retiraron de la placa de ensayo, se agregó 25µl medios de ensayo (suministrados con MA6000 cAMP MSD kit- Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD), las placas se recuperaron e incubaron a 37°C durante 15 minutos. Los receptáculos fueron luego dosificados con 25 µl/receptáculo de la muestra de ensayo, se mezclaron, las placas se recuperaron e incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de 1 hora de incubación, la mezcla y los medios fueron retirados de los receptáculos. 25 µl de amortiguador de lisis estándar (suministrado con MA 6000 Meso Scale Discovery kit) se agregó luego a cada receptáculo, las placas se cubrieron con sellador de placas (Packard, cat#6005185) y se agitó durante 5 minutos. Después de incubación de lisis durante 5 minutos, 25 µl de material celular de lisis se transfirió a la placa cAMP Meso Scale Discovery (suministrada con MA6000 MSD kit) y se incubó con mezclado suave a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregó 25 µl de conjugado cAMP-AP a cada receptáculo y se

mezcló. Se agregó luego 25 μ l de anticuerpo anti-cAMP a cada receptáculo, y las placas se cubrieron con sellador de placa y se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas fueron luego lavadas seis veces con 350 μ l/receptáculo de amortiguador de lavado en una lavadora de placa automática. 100 μ l de Sapphire II RTU (Listo para usar) mejorador de sustrato se agregó luego a cada receptáculo, las placas se cubrieron con sellador de placa y se incubaron 30 minutos en la oscuridad a 25°C. Las placas fueron luego leídas en un segundo por receptáculo con niveles bajos de cAMP que mostraban una alta señal y altos niveles de cAMP que mostraban una señal baja. Las curvas de dosis-respuesta de los mutantes de FSH se muestran en la Figura 2. Se calcularon los valores EC_{50} según se muestra en la Tabla 2.

Tal como se muestra en la Figura 2 y la Tabla 2, cada uno de los mutantes de FSH posee actividad in vitro comparable a la de FSH tipo natural.

Tabla 2

Muestra	EC_{50} M
FSH tipo natural	2.16E-10
Clon 10C- α GNRT/ β GM1	2.58E-10
Clon 11C- α GNFT/ β GM1	2.78E-10

Vida media In vivo de mutantes de FSH

Dos lotes diferentes de mutante GNFT y mutante GNRT, se analizaron en estudios farmacocinéticos separados (PK). Los dos estudios tenían el mismo diseño. 33 ratas SD hembras inmaduras de 21 días de edad (aprox. 40 g de peso corporal; Charles River Laboratories, Wilmington, MA) fueron divididas al azar en 5 grupos de tratamiento (n=6) y 1 grupo de línea base (n=3). La selección de ratas hembras inmaduras se basó en el uso de esta edad y sexo para determinaciones biológicas in vivo de actividad FSH. Los animales en los grupos de tratamiento recibieron inyecciones subcutáneas (s.c.) de 4 ug de GM1 (control), GNFT mutante, GNRT mutante o 8 ug de Gonadotropina coriónica humana (Gonal-F rhFSH) (control). La sangre fue recolectada desde el seno retro-orbital a la hora 0 del grupo base y en las horas 1, 2, 4, 6, 10, 24, 48 y 72 h de los animales en los grupos de tratamiento (n=3/punto de tiempo; las ratas fueron alternadas de modo de que no sangren en 2 puntos de muestreo subsiguientes). Aproximadamente 0,1 ml de sangre fue recolectada de cada rata en cada sangrado, y se recolectó plasma y se almacenó a -80°C hasta que fue analizado por ELISA. El ensayo para medir las proteínas de FSH en suero de ambos estudios fue DSL FSH Coated Well ELISA (Diagnostics Systems Laboratories, Webster, TX). Las muestras de suero fueron cada una analizadas por triplicado.

La vida media de mutante GNFT y mutante GNRT es aproximadamente 17 horas, mientras que las de los controles GM1 y Gonad-F es aproximadamente de 12 horas y 8 horas, respectivamente. Esto indica que el mutante GNFT y los mutantes GNRT poseen una vida media más larga que FSH tipo natural.

Ejemplo 5

Actividad biológica In vivo

El modelo in vivo utilizado para determinar la actividad biológica de los mutantes GNRT y GNFT es el ensayo de aumento de peso ovárico en ratas. El tratamiento de ratas hembras de 21 días inmaduras con FSH o moléculas con actividad tipo FSH, por ejemplo, mutantes GNRT y GNFT, dispara el desarrollo de folículos ováricos y la producción de oocitos. Este desarrollo es fácilmente detectado por medición de peso ovárico en el final del período de tratamiento. En el modelo, la sustancia a ser ensayada es administrada por inyección durante tres días y los ovarios son recolectados y pesados después de la última dosis. Este ensayo fue utilizado durante varias décadas como la base para asignar la potencia de FSH a productos clínicos para fines de etiqueta. Mide la acción fisiológica relevante de FSH y posee una clara correlación con rendimiento del producto en clínica.

La actividad in vivo de los mutantes GNRT y GNFT se comparó con la de FSH tipo natural. Todas las dosis se definieron en base a la equivalencia esperada de FSH, teniendo en cuenta la potencia in vitro y la vida media en ratas. Los mutantes GNRT y GNFT se

6A

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que codifica una subunidad-alfa mutante de FSH en donde la subunidad-alfa comprende una secuencia seleccionada entre el grupo formado por SEC ID NOS: 4-5.

2. Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.

3. El vector de acuerdo con la reivindicación 2 en donde el vector es un vector de expresión.

4. El vector de acuerdo con la reivindicación 2 en donde el vector comprende además un ácido nucleico que codifica la secuencia de SEC ID NO:3.

5. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 2.

6. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 5 en donde la célula es una célula de mamífero.

7. Una FSH mutante, en donde la subunidad-beta comprende la secuencia de ID NO:3, y en donde la subunidad-alfa comprende una secuencia codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.

8. Una FSH mutante de acuerdo con la reivindicación 7 en donde cualquiera entre 0 a 6 residuos de asparagina son glicosilados.

9. El mutante de FSH de acuerdo con la reivindicación 7, ID NO: 4 y en donde N5 es glicosilado.

10. La FSH mutante, de acuerdo con la reivindicación 7 en donde la subunidad-alfa comprende la secuencia de SEC ID NO:5 y en donde N5 es glicosilado.

11. Un método para producir un mutante de FHS que comprende:

proveer una célula que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, y un segundo ácido nucleico que codifica SEC ID NO:3;

cultivar la célula bajo condiciones que permiten la expresión de los ácidos nucleicos primero y segundo.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la célula es capaz de glicosilar proteína.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la célula comprende un vector simple que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y un ácido nucleico que codifica SEC ID NO:3.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la célula comprende un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y que además comprende un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica SEC ID NO:3.

15. Una composición farmacéutica que comprende el mutante FSH de acuerdo con la reivindicación 1 y opcionalmente un portador o excipiente farmacéutica mente aceptable.

16. Un método para tratar un mamífero infértil, que comprende administrar a un mamífero que lo necesita la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15.

17. Un método para estimular foliculogenesis en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesita la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15.

18. Un método para inducir hiperestimulación ovárica en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesita la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15.

Buenos Aires, enero de 2007, p.p. de APPLIED RESEARCH SYSTEMS
ARS HOLDING N.V.

Pedro Chaloupka

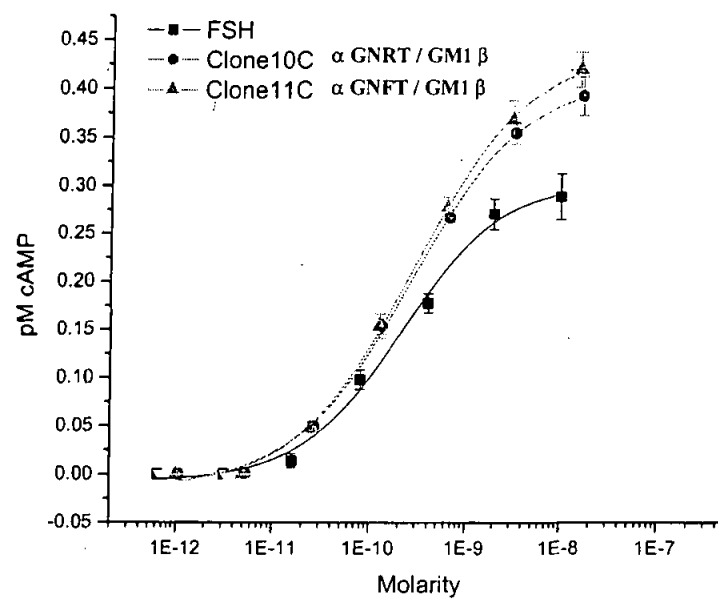
RESUMEN

Se describen mutantes de FSH con mayor glicosilación y mayores vidas medias. También se describe el uso de mutantes de FSH para inducir foliculogenesis en pacientes humanos.

FIGURA 1

	10	20	30	40	50
alpha	APD---VQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE				
GNFT	APDGNFTVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE				
GNRT	APDGNRTVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE				
	60	70	80	90	
alpha	STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS				
GNFT	STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS				
GNRT	STCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS				

FIGURA 2



FSH:EC50	2.16E-10
Clone10C:EC50	2.58E-10
Clone11C:EC50	2.78E-10

73

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.

<120> MUTANTES DE FSH

<130> 1115 PCT

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 92

<212> PRT

<213> Homs sapiens

<400> 1

Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro
1 5 10 15

Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys
20 25 30

Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu
35 40 45

Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser
50 55 60

Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr
65 70 75 80

74

Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
85 90

<210> 2
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu
1 5 10 15

Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys
20 25 30

Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln
35 40 45

Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro
50 55 60

Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr
65 70 75 80

Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val
85 90 95

Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu
100 105 110

75

<210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> subunidad mutante beta E55N/V57T

<400> 3

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu

1

5

10

15

Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys

20

25

30

Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln

35

40

45

Lys Thr Cys Thr Phe Lys Asn Leu Thr Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro

50

55

60

Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr

65

70

75

80

Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val

85

90

95

Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu

100

105

110

76

4

210> 4

211> 96

212> PRT

213> Artificial

220>

223> mutante inserción subunidad alfa GNFT

400> 4

Ala Pro Asp Gly Asn Phe Thr Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu
5 10 15

Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys
20 25 30

Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys
35 40 45

Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys
50 55 60

Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val
65 70 75 80

Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
85 90 95

<210> 5

<211> 96

77

:212> PRT

:213> Artificial

:220>

:223> mutante inserción subunidad alfa GNRT

:400> 5

Ala Pro Asp Gly Asn Arg Thr Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu
1 5 10 15

Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys
20 25 30

Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys
35 40 45

Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys
50 55 60

Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val
65 70 75 80

Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
85 90 95

78

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/048898

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out 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 purpose of search
2. ☐ 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.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/048898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/59 C12N15/16 A61K38/24

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)
C07K A61K 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, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/58493 A (MAXYGEN APS [DK]) 16 August 2001 (2001-08-16) the whole document	1-18
X	WO 2005/020934 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS [NL]; GARONE LOUISE M [US]; ARKINSTALL STEPHE) 10 March 2005 (2005-03-10) the whole document	1-18
X	WO 2004/050679 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS [NL]; BRONDYK WILLIAM H [US]; JIANG XULIANG []) 17 June 2004 (2004-06-17) the whole document	1-18
	----- -/--	

☒ 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.

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 January 2008

Date of mailing of the international search report

21/01/2008

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. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Valcárcel, Rafael

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/048898

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FURUHASHI M ET AL: "Effect of additional N-glycosylation signal in the N-terminal region on intracellular function of the human gonadotropin alpha-subunit" ENDOCRINE JOURNAL, TOKYO, JP, vol. 50, no. 3, June 2003 (2003-06), pages 245-253, XP002439749 ISSN: 0918-8959 the whole document	1-18
X	PERLMAN S ET AL: "Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the in-vivo activity of follicle stimulating hormone" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, ENDOCRINE SOCIETY, CHEVY CHASE, MD, US, vol. 88, no. 7, July 2003 (2003-07), pages 3227-3235, XP002390383 ISSN: 0021-972X the whole document	1-18
X	WEENEN C ET AL: "Long-acting follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation exhibited increased bioactivity compared with O-linked analogs in female rats" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, ENDOCRINE SOCIETY, CHEVY CHASE, MD, US, vol. 89, no. 10, October 2004 (2004-10), pages 5204-5212, 5196, XP002439750 ISSN: 0021-972X the whole document	1-18
E	WO 2007/084441 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS [NL]; MUDA MARCO [US]; JIANG XULIANG [US]; MC) 26 July 2007 (2007-07-26) the whole document	1-18
X	WO 91/16922 A (UNIV NEW JERSEY MED [US]) 14 November 1991 (1991-11-14) the whole document	1-18

81

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/048898

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0158493	A	16-08-2001	AU 3153101 A	20-08-2001
WO 2005020934	A	10-03-2005	AU 2004268683 A1	10-03-2005
			BR PI0413206 A	03-10-2006
			CA 2535522 A1	10-03-2005
			CN 1984926 A	20-06-2007
			EP 1694271 A2	30-08-2006
			JP 2007508245 T	05-04-2007
			KR 20070029620 A	14-03-2007
			MX PA06002119 A	31-05-2006
WO 2004050679	A	17-06-2004	AU 2002368265 A1	23-06-2004
			CA 2469724 A1	17-06-2004
			EP 1487479 A2	22-12-2004
			JP 2005520573 T	14-07-2005
WO 2007084441	A	26-07-2007	NONE	
WO 9116922	A	14-11-1991	CA 2082424 A1	09-11-1991
			DE 69131978 D1	16-03-2000
			DE 69131978 T2	05-10-2000
			EP 0531407 A1	17-03-1993
			JP 3330373 B2	30-09-2002
			JP 5508400 T	25-11-1993

 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: C07K 014/059	
2) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) LABORATOIRES SERONO S.A.	
30) Prioridad	(31) Prioridad 60/753,637	(32) Fecha 22/12/2005	(33) País US
		(72) Inventor(es) MARCO MUDA Y OTROS	
		(74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
35) Fecha limite inicio fase nacional: 22/07/2008		(87) Publicación internacional	
36) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 24/01/2008	
Fecha de presentación de la solicitud: 21/12/2006		N° publicación: WO 2008/010840	
No. de solicitud PCT/US2006/048898			
34) Título: MUTANTES DE FSH			

Reivindicación(es):

- 1. Un ácido nucleico que codifica una subunidad-alfa mutante de FSH en donde la subunidad-alfa comprende una secuencia seleccionada entre el grupo formado por SEC ID NOS: 4-5.
- 2. Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
- 3. El vector de acuerdo con la reivindicación 2 en donde el vector es un vector de expresión.
- 4. El vector de acuerdo con la reivindicación 2 en donde el vector comprende además un ácido nucleico que codifica la secuencia de SEC ID NO:3.
- 5. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 2.
- 6. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 5 en donde la célula es una célula de mamífero.
- 7. Una FSH mutante, en donde la subunidad-beta comprende la secuencia de ID NO:3, y en donde la subunidad-alfa comprende una secuencia codificada por el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
- 8. Una FSH mutante de acuerdo con la reivindicación 7 en donde cualquiera entre 0 a 6 residuos de asparagina son glicosilados.
- 9. El mutante de FSH de acuerdo con la reivindicación 7, ID NO: 4 y en donde N5 es glicosilado.
- 10. La FSH mutante de acuerdo con la reivindicación 7 en donde la subunidad-alfa comprende la secuencia de SEC ID NO:5 y en donde N5 es glicosilado.
- 11. Un método para producir un mutante de FHS que comprende:
proveer una célula que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, y un segundo ácido nucleico que codifica SEC ID NO:3;

- cultivar la célula bajo condiciones que permiten la expresión de los ácidos nucleicos primero y segundo.
- 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la célula es capaz de glicosilar proteína.
- 13. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la célula comprende un vector simple que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y un ácido nucleico que codifica SEC ID NO:3.
- 14. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la célula comprende un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y que además comprende un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica SEC ID NO:3.
- 15. Una composición farmacéutica que comprende el mutante FSH de acuerdo con la reivindicación 1 y opcionalmente un portador o excipiente farmacéutica mente aceptable.
- 16. Un método para tratar un mamífero infértil, que comprende administrar a un mamífero que lo necesita la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15.
- 17. Un método para estimular foliculogenesis en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesita la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15.

```

      10      20      30      40      50
      |       |       |       |       |
alfa  -----
VQDPVETLCEHH FPGQAPRPIQNGCCFRAVPTFRREKTNLYQVATLE
CHFT
APPTDVGCTCTCTGGDPPFQGHARIT CQGGCCFARVPTPLPKATGKQTHPDE
DQET
ALQDHRAPGCEATLGGUNPPGQAGALQGGCCFRAVPTFRRAKRLGQAVPLE

      60      70      80      90
      |       |       |       |
alfa  -----
STCTAKGVETVTPQSHPAVERPAKICITVPIES
ETDQVAGSDNPTVNDIFFVSTADNRCQYK
STQVAKSERVTVNGSEVETNLCSTQATKE
CHFT
```

	10	20	30	40	50
alfa					
APD----					
VQDCPECTLOENPFPSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					
GNFT					
APDGNFTVQDCPECTLOENPFPSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					
GNRT					
APDGNRTVQDCPECTLOENPFPSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					

	60	70	80	90
alfa				
GNFT				
GNRT				
STCCVAKSYNRRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS				
STCCVAKSYNRRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS				
STCCVAKSYNRRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS				

	10	20	30	40	50
alfa					
APD----					
VQDCPECTLOENPFPSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					
GNFT					
APDGNFTVQDCPECTLOENPFPSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					
GNRT					
APDGNRTVQDCPECTLOENPFPSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					

	10	20	30	40	50
alfa					
APD----					
VQDCPECTLOENPFPSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					
GNFT					
APDGNFTVQDCPECTLOENPFPSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					
GNRT					
APDGNRTVQDCPECTLOENPFPSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNVTSE					

	60	70	80	90
alfa				
GNFT				
GNRT				
STCCVAKSYNRRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS				
STCCVAKSYNRRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS				
STCCVAKSYNRRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS				

MATRIZ DE TIEMPOS		MATRIZ DE INFORMACION		
ACTUALIDAD	DURACION (DÍAS)	ACTIVIDAD	SECUENCIAS	DURACION
A	5	O	A	0
B	30	A	B, C	5
C	60	B	E, E, F, G2	30
D	15	C	D, E, F, G2	60
E	10	D	G1	15
F	10	E	G1	10
G1	5	F	G1	10
G2	5	I	H1, I1	
H1	10	G2	H2, I2	5
H2	10	H1	L1	5
I1	5	H2	L2	10
I2	5	I1	J1	10
J1	10	I2	J2	5
J2	10	J1	K1, M1	5
K1	10	J2	K2, M2	5
K2	10	K1	L1	10
L1	5	K2	L2	10
L2	5	L1	N1, O1	10
M1	30	L2	N2, O2	10

ACTUALIDAD	DURACION (DIAS)	ACTIVIDAD	SECUENCIAS	DURACION
M2	30	M1	P	5
N1	90	M2	P	5
N2	90	N1	R	30
O1	5	N2	R	30
O2	5	O1	P	90
P	5	O2	P	90
Q	5	P	Q	5
R	15	Q	R	5
		R	-	5
				15

Red de actividades

Para determinar la red de actividades se construye un arreglo lógico (Fig. 8), se asignan duraciones y se estiman los tiempos próximos de iniciación (Fig. 9), y se calculan los tiempos remotos de terminación (Fig. 10).

La etapa final consiste en establecer la matriz de elasticidad para lo cual se calculan los tiempos remotos de iniciación, tiempos próximos de terminación.

Matriz de elasticidad

Con la información obtenida se calculan las holguras y se procede a formar la matriz de elasticidad la cual es presentada en la página siguiente.

84

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-075688- -00000-0000

Fecha: 2008-07-22 16:12:09 Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

OFICIAL DE CAJA : 08 - 35,774
: MAYO 6 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

TANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	773183	06/05/2008	40,376,500.00

***** CONCEPTO *****

RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
50005-01-01 SOLICITUDES	5 TRAMITES DE SOL. DE MODELO DE UTI	294,000.00
	TOTAL :	\$ 294,000.00

DOSCIENTOS NOVENTA Y CUATRO MIL PESOS

ISABLE : _____

DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

10336- 8410045

85

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

BOLETA DE CAJA : 08 - 45,981
: JUNIO 9 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

ITEM	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2678328	09/06/2008	89,445,000.00

***** CONCEPTO *****

CONCEPTO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
005-01-01 SOLICITUDES	114 PTC CAP-II EXAMEN DE PATENTIBILIDAD	210,000.00
	TOTAL :	\$ 210,000.00

NOVENOS DIEZ MIL PESOS

BOLETA :

BOLETA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

16336. 841.004-5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-075688- -00000-0000

Fecha: 2008-07-22 16:12:09 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

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

COMPLETA ☒

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 ☐

STL4

Firma Responsable

Fecha

Jul 22. 08

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

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
LABORATORIES SERONO S.A

REFERENCIA	Radicación No.	08 75688
	Solicitud internacional	PCT/US2006/048898
	Fecha inicio fase nacional	22/07/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	10727

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe aclarar las dependencias en el capítulo reivindicatorio original.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

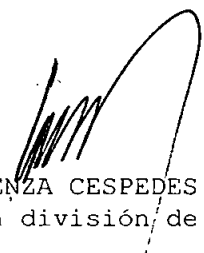
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.:8 75688



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 22 AGO. 2008
jfernand