

CAVELIER

ABOGADOS

cavelier.com
ier@cavelier.com

EDIFICIO SI
CARRERA 4 No.
BOGOTA 8, COL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-075688-00002-0000

Fecha: 2008-10-21 16:36:00 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 45

11
50
30
30

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comer
E. S. D.

Trámite : 011 Evento : 378 Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 08075688
Asunto : Solicitud de patente para MUTANTES DE FSH
Solicitante : LABORATOIRES SERONO S.A.

CONTESTACION OFICIO No. 10727

1. Yo, Emilio FERRERO, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante, LABORATOIRES SERONO S.A., doy contestación al requerimiento efectuado por este Despacho mediante Oficio No. 10727 notificado por fijación en lista el 22 de agosto de 2008, para lo cual presento los siguientes documentos:

1.1. Traducción al español del capítulo reivindicatorio con el fin de aclarar las dependencias del capítulo reivindicatorio original.

Presento además formulario de modificaciones debidamente diligenciado, con el cual se presenta un nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 18 reivindicaciones, además de la traducción al español del capítulo descriptivo en donde se ha modificado la página 14 del originalmente presentado.

Se acompaña el correspondiente recibo de pago por concepto de la solicitud de modificación.

2.1. Un documento en que consta la cesión del derecho a la patente efectuado por los tres (3) inventores en favor de la sociedad LABORATOIRES SERONO S.A.

Se presenta este documento en original, el cual fue debidamente suscrito, notariado y legalizado por Apostille, junto con su correspondiente traducción oficial al español.

2. De acuerdo con lo anterior, comedidamente solicito a Usted proseguir con el trámite de este asunto y ordenar la publicación de la solicitud de la patente identificada en la referencia.

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

**FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES
2000-10**

1		SOLICITUD DE:	
☐		Corrección de Error Material	☒ Modificación a una solicitud
2	SOLICITANTE	Nombre: LABORATOIRES SERONO S.A. sociedad constituida y existente bajo las leyes de Suiza Dirección: Centre Industriel, 1267 Coinsins Vaud, Suiza Teléfono: 546 09 70 E-mail: clientes@camyp.com Fax: 249 40 70 Domicilio: Vaud, Suiza	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
3	REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: Emilio FERRERO Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 E-mail: cavelier@cavelier.com Fax: 217 92 11 Domicilio: Bogotá, Colombia	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: <u>438.019</u> TP <u>31.929</u>
4	Número de expediente: 08075688 Clase: C07K 014/043 Título del Invento: MUTANTES DE FSH		
5	Descripción de la corrección o modificación solicitada: Se presenta un nuevo capítulo reivindicatorio modificado compuesto por 18 reivindicaciones, además de la traducción al español del capítulo descriptivo en donde se ha modificado la página 14 del originalmente presentado.		
6	Comprobante de pago No. 08-79,569 Fecha: Octubre 6 de 2008		
7	Anexos: ☒ Comprobante de pago de la tasa por concepto de la solicitud de modificación ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Certificado de existencia y representación legal, cuando el solicitante sea persona jurídica		
8	NOMBRE: <u>EMILIO FERRERO</u> FIRMA: <u></u> C.C. 438.019 de Usaquén T.P.A. 31.929		

The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country:* United States of America
This public document
2. *has been signed by:* Diane Cuddemi
3. *acting in the capacity of:* Notary Public
4. *bears the seal/stamp of:* the State of Massachusetts
whose commission expires on: January 23, 2009

Certified

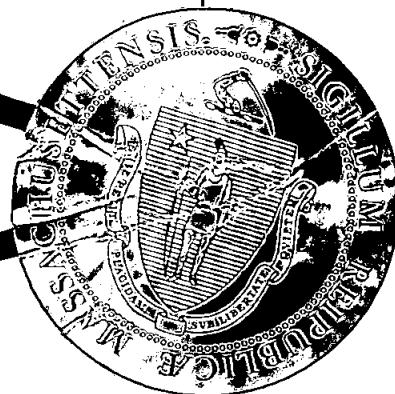
5. *at:* Boston, Massachusetts
6. *the:* 9 July, 2008
7. *by:* the Secretary of the Commonwealth
8. *No.:* 1319371
9. *Seal/stamp:*

Great Seal of the Commonwealth

10. *Signature:*

William Francis Galvin

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



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

CESION

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

domiciliado(s) en

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s)
inventor(es)

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos),
sin
limitación, a favor de la sociedad

constituida y existente de conformidad con las leyes de

domiciliada en

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada
Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente
de invención correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned

1- Marco MUDA

2- Xuliang JIANG

3- Sean D. MCKENNA

of

1- 279 Havard Street #11, MA Cambridge 02139,
United States of America

2- 73 Kelley Drive, Braintree, MA 02184, United
States of America

3- 679 Lincoln Street, Duxbury, MA 02332, United
States of America

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

FSH MUTANTS

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour
of

LABORATOIRES SERONO S.A.

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of
Switzerland

domiciled in

Centre Industriel, CH-1267 Coinsins,
Switzerland

all rights inherent to said invention and that the above mentioned
company hereby is enabled to apply, in its name, for the
corresponding patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this

June 25, 2008

en/in

Rockland, MA USA

por/by

Firma/Signature
Marco MUDA

Marco MUDA

Firma/Signature
Xuliang JIANG

Xuliang JIANG

Firma/Signature
Sean D.
MCKENNA

Sean D. MCKENNA

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____

de 200__ Ante mí, Notario Público de _____

compareció(eron)
personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y
quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this 25th day of June

200 8 before me, a Notary Public of

Plymouth County, Massachusetts, USA

personally
appeared

Marco MUDA, Xuliang JIANG and Sean D.
MCKENNA

To me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has(have) legal
capacity to execute it.

NOTARIO PÚBLICO-NOTARY
PUBLIC

Diane Coddere

APOSTILLE

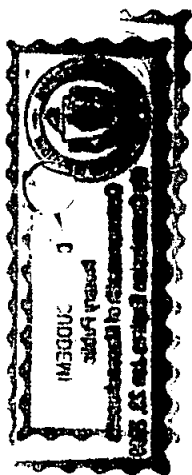
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
- This public document
2. has been signed by
3. acting in the capacity of
4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at
6. the
7. by
8. No.
9. Seal/stamp
10. Signature





95

TRADUCCION OFICIAL No.08/1153 de un documento escrito en ingles el cual para su identificación se sella con el sello del traductor al tiempo con la presente. Esta traducción ha sido preparada por Hilda Aguilera de Piedrahita, traductora e intérprete oficial en los idiomas inglés-español-inglés. debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y autorizada por el Ministerio del Interior y Justicia, por Resolución No. 323 de 1980 (Se traduce un documento de Cesión de Inventores a LABORATOIRES SERONO S.A., escrito en inglés, y Apostilla 1319371.)

©cavelier abogados
carrera 4ª. # 72-35

374 Bogotá, Colombia

Yo, Nosotros abajo firmados:

- (1) Marco MUDA
- (2) Xuliang JIANG
- (3) Sean D. McKENNA

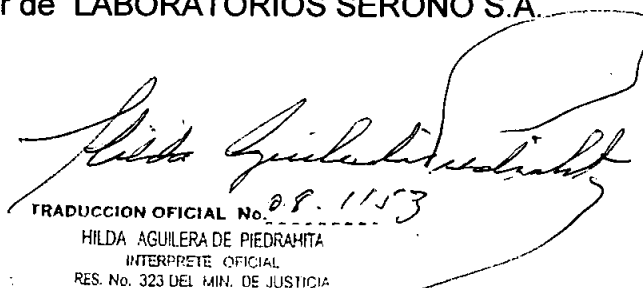
Domiciliados en

- (1) 279 Harvard Street # 11, MA Cambridge
Estados Unidos de América
- (2) 73 Kelley Drive, Braintree, MA 02184, Estados Unidos de
América.
- (3) 679 Lincoln Street, Duxbury, MA 02332, Estados Unidos de
América.

Declaramos bajo juramento que somos los únicos y verdaderos
inventores de la invención titulada:

FSH MUTANTS

Declaramos igualmente que cedemos, sin reservaciones, o
limitaciones a favor de LABORATORIOS SERONO S.A.


TRADUCCION OFICIAL No. 08. 1153
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 323 DEL MIN. DE JUSTICIA

96

Sociedad constituida y existente de conformidad con las leyes de Suiza,

Domiciliada en Centre Industriel, CH 1267, Coinsins, Suiza

Todos los derechos inherentes a dicha invención y que la arriba mencionada compañía queda facultada por la presente para solicitar en su nombre la correspondiente patente de invención en la República de Colombia.

Dado y Firmado hoy día 25 de Junio, 2008

En Rockland, MA Estados Unidos de América

Por: (Firmado) Marco MUDA

Por (Firma) Xulian JIANG

Por (Firmado) Sean D. McKENNA

CERTIFICACION NOTARIAL (INDIVIDUO)

Hoy día 25 de Junio, de 2008, ante mí, Notario Público del Condado de Plymouth, Massachusetts, Estados Unidos de América personalmente comparecieron Marco MUDA, Xulian JIANG y Sean D. McKENNA,

A quienes conozco personalmente como las personas que suscribieron el documento que antecede, y quienes tienen capacidad legal para suscribirlo.

NOTARIO PUBLICO (Firmado) DIANE CUDDMI

(Sello Notarial en tinta : DIANE CUDDMI

Mi comisión expira el 23 de Enero 2009

97

LA MANCOMUNIDAD DE MASSACHUSETTS

William Francis Galvin

Secretario de la Mancomunidad

APOSTILLE

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido suscrito por: Diane Cuddemi
3. obrando en calidad de Notario Público
4. Lleva el sello/estampilla del : Estado de Massachusetts
Cuya comisión expira el 23 de Enero, 2009

Certificada

5. en Boston, Massachusetts 6 el día 9 de Julio, 2008
7. por el Secretario de la Mancomunidad
8. No. 1319371
9. Gran Sello de la Mancomunidad
10. Firma: William Francis Galvin,

Secretario de la Mancomunidad

Preparado

por DGITTENS

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito, habiendo tenido el original a la vista. Colo-16336-841-004-5 Solic. SCT

Hilda Aguilera de Piedrahita
68.1153
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 323 DEL MIN. DE JUSTICIA

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2008 AGO - 4
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.
11:17
799797
Hilda Aguilera de Piedrahita
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
799797
Hilda Aguilera de Piedrahita
ASISTENTE DE LEGALIZACIONES

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 1 en donde el vector es un vector de expresión.

4. El vector de acuerdo con la reivindicación 1 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 1.

6. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 1 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 1 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 1 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.

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 en donde la subunidad alfa comprende la secuencia de 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 FSH 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 7 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.

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, Grossmann y otros, *Mol Endocrinol* 1996 10 (6): 769-79, Roth y Dias (*Mol*

Cell Endocrinol 1995 1; 109 (2): 143-9, Valove y otros, *Endocrinology* 1994; 135 (6): 2657-61, Yoo y otros, *JBiol Chem* 1993 25; 268 (18): 13034-42), US 5.508.261 y Chappel y otros, 1998, *Human Reproduction*, 13 (3): 1835 revelan varios estudios de la relación estructura-función e identifican residuos de 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), tal como fertilización *in vitro* (FIV), FIV en forma conjunta con inyección de espermatozoides intracitoplásmico (FIV/ICSI) y 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 U/mg actividad de FSH que es sustancialmente libre de actividad de LH, y en donde la subunidad-alfa y subunidad-beta de FSH, 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 de carbohidratos diferentes. Además, aún en el mismo sitio de glicosilación en una glicoproteína dada, pueden encontrarse diferentes estructuras de carbohidratos. Esta heterogeneidad es una consecuencia de la síntesis dirigida de no patrón de los carbohidratos.

La N-glicosilación de proteínas se produce específicamente en el patrón de consenso Asn-Xaa-Ser/Thr, y en una menor medida en el 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 N-glicosilación de la secuencia Asn-Pro-Ser/Thr se produce a una velocidad 50-veces más baja que otros patrones de consenso de Asn-Xaa-Ser/Thr.

La FSH humana contiene cuatro sitios de glicosilación de unión-N: dos en la subunidad-alfa común en las posiciones 52 y 78 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 señal 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 CHO 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 siádico 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 la 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 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 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:5 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

manea 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 flanco, 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 aspersión, 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 monofoliculogénesis 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 estimuladora en donde se induce el desarrollo folicular (foliculogénesis) 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 día seis de la fase estimuladora). 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

124

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 descriptos 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, 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 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 farmacéutica mente 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^o 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^o Edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)). Los excipientes farmacéutica mente aceptables que pueden utilizarse en composiciones que comprende el polipéptido incluyen, por ejemplo, agentes amortiguantes, agentes estabilizantes, conservantes, isotonificantes, 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 otro 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.

128

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..

130

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 Gonat F 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 25 μ l 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 μ l/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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 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 Gonal-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 encontraron como poseedores de una actividad de FSH potente con una magnitud similar a la de FSH tipo natural.

134



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 79,569
FECHA : OCTUBRE 6 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80756196	06/10/2008	26,245,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
12		MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	103,000.00
		TOTAL :	\$ 103,000.00

SON: CIENTO TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

080 16236-841-001-5



2020
Bogotá D.C.,

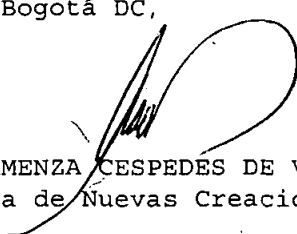
Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
LABORATORIES SERONO S.A

REFERENCIA	Radicación No.	8 75688
	Solicitud internacional	PCT/US2006/048898
	Fecha inicio fase nacional	22/07/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	9203
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

11 NOV. 2009


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

adpall