



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 784**

51 Int. Cl.:
A61K 6/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04783331 .4**

96 Fecha de presentación : **02.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1694271**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

54 Título: **Mutante de glicosilación de la FSH.**

30 Prioridad: **02.09.2003 US 499802 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2011

73 Titular/es: **MERCK SERONO S.A.**
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaduz, CH

72 Inventor/es: **Garone, Louise, M.;**
Arkininstall, Stephen, J.;
Brondyk, William, H.;
Campbell, Robert, K.;
Jiang, Xuliang;
Mckenna, Sean, D. y
Tepper, Mark

74 Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 784 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mutante de glicosilación de la FSH

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos que exhiben actividad de la hormona estimulante de los folículos, a métodos para preparar tales polipéptidos, y el uso de tales polipéptidos en terapia, en particular en el tratamiento de desórdenes reproductivos.

2. Descripción de la técnica relacionada

a. Gonadotropinas

- 10 La hormona estimulante de los folículos (FSH) es un miembro de la familia de las gonadotropinas que juega papeles clave en la fertilidad humana. Las gonadotropinas, que también incluyen la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (CG), son heterodímeros, que consisten cada una en una subunidad α común (92 aminoácidos) y una subunidad β única (111 aminoácidos en la FSH). Las secuencias de aminoácidos de las formas maduras de las subunidades α y β se muestran en la SEQ ID NO: 1 y la SEC ID N^o: 2, respectivamente.

- 15 La FSH humana ha sido aislada de las glándulas pituitarias y de la orina postmenopáusica (patente europea EP 322.438) y ha sido producida de manera recombinante en células de mamíferos (patentes de EE.UU. 5.639.640, 5.156.957, 4.923.805, 4.840.896, 5.767.251, patentes europeas EP 211.894 y EP 521.586). Estas últimas referencias también describen el gen de la subunidad β de la FSH humana. La patente de EE.UU. 5.405.945 describe un gen de la subunidad α humana modificado que comprende sólo un intrón.

- 20 Liu et al., J Biol Chem 1993, 15; 268 (2): 21613-7, Grossmann et al., Mol Endocrinol 1996 10 (6): 769-79, Roth y 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), patente de EE.UU. 5.508.261 y Chappel et al., 1998, Human Reproduction, 13 (3): 1835 describen diversos estudios de relación estructura-función e identifican residuos de aminoácidos implicados en la unión con receptores y activación y en la dimerización de la FSH.

- 25 b. Uso de gonadotropinas en técnicas de reproducción asistida

- Las gonadotropinas juegan papeles cruciales en el ciclo reproductivo, y su uso en terapias exógenas es esencial para las técnicas de reproducción asistida (TRA), tales como fertilización *in vitro* (FIV), FIV junto con inyección espermática intracitoplásmica (FIV/ICSI) y transferencia de embriones (TE), así como para la inducción de la ovulación (IO) en pacientes anovulatorias que se someten a fertilización *in vivo* bien de manera natural o bien mediante inseminación intrauterina (IIU).
- 30

Las patentes de EE.UU. 4.589.402 y 4.845.077 describen la FSH humana purificada que está exenta de LH y el uso de la misma para fertilización *in vitro*. La patente europea EP 322 438 describe una proteína con al menos 6200 U/mg de actividad FSH que está sustancialmente exenta de actividad LH, y en la que la subunidad α y la subunidad β de la FSH, respectivamente, pueden ser naturales o formas truncadas especificadas de las mismas.

- 35 Es necesaria una terapia prolongada para conseguir un efecto terapéutico, típicamente durante 8-10 días consecutivos y a veces hasta 21 días para estimular la foliculogénesis en las mujeres, y durante hasta 18 meses en varones hipogonadotróficos para inducir la espermatogénesis. La hFSH recombinante se administra típicamente como una inyección diaria i.m. ó s.c., con la consiguiente incomodidad y una potencial reacción local en el sitio de inyección. Disminuir la frecuencia de administración facilitaría la terapia y haría que la administración de gonadotropinas fuera más conveniente, más tolerable y llevadera para el paciente.
- 40

c. Glicosilación de la FSH

- Las gonadotropinas son glicoproteínas, teniendo cada subunidad cadenas laterales de oligosacáridos unidas a la asparagina (unidas a N) que son importantes para la actividad y función *in vivo*. La adición de carbohidratos (glicosilación) a polipéptidos es un evento post-translacional que da como resultado la adición de cadenas de azúcares a aminoácidos específicos de asparagina (unidos a N) o serina/treonina (unidos a O). En contraste con la invariante secuencia de aminoácidos de la porción proteínica de las glicoproteínas, las estructuras de los carbohidratos son variables, un rasgo denominado microheterogeneidad. Por ejemplo, los sitios de N-glicosilación sobre la misma proteína pueden contener diferentes estructuras de carbohidratos. Además, incluso en el mismo sitio de glicosilación sobre una glicoproteína dada, se pueden encontrar diferentes estructuras de carbohidratos. Esta heterogeneidad es una consecuencia de la síntesis de los carbohidratos no dirigida por plantillas .
- 45
- 50

La N-glicosilación de proteínas se produce específicamente en el patrón de consenso Asn-Xaa-Ser/Thr, y en menor grado en el patrón de consenso Asn-Xaa-Cys, donde Xaa puede ser cualquier residuo de aminoácido. Sin embargo,

la presencia de un tripéptido de consenso no es suficiente para asegurar que se glicosilará un residuo de asparagina. Por ejemplo, la N-glicosilación de la secuencia Asn-Pro-Ser/Thr se produce con una tasa 50 veces más baja que los otros patrones de consenso de Asn-Xaa-Ser/Thr.

5 La FSH humana contiene cuatro sitios de glicosilación unidos a N: dos sobre la subunidad α común en las posiciones 52 y 78 y dos sobre la subunidad β en las posiciones 7 y 24. Los carbohidratos unidos a la subunidad α de la FSH son críticos para el ensamblaje del dímero, la integridad, la secreción y transducción de señales, mientras que los carbohidratos de la subunidad β son importantes para el ensamblaje del dímero, secreción y eliminación del heterodímero de la circulación.

10 Galway et al., *Endocrinology* 1990; 127 (1): 93-100 demuestran que las variantes de la FSH producidas en una línea celular CHO de N-acetilglucosamina transferasa-I o una línea celular CHO defectiva en transporte de ácido siálico son tan activas como la FSH secretada por las células naturales o la FSH de la pituitaria purificada *in vitro*, pero carecen de actividad *in vivo*, presumiblemente debido a la rápida eliminación de las variantes inadecuadamente glicosiladas en el suero. D'Antonio et al., *Human Reprod* 1999; 14 (5): 1160-7 describen diversas isoformas de la FSH que circulan en la corriente sanguínea. Las isoformas tienen secuencias de aminoácidos idénticas, pero difieren en su grado de modificación post-translacional. Se encontró que el grupo de isoformas menos ácido tenía una eliminación *in vivo* más rápida en comparación con el grupo de isoformas ácido, debido posiblemente a diferencias en el contenido de ácido siálico entre las isoformas. Además, Bishop et al. *Endocrinology* 1995; 136 (6): 2635-40 concluyen que la vida media circulatoria parece ser el determinante principal de la actividad *in vivo*. Estas observaciones condujeron a la hipótesis de que la vida media de la FSH podría ser aumentada introduciendo sitios de glicosilación adicionales para aumentar el contenido de ácido siálico del polipéptido.

d. Variantes de la FSH

Se han desarrollado agonistas de la FSH con vidas medias aumentadas fusionando el péptido carboxiterminal de la hCG (CTP) a FSH humana recombinante nativa (rhFSH). EL resto CTP consiste en aminoácidos 112-118 a 145 con cuatro sitios de glicosilación unidos a O localizados en las posiciones 121,127, 132 y 138. Las patentes de EE.UU. 5.338.835 y 5.585.345 describen una subunidad β de la FSH modificada extendida en el Glu C-terminal con el resto CTP de la hCG. Se afirma que el análogo modificado resultante tiene la actividad biológica de la FSH nativa, pero una vida media circulante prolongada. La patente de EE.UU. 5.405.945 describe que la parte carboxiterminal de la subunidad β de la hCG o una de sus variantes tiene efectos significativos sobre la eliminación de CG, FSH y LH.

La patente de EE.UU. 5.883.073 describe proteínas de cadena única que constan de dos subunidades α con actividad agonista o antagonista para CG, TSH, LH y FSH. La patente de EE.UU. 5.508.261 describe polipéptidos heterodiméricos que tienen una afinidad a la unión a receptores de LH y FSH que comprenden una subunidad α de hormona glicoproteínica y un polipéptido de la subunidad β que ocurre no naturalmente, en el que el polipéptido de la subunidad β es una cadena de aminoácidos que comprende cuatro subsecuencias unidas, cada una de las cuales se elige de una lista de secuencias específicas. Klein et al. (2003) describen un análogo de cadena única de la FSH con una vida media aumentada, en el que las subunidades α y β están unidas mediante un oligopéptido que contiene dos sitios de glicosilación unida a N.

La solicitud de patente internacional WO 01/58493 describe 77 mutaciones que se pueden hacer en la subunidad α de la FSH y 51 mutaciones que se pueden hacer en la subunidad β de la FSH en un intento de mejorar la vida media *in vivo* de la FSH. La solicitud de patente internacional WO 01/58493 describe que las subunidades α y β se pueden usar individualmente (1 sitio de glicosilación adicional) o en combinación (2 sitios de glicosilación adicionales). Los 128 mutantes candidatos se identificaron usando 50 modelos de la estructura 3D de la FSH que fueron generados en base únicamente a la estructura de la hCG y un alineamiento de secuencia de la FSH y hCG a pesar de que sólo hay un 32% de identidad entre las subunidades β de la hCG y la FSH. La solicitud de patente internacional WO 01/58493 no describe la producción o ensayo de ninguna subunidad α o β de la FSH donde se introdujo un sitio de glicosilación mediante mutagénesis dirigida al sitio.

Existe una necesidad clínica de un producto que proporcione parte de o todos los efectos terapéuticamente relevantes de la FSH, y que se pueda administrar a intervalos menos frecuentes comparado con los productos de FSH disponibles en la actualidad, y que preferiblemente proporcione un nivel más estable de actividad de FSH circulante comparado con el obtenible mediante el tratamiento actual.

50 La presente invención está dirigida a tales productos, así como a los medios de preparación de tales productos.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una FSH mutante, en la que la subunidad α de la FSH comprende la secuencia SEQ ID NO. 3, y en el que la subunidad β de la FSH comprende la secuencia SEQ ID NO. 4. La FSH mutante puede estar N-glicosilada en los residuos de asparagina 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de dicha FSH mutante. N83 de la subunidad α mutante puede estar glicosilada. N55 de la subunidad β mutante puede estar glicosilada.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende un primer ADN y un segundo ADN, en el que el primer ADN codifica un mutante de la subunidad α de la FSH que comprende la secuencia SEQ ID NO. 3 y en el que el segundo ADN codifica un mutante de la subunidad β de la FSH que comprende la secuencia SEQ ID NO. 4. El vector puede ser un vector de expresión.

- 5 La presente invención también se refiere a una célula aislada que comprende un vector que comprende un primer ADN y un segundo ADN, en el que el primer ADN codifica un mutante de la subunidad α de la FSH que comprende la secuencia SEQ ID NO. 3 en el que el segundo ADN codifica un mutante de la subunidad β de la FSH que comprende la secuencia SEQ ID NO. 4. El vector puede ser un vector de expresión. La célula puede ser una célula de mamífero.
- 10 La presente invención también se refiere a una célula aislada que comprende un segundo vector, en el que el primer vector comprende un ADN que codifica un mutante de la subunidad α de la FSH que comprende la secuencia SEQ ID NO. 3 en el que el segundo vector comprende un ADN que codifica un mutante de la subunidad β de la FSH que comprende la secuencia SEQ ID NO. 4. El vector puede ser un vector de expresión. La célula puede ser una célula de mamífero.
- 15 La presente invención también se refiere a un método para producir un mutante de la FSH que comprende células de mamífero cultivadas capaces de glicosilar proteínas, en el que dichas células comprenden un primer vector de expresión que comprende un ADN que codifica una subunidad α de la FSH que comprende la secuencia SEQ ID NO. 3 y un segundo vector de expresión que comprende un ADN que codifica una subunidad β de la FSH que comprende la secuencia SEQ ID NO. 4.
- 20 La presente invención también se refiere a una composición que comprende un mutante de la FSH y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la subunidad α de la FSH comprende la secuencia SEQ ID NO. 3, y en la que la subunidad β de la FSH comprende la secuencia SEQ ID NO. 4.

25 La presente invención también se refiere a un método para tratar un mamífero infértil, que comprende la administración a un mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de un mutante de la FSH mutante, en el que la subunidad α de la FSH comprende la secuencia SEQ ID NO. 3, en el que la subunidad β de la FSH comprende la secuencia SEQ ID NO. 4.

30 La presente invención también se refiere a un método para estimular la foliculogénesis en un mamífero, que comprende la administración a un mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de un mutante de la FSH mutante, en el que la subunidad α de la FSH comprende la secuencia SEQ ID NO. 3, en el que la subunidad β de la FSH comprende la secuencia SEQ ID NO. 4.

La presente invención también se refiere a un método para inducir la hiperestimulación ovárica en un mamífero, que comprende la administración a un mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de un mutante de la FSH mutante, en el que la subunidad α de la FSH comprende la secuencia SEQ ID NO. 3, en el que la subunidad β de la FSH comprende la secuencia SEQ ID NO. 4.

35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el mapa plasmídico del vector de expresión usado para la expresión de la subunidad α H83N.

La Figura 2 muestra el mapa plasmídico del vector de expresión usado para la expresión transitoria de la subunidad β E55/V57T.

40 La Figura 3 muestra el mapa plasmídico del vector de expresión usado para la expresión de la subunidad β E55/V57T.

La Figura 4 muestra la morfología de GM-1. Panel A y C: espectrometría de masas MALDI-TOF llevado a cabo sobre GM-1 y Gonad-F. Panel B: análisis LDS-PAGE de GM-1 y Gonad-F.

La Figura 5 muestra la eficacia de GM-1 en el modelo de inducción de ovulación de dos días en rata inmadura.

Descripción detallada de la invención

45 Aunque se ha demostrado que aumentar el contenido de carbohidratos de la FSH puede conducir a una vida media *in vivo* aumentada, mejorar la vida media de la FSH es más complicado que añadir simplemente sitios de glicosilación adicionales. Aunque es necesaria una secuencia de consenso de glicosilación para la adición de carbohidratos, no es suficiente para asegurar que un sitio de adición de carbohidratos será utilizado. Otros factores, tales como el plegado y la conformación de la proteína local durante la biosíntesis, determinan si un oligosacárido se une en un sitio de secuencia de consenso dada. Además, 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.

50

Hasta este momento, los análogos de la FSH con vidas medias aumentadas han estado limitados a proteínas de fusión en las que la parte fusionada del polipéptido incluía sitios de glicosilación adicional. Los análogos de la FSH con vidas medias aumentadas deben producirse mediante la introducción de sitios de glicosilación mediante mutagénesis dirigida al sitio.

5 El conocimiento estructural de la FSH es crítico cuando se añaden sitios de glicosilación mediante mutagénesis dirigida al sitio ya que los residuos de consenso necesitan ser añadidos en posiciones que sean compatibles con la adición de carbohidratos. Si se introduce un sitio de glicosilación mediante mutación, los residuos mutados no pueden romper la estructura tridimensional de la proteína o perjudicar sustancialmente la función deseada de la proteína, tal como unión o activación del receptor. Además, los residuos de consenso no deben añadirse de
10 manera que queden alojados en el interior de la estructura de la proteína plegada, de lo contrario es improbable que ocurra la glicosilación en el sitio particular.

Hasta hace poco, la estructura tridimensional de las gonadotropinas estaba limitada a dos informes independientes de la estructura cristalina de hCG : una estructura de hCG parcialmente deglicosilada (Lapthom et al., 1994; Wu et al., 1994) una estructura de baja resolución del complejo ternario de hCG totalmente glicosilada y dos fragmentos Fv
15 (Tegoni et al., 1999).

Aunque hCG y FSH son patrones de plegado esencialmente idénticos, las dos estructuras son significativamente diferentes (Fox et al, 2001), y la estructura detallada para los residuos de aminoácidos individuales para la molécula FSH no pueden modelizarse adecuadamente a partir de las estructuras de hCG determinadas previamente (Wu et al, 1994; Lapthom et al, 1994).

20 La presente invención se dirige a un mutante de la FSH que ha sido diseñado únicamente en la estructura cristalina en 3D de la molécula de FSH humana (Fox et al, 2001). El mutante de la FSH de la presente invención ("GM-1") ha sido modificado introduciendo las sustituciones siguientes para crear sitios de reconocimiento de glicosilaciones adicionales: H83N de la subunidad α y E55N/V57T de la subunidad β . Se pueden glicosilar uno o más de los sitios de glicosilación adicional de la FSH recombinante. El o más sitios de glicosilación adicional de la FSH mutante
25 pueden ser glicosilados *in vitro* o *in vivo*.

La FSH mutante de la presente invención puede prepararse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Estos métodos incluyen la construcción de secuencias de nucleótidos que codifican los mutantes de FSH respectivos y que expresan la secuencia de aminoácidos en un huésped transfectado adecuado. El mutante de la FSH de la presente invención también puede producirse por síntesis química o por una combinación de síntesis
30 química y tecnología de ADN recombinante.

El mutante de la FSH de la presente invención puede comprender las subunidades α y β de la FSH en forma de dos cadenas polipeptídicas independientes, donde las dos cadenas llegan a dimerizar *in vivo* para formar un polipéptido dimérico, o puede comprender una construcción de cadena única que comprende las dos subunidades enlazadas covalentemente mediante un enlace peptídico o un péptido enlazante. Los residuos de aminoácidos del péptido
35 enlazante pueden exhibir propiedades que no interfieren significativamente con la actividad del mutante de la FSH .

El mutante de la FSH de la presente invención puede tener una vida media aumentada comparada con la FSH natural. El mutante de la FSH de la presente invención puede tener también una estabilidad aumentada comparada con la FSH natural. El mutante de la FSH puede comprender oligosacáridos en 0,1 , 2,3, 4,5 ó 6 de los sitios de glicosilación unida al N. El mutante de la FSH puede comprender una o más isoformas del mutante de la FSH , en la que cada isoforma comprende oligosacáridos en 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de glicosilación unida al N.
40

La secuencia de nucleótidos que codifica las subunidades α o β de los mutantes de la FSH de la invención se puede construir aislando o sintetizando una secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad de FSH parental, tal como la hFSH-alfa o hFSH-beta con las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NOS: 3 y 4, respectivamente. Después, la secuencia de nucleótidos se puede cambiar para efectuar la sustitución de los
45 residuos de aminoácidos relevantes. La secuencia de nucleótidos se puede modificar mediante mutagénesis dirigida al sitio. De manera alternativa, la secuencia de nucleótidos se puede preparar por síntesis química, en donde se diseñan oligonucleótidos en base a la secuencia de aminoácidos del mutante de la FSH .

La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido puede ser insertada en un vector recombinante y unirse de manera operativa a secuencias de control necesarias para la expresión del polipéptido en la célula huésped transfectada deseada. Un experto en la técnica puede hacer una selección entre estos vectores, secuencias de control de la expresión y huéspedes sin demasiada experimentación. El vector recombinante puede ser un vector autónomamente replicante, es decir, un vector que existe como entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, p.ej. un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el
50 (los) cromosoma(s) en el cual (los cuales) ha sido integrado.
55

El vector puede ser un vector de expresión en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención está unida de manera operativa a segmentos adicionales requeridos para la transcripción de la secuencia

de nucleótidos. El vector puede derivar de ADN plásmido o viral. Están disponibles en el mercado varios vectores de expresión adecuados para la expresión en las células huésped mencionadas en la presente memoria, o se describen en la bibliografía.

5 El vector recombinante puede comprender además una secuencia de ADN que permite al vector replicarse en la célula huésped en cuestión. Un ejemplo de una secuencia tal, (cuando la célula huésped es una célula de un mamífero) es el origen de replicación SV40. El vector también puede comprender un marcador seleccionable, p.ej. un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped, tal como el gen que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) o uno que confiere resistencia a un fármaco, p.ej. ampicilina, kanamicina, tetraciclina cloramfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

10 El vector puede comprender también un gen amplificable, tal como *DHFR*, de tal modo que se pueden seleccionar en medios apropiados células que tengan copias múltiples del gen amplificable y secuencias flanqueantes, incluyendo el ADN de la FSH mutante. La expresión "secuencias de control" se define en este texto para incluir todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de los polipéptidos de la invención. Los ejemplos de secuencias de control adecuadas para dirigir la transcripción en células de mamíferos incluyen los promotores tempranos o tardíos de SV40 y adenovirus, p.ej. el promotor tardío mayor del adenovirus 2, el promotor MT-1 (gen de la metalotioneína) y el promotor del gen inmediato-temprano del citomegalovirus humano (CMV).

15 La presente invención se refiere también a ADN aislado que codifica una subunidad α H83N y un ADN aislado que codifica una subunidad β E55N/V57T de la FSH. Las secuencias de nucleótidos de la invención que codifica los mutantes de la FSH, ya se preparen por mutagénesis dirigida al sitio, síntesis, PCR u otros métodos, también puede
20 incluir opcionalmente una secuencia de nucleótidos que codifique un péptido señal. El péptido señal está presente cuando el polipéptido es para ser secretado de las células en las que está expresado. Tal péptido señal, si está presente, podría ser uno reconocido por la célula elegida para la expresión del polipéptido. El péptido señal puede ser homólogo (p.ej. ser el normalmente asociado con una subunidad de la hFSH) o heterólogo (es decir, que se origina a partir de otra fuente distinta a la hFSH) al polipéptido, o puede ser homólogo o heterólogo a la célula
25 huésped, es decir, que sea un péptido señal expresado normalmente por la célula huésped o uno que no sea expresado normalmente por la célula huésped.

Cualquier huésped excepto humano puede usarse para producir las subunidades de los polipéptidos de la invención, incluido bacterias, hongos (incluidas levaduras), planta, insecto, mamífero, u otras células de animal apropiadas o
30 líneas celulares, al igual que animales no humanos transgénicos o plantas. Los ejemplos de células huésped de mamíferos adecuadas incluyen líneas celulares del ovario del Hámster Chino (CHO), (p.ej. CHO-KL; ATCC CCL-61), líneas celulares del Mono Verde (COS) (p.ej. COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); células de ratón (p.ej. NSIO), líneas celulares de Riñón de Cría de Hámster (BI-EK) (p.ej. ATCC CRL-1632 ó ATCC CCL-10), y células humanas (p.ej. BEK 293 (ATCC CRL-1573)), así como células de plantas en cultivo tisular. Se conocen en la
35 técnica líneas celulares adecuadas adicionales y están disponibles en depósitos públicos tales como 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 DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas y vectores virales.

Las células se pueden cultivar en un medio nutriente adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matriz agitado, fermentación a
40 pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, discontinuas, de lote alimentado ("fed-batch") o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales, realizada en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten que el polipéptido sea expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles en los proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones
45 publicadas (p.ej. en los catálogos del American Type Culture Collection). Si el polipéptido es secretado en el medio nutriente, puede ser recuperado directamente del medio. Si el polipéptido no son secretados, puede recuperarse de los lisados celulares.

El polipéptido de la FSH mutante resultante puede ser recuperado por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede ser recuperado del medio nutriente por procedimientos convencionales que incluyen, pero no se
50 limitan a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. Los polipéptidos de la FSH mutante pueden purificarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (p.ej. de intercambio iónico, de afinidad, hidrófoba, cromatoenfoco y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p.ej. enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (p.ej. precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción.

55 La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende el mutante de la FSH de acuerdo con la invención. Tales composiciones farmacéuticas se pueden usar para estimular la foliculogénesis, por ejemplo junto con inducción de la ovulación o técnicas de reproducción asistida (TRA). Como el mutante de la FSH de la presente invención es particularmente eficaz para inducir que se desarrollen y maduren folículos múltiples, es particularmente adecuado para el uso en TRA, en las que se desean recoger oocitos múltiples.

Alternativamente, con ajuste cuidadoso de la dosis, el mutante de la FSH de la invención puede usarse para inducir mono-foliculogénesis para IO, o paucifoliculogénesis (hasta aproximadamente tres folículos) para IIU, para fertilización *in vivo*. La mono-foliculogénesis también se puede lograr con una dosis reducida del mutante de la FSH, o una dosificación menos frecuente en comparación con preparaciones de FSH convencionales. Por ejemplo, en IO, una preparación de FSH de la invención se puede administrar a 225-400 IU cada tres días, o dosis más bajas, dependiendo de la respuesta de la paciente. La respuesta de la paciente puede ser seguida por sonografía.

El mutante de la FSH de la invención se puede usar en un régimen de hiperestimulación ovárica controlada (HOC). Los regímenes convencionales para la HOC incluyen una fase de regulación en disminución en la cual la hormona luteinizante endógena (LH) está regulada en disminución mediante la administración de un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) seguido de una fase de estimulación en la cual se induce el desarrollo folicular (foliculogénesis) mediante la administración diaria de hormona estimuladora de los folículos (FSH), usualmente a aproximadamente 150-225 UI/día. Alternativamente, la estimulación se empieza con FSH después de una menstruación espontánea o inducida, seguido de la administración de un antagonista de la GnRH (típicamente empezando alrededor del día seis de la fase estimuladora). Cuando hay al menos 3 folículos > de 16 mm (uno de 18 mm), se da un único bolo de hCG (5-10.000 IU) para imitar el aumento natural de la LH e inducir la ovulación. La recuperación de oocitos se programa a las 36-38 horas después de la inyección de hCG.

El mutante de la FSH de la invención también se puede usar para IO e IIU. Por ejemplo, la estimulación de la FSH con una preparación de la invención se empieza después la menstruación espontánea o inducida, con una dosis diaria de 75-150 IU. Cuando 1 ó 3 folículos han alcanzado un diámetro de al menos 16 mm, se administra un únicos bolo de hCG para inducir la ovulación. La inseminación se realiza *in vivo*, por relaciones sexuales normales o IIU.

Como el mutante de la FSH de la presente invención puede tener una vida media aumentada con respecto a preparaciones de FSH naturales, regímenes tales como el descrito anteriormente pueden emplear dosis IU de FSH menores, y/o se pueden modificar disminuyendo el periodo de estimulación de la FSH, mientras que se consigue la misma o mejor respuesta, en términos de número y viabilidad de folículos. Por ejemplo, usando una preparación de la FSH de la invención, la foliculogénesis adecuada puede llevarse a cabo con dosis diarias de o aproximadamente 50-150 IU de FSH, preferentemente a o aproximadamente 50-100, más preferentemente a o aproximadamente 50-75 IU de FSH. La dosificación de la FSH es habitualmente diaria o semidiaria. El periodo de dosificación puede ser menor que o aproximadamente 14 días, preferentemente menos de o aproximadamente 12 días, más preferentemente menos de o aproximadamente 11 ó 10 días. Para IO, las preparaciones de mutante de la FSH de la invención puede administrarse a dosis de 25-150 IU de FSH/día, preferentemente, 50-125 IU de FSH/día. Para el tratamiento de la infertilidad masculina, se puede administrar una preparación de mutante de la FSH a 3 X 150 a 300 IU/semana hasta que la espermatogénesis alcance niveles adecuados para la inseminación, bien mediante relaciones sexuales normales o bien por técnicas TRA.

Ya que la vida media mayor de la FSH mutante de la presente invención, puede administrarse en una preparación de acción prolongada. La FSH convencional se puede administrar a o aproximadamente 300 IU en cada segundo día, mientras que se consiguen similares resultados a la administración cada día a o aproximadamente 150 IU. La expresión "acción prolongada" significa que engloba preparaciones de FSH que se pueden administrar menos frecuentemente de cada dos días. La FSH mutante de la presente invención puede administrarse cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días o cada siete días, mientras se consiguen resultados similares o mejores que la administración diaria o convencional de FSH.

En un aspecto relacionado, el mutante de la FSH o composiciones farmacéuticas que comprenden el mutante de la FSH se usan para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o estados. En otro aspecto, el polipéptido o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es para uso en un método para el tratamiento de un mamífero, en particular un ser humano, que comprende administrar al mamífero necesitado de ello tal polipéptido o composición farmacéutica.

Será evidente para los expertos en la técnica que una cantidad eficaz de un polipéptido, preparación o composición de la invención depende, entre otros, de la enfermedad, la dosis, el programa de administración, de si el polipéptido o preparación o composición se administra solo o junto con otros agentes terapéuticos, la vida media en suero de las composiciones, y la salud general del paciente. Típicamente, una dosis eficaz de la preparación o composición de la invención es suficiente para asegurar un efecto terapéutico.

El mutante de la FSH de la presente invención se puede administrar en una composición que incluye uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. "Farmacéuticamente aceptable" significa un vehículo o excipiente que no causa ningún efecto indeseado en los pacientes a los que se administra. Tales vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica, y el polipéptido de la invención se puede formular en composiciones farmacéuticas por métodos bien conocidos (véase, p.ej. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª 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, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)). Los excipientes farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en composiciones que comprenden el polipéptido de la invención incluyen, por ejemplo, agentes reguladores del pH, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicantes,

tensioactivos no iónicos o detergentes, ("agentes humectantes"), antioxidantes, agentes que aumentan el volumen o cargas, agentes quelantes y codisolventes.

5 La composición farmacéutica de la invención que comprende el mutante de la FSH se puede formular en diversas formas, que incluyen líquidos, p.ej. soluciones o suspensiones listas para el uso, geles, liofilizados o cualquier otra forma adecuada, p.ej. polvo o cristales adecuados para preparar una solución. La forma de la composición puede depender de la indicación particular que se trata y será evidente para un experto en la técnica.

10 La composición farmacéutica que comprende el mutante de la FSH de la invención se puede administrar por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, sublingual, bucal, intranasal, transdérmica, por inhalación o de cualquier otra manera aceptable, p.ej. usando tecnología PowderJect o ProLease o un sistema de inyección de tipo bolígrafo. El modo de administración puede depender de la indicación particular que se trata y será evidente para un experto en la técnica. La composición se puede administrar por vía subcutánea, lo que puede permitir al paciente realizar una autoadministración.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar junto con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden incorporar como parte de la misma composición farmacéutica o se pueden administrar de manera separada del polipéptido de la invención, bien al mismo tiempo o bien de acuerdo con cualquier otro programa de tratamiento aceptable. Además, el polipéptido, preparación o composición farmacéutica de la invención se puede usar como un adjunto a otras terapias.

La presente invención tiene múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

20 Mutantes de la FSH únicos

Identificación de sitios de Glicosilación del Candidato

25 La estructura cristalográfica 3D de la FSH humana se usó para identificar sitios de glicosilación del candidato en las subunidades α y β de FSH. Están presentes dos moléculas de FSH (cuatro subunidades) en cada unidad asimétrica de la estructura cristalina. Las dos moléculas de FSH fueron superpuestas y comparadas, siendo cada residuo inspeccionado visualmente para identificar sitios de N-glicosilación potenciales.

La estructura cristalográfica de la FSH fue combinada con el conocimiento de la interacción FSH/receptor FSHR para ayudar adicionalmente en la selección de sitios de N-glicosilación potenciales. Los criterios de diseño principales fueron la mínima alteración de la estructura 3D, la mínima alteración de sitios de unión y activación predichos, y una estructura 3D predecible compatible con la glicosilación.

30 Basándose en los criterios anteriores, se prepararon veinte mutantes únicos (8α y 12β) en la secuencia de aminoácidos de la FSH que incluye los dos mutantes siguientes:

subunidad α	H83N
subunidad β	E55N/V57T

Expresión transitoria de Mutantes de la FSH únicos

35 Cada uno de los mutantes se obtuvo llevando a cabo una mutagénesis dirigida al sitio de manera similar a la descrita en el Ejemplo 3. Los mutantes se expresaron transitoriamente a pequeña escala en células CHO-Dukx junto con la subunidad natural complementariamente de manera similar a la descrita en el Ejemplo 4. El análisis por ELISA de los sobrenadantes de los cultivos resultantes indicaba que 19 de los 20 mutantes podían ser expresados transitoriamente. El intervalo de los niveles de expresión transitoria de los controles y mutantes fue 0 – 1,95 $\mu\text{g/ml}$ con la media 0,59 y mediana 0,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, y 0 $\mu\text{g/ml}$ confirmada repetidamente en transfecciones con plásmido.

40 Análisis morfológico de mutantes de FSH únicos

45 Se analizaron electroforéticamente alícuotas de los sobrenadantes de cultivos concentrados de expresión transitoria de mutantes de FSH únicos bajo condiciones LDS PAGE no reducidas que permitieron la resolución de heterodímeros de FSH intactos de subunidades α y β libres. Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana PVDF y se analizaron usando anticuerpos primarios directo contra las subunidades α y β de FSH. Se ensayaron un número de anticuerpos primarios de diferentes vendedores en un ensayo preliminar y ocasionalmente se usaron a partir de entonces como análisis de confirmación pero los anticuerpos primarios útiles más uniformes demostraron ser Chromaprobe BHS 104 (subunidad α de la anti FSH de cabra policlonal biotinilada) a 1,5 $\mu\text{g/ml}$ y Chromaprobe BHS 105 (subunidad β - de la anti FSH monoclonal murino) a 1,5 $\mu\text{g/ml}$.

Dos tipos adicionales de análisis morfológicos complementaron las pruebas por Western blots de las muestras de heterodímero intacto. El análisis Western de las muestras de heterodímero disociado y autoradiografía de precipitados inmunes de heterodímero disociado separado electroforéticamente de mutantes y controles fueron marcados metabólicamente con ^{35}S -Cys.

5 De los 19 mutantes de la FSH expresables, solamente cinco mutantes mostraron una glicosilación incrementada tal como se evidencia por el desplazamiento de la distribución del peso molecular aparente de la subunidad o heterodímero. Los cinco mutantes que mostraron una glicosilación incrementada incluían un mutante de la subunidad α y mutantes de la subunidad β , incluido β E55N/V57T.

10 De manera interesante, el mutante de la subunidad α α H83N no mostró evidencia de una glicosilación incrementada si no que parecía llevar a una abundancia incrementada del heterodímero en la población de proteína relativa a la abundancia de heterodímero entre las subunidades de la FSH natural coexpresada bajo las mismas condiciones transitorias.

Vida media de los Mutantes de la FSH únicos expresados transitoriamente

15 Las farmacocinéticas de los cinco mutantes únicos hiperglicosilados obtenidos por expresión transitoria, incluido β E55N/V57T, se compararon con Gonal-F. La Gonal-F es una forma recombinante de la FSH que es indistinguible de la nativa hFSH. El contenido de FSH del material de inyección y de las muestras de suero de rata recogidos a tiempos programados siguiendo la inyección de cada experimento de PK se cuantificó mediante ELISA. Ninguno de los 5 mutantes únicos, incluido el mutante de la subunidad β E55N/V57T, demostró una vida media mayor que el control Gonal-F.

20 Purificación y Análisis de Mutantes de Glicosilación en sitio único

25 Tres de los cuatro mutantes únicos de la subunidad β hiperglicosilados, incluido el mutante E55N/V57T, fueron expresados y purificados mediante cromatografía de inmunoafinidad. La actividad *in vitro* de los tres mutantes de la subunidad β hiperglicosilados, incluido el mutante E55N/V57T, se comparó con la FSH recombinante mirando (i) la habilidad para competir con la FSH radiomarcada con ^{125}I para unirse a una membrana, conteniendo las preparaciones el receptor de la FSH humana (K_i) y la habilidad para estimular la producción de cAMP acoplada a FSHR (EC_{50}):

	K_i	EC_{50}
β E55N/V57T	$8,6 \times 10^{-10} \text{ M}$	$3,9 \times 10^{-11} \text{ M}$
rhFSH	$4,8 \times 10^{-10} \text{ M}$	$1,2 \times 10^{-11} \text{ M}$

30 Los resultados anteriores muestran que el mutante de la subunidad β E55N/V57T tenía una actividad *in vitro* actividad comparable a la de la FSH natural. De hecho, cada uno de los tres mutantes únicos de la subunidad β tenían una actividad *in vitro* comparable a la de la FSH natural. Además, el análisis por espectrometría de masas de los mutantes únicos de subunidad β purificados indicaban que los desplazamientos en la distribución se veía para cada uno de los tres mutantes. Sin embargo, ningún mutante oglicosilación demostró una vida media sustancialmente prolongada cuando las farmacocinéticas de las proteínas purificadas fueron determinadas después de una inyección única iv de ratas hembras inmaduras. Comparado con rhFSH que tiene una vida media de $3,8 \pm 0,6 \text{ h}$, β E55N/V57T
35 tiene una vida media de $4,8 \pm 0,4$.

Ejemplo 2

Producción y análisis de Mutantes de Glicosilación dobles

40 Debido al fracaso de los mutantes únicos de la subunidad α y β para mejorar la vida media de la FSH, dos de los mutantes únicos de la subunidad α se combinaron con tres únicos de las subunidades β en una expresión transitoria para crear seis mutantes dobles diferentes incluido GM-1, que comprende el mutante de la subunidad α H83N y el mutante de la subunidad β E55N/V57T.

45 Cinco de los seis mutantes dobles, incluido GM-1, fueron capaces de expresarse. Los cinco mutantes dobles expresables fueron analizados para la habilidad para estimular la producción de cAMP acoplada a FSHR. Cada uno de los cinco mutantes dobles, incluido GM-1, fueron comparables con la rhFSH en la habilidad para estimular la producción de cAMP acoplada a FSHR *in vivo*.

Las farmacocinéticas de los mismos cinco mutantes dobles de la FSH fueron comparados también con la hFSH recombinante y CTP-FSH. Los resultados de la Tabla 1 indican que GM-1 tiene una vida media significativamente mayor que rhFSH y acercándose a la de CTP-FSH.

Tabla 1-Farmacocinéticas

Proteína	t _{1/2} (h)
rhFSH	3,4 ± 0,5
CTP-FSH	7,6 ± 2,6
GM-1	5,1 ± 1,6

La vida media incrementada de GM-1 es sorprendente considerando que el mutante único de la subunidad β E55N/V57T por sí mismo no tiene efecto sobre la vida media. Adicionalmente sorprendente es la vida media incrementada de GM-1 considerando que el mutante de la subunidad α H83N no lleva a una glicosilación incrementada.

Ejemplo 3

Producción de GM-1

Los cADNs de las subunidades α y β de la FSH humana fueron subclonados en el vector pDONR (Invitrogen). Se usó el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) para introducir los sitios de glicosilación N-unidos en las subunidades α y β de FSH. El sistema QuikChange™ utiliza dos cebadores oligonucleótidos sintéticos que contienen la(s) mutación(es) deseadas(s). Los siguientes pares de oligonucleótidos se usaron para introducir sitios de glicosilación N-unidos:

Tabla 2-oligonucleótidos

Subunidad	Mutación	Oligo	SEC ID NO:
α	H83N	cacacggcgtgcaactgcagtacttg	SEQ ID NO. 5
α	H83N	caagtactgcagttgcacgccgtgtg	SEQ ID NO. 8
β	E55N, V57T	cactctcactgtttcatatgtcaggttctgaaggtacatgtttctg	SEQ ID NO. 7
β	ESSN, V57T	cagaaaacatgtacctcaagaacctgacatgaaacagteagagtg	SEQ ID NO. 8

La secuencia de los mutantes se confirmó con el uso del kit ABI PRISM BigDye™ Terminator v3. 0 Ready Reaction Cycle Sequencing seguido del análisis con el Analizador Genético ABI PRISM 310 .

Los mutantes α H83N y β E55/V57T fueron subclonados en un vector de expresión pCI modificado usando la tecnología de clonaje Gateway™ (Invitrogen) para dar los plásmidos p13251 y p13252, como se muestra en las Figuras 1 y 2. El vector de expresión pCI de mamífero (Promega) se convirtió previamente en un vector de destino GATEWAY al usar el Sistema de Conversión de Vector GATEWAY (Invitrogen). El vector de expresión pCI contiene el intensificador/promotor precoz citomegalovirus para regular la expresión del gen insertado, un intrón corriente arriba del gen para promover la expresión y la señal de poliadenilación tardía del virus de simio 40 corriente abajo del gen insertado para terminar la transcripción.

El mutante α H83N también se subclonó en el vector D α para dar el plásmido p13538, tal como muestra la Figura 3. El vector D α es un derivado de pCLH3AXSV2DHFR. El vector fue modificado para incluir un intrón heterólogo con un dador de empalme sintético creado por ingeniería genética corriente arriba del fragmento 2 kb XbaI-PstI a partir del intrón A del gen de la subunidad α de la gonadotropina (que contiene un aceptor de empalme). El intrón heterólogo se sitúa entre el promotor y el sitio de clonaje XhoI, que se sitúa en la región no traducida 5' del transcrito de ARN . El vector D α ha sido descrito en más detalle por Kelton et al., *Mol Cell Endocrinol* 89 : 141-151 (1992).

Ejemplo 4

Expresión del Mutante FSH

El mutante de glicosilación GM-1 de la FSH se obtuvo primero ("GM-1 Lot 1") por cotransfección de p13251 (α H83N) y p13251 (β E551V57T) para conseguir la expresión transitoriamente de la gonadotropina en el medio de cultivo libre de suero. Para la transfección por medio de lipofectamina a gran escala (frascos 12-24 T175) se cultivaron células CHO-Dukx a $1,3 \times 10^7$ células/frasco en medio de crecimiento (MEM a(+), 10% de FBS, 1% de l-glutamina) 18-24 h antes de transfección. Para transfectar las células se preparó una mezcla de lipofectamina 2000/Optimem en

grandes cantidades (una parte en 17,6) y se preparó también una reserva aparte de ADN en Optimem usando la fórmula 33 mcg de ADN por cada subunidad (66 mcg en total) por frasco T175. Veinte minutos después de combinar las preparaciones Optimem/ADN y Optimem/Lipofectamina los complejos de ADN/Lipofectamina en Optimem se aplicaron (~10ml/frasco) a monocapas de células recién alimentadas (43,8 ml/frasco). Después de cuatro a seis horas a 37° las monocapas de células fueron alimentadas con 50 ml de medio de crecimiento. Aproximadamente 24h después de la transfección las células fueron transferidas al medio de producción (Sigma CHO PFM suplementado con L-Glutamina o la formulación propiedad de Serono Sigma CHO PFM C0234). El medio de producción acondicionado fue recogido 48 h más tarde.

Ejemplo 5

10 Clones de Mutante de FSH

Protocolones

La co-transfección con fosfato de calcio de células CHO-DUKX con α H83N en D α (plásmido #13538) y β E55N/V57T en pClattR (plásmido #13252) a una relación de 1:3 se llevó a cabo usando metodologías estándar. Los protocolones se generaron 48h después de la transfección al sembrar células en medio de selección (MEM α (-), 10% de FBS, L-glutamina 4 mM) a 10 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos (Total 1596 pocillos). Después de aproximadamente 2 semanas, los protocolones se dividieron 1:8 en un medio de selección que contenía MTX 0,02 μ M. Este proceso de división se repitió para escalando concentraciones de MTX (0,1 μ M (192 pocillos), 0,5 μ M, 1,0 μ M (116 pocillos) a lo largo de 6-8 semanas con 116 protocolones que sobrevivían en MTX 1,0 μ M.

Los 116 protocolones fueron evaluados mediante expresión por DSL ELISA al usar muestras de expresión a las 24h de placas de 96 pocillos (en MTX 1,0 μ M y 10% de FBS). Los niveles de expresión estaban en el intervalo fuera de escala por debajo de 3,72 μ g/ml. Los diez y siete protocolones de expresión más altos fueron expandidos a placas de 24 pocillos, a un frasco T25, y luego se criopreservó un set de 3 viales de cada uno. Los dos protocolones superiores fueron descongelados y expandidos para confirmar la expresión a la escala T25. GM1-21 y GM1-22 tenían productividades volumétricas de 1,74 y 0,74 μ g/ml, respectivamente con productividades específicas de 5,06 y 1,28 pcd, respectivamente. Basándose en estos resultados, se eligió GM1-21 para clonar y producir el segundo lote de GM-1 en frascos rotativos tal como se describe en el Ejemplo 6.

Clones

El clonaje por dilución limitante se inició al inocular placas de 96 pocillos con 0,25, 0,5, 1,0, y 2,0 GM-1-21 células/pocillo, respectivamente. El medio de clonaje fue DMEM/F12 que contenía 10% de cFBS y 1% de L-glutamina en ausencia de MTX. Se examinaron todos los pocillos al microscopio y cualquier pocillo que contenía múltiples células fue eliminado.

Después de crecimiento de aproximadamente 2 semanas, las poblaciones de células fueron expandidas a 24 pocillos y, eventualmente, frascos T25. Una vez las células alcanzaron 80-100% de confluencia, se determinaron las productividades volumétricas usando DSL FSH ELISA (las muestras contenían 10% de FBS). Los 8 mejores clones fueron expandidos a frascos T75 para determinar la expresión volumétrica y específica a las 24. Un set de 3 viales de cada clon fue criopreservado en DMEM/F12 que contenía 10% de cFBS, 1% de L-glutamina, y 10% de DMSO. CHO-B1-GM1-21-98 demostró productividad volumétrica, 7,21 μ g/ml con productividad específica de 6,25 pcd. En contraste, CHO-B1-GM1-21-107 demostró la productividad específica más alta, 7,71 pcd, junto con 5,81 μ g/ml de productividad volumétrica.

CHO-B1-GM1-21-98 y CHO-B1-GM1-21-107 fueron expandidos a cuatro frascos T175. A aproximadamente 90% de confluencia, un pre-MCB (25 viales de cada clon) fue criopreservado en DMEM/F12 que contenía 10% de FBS, 1% de L-glutamina, y 10% de DMSO. GM1-21-98 (pasada 7) contenía 3,26 millones de células por vial y GM1-07 (pasada 6) contenía 6,1 millones de células por vial. Un vial de cada banco se envió a los Laboratorios Charles River (Malvern, PA) para ensayo GMP. Los ensayos incluían Micoplasma por PTC, esterilidad, ensayo de Producción de Anticuerpos de Ratón (MAP) con infección de LCMV, ensayo HAP, ensayo *in vitro* de inducción para virus de la leucemia murina xenotrópico, ensayo extendido en placa XC para el Virus de la Leucemia Murina, y Análisis de Isoenzimas, pasando por todos los ensayos.

Ejemplo 6

Expresión Adicional de FSH Mutante

Se produjo GM-1 al crecer Protoclon GM1-21 descrito en el Ejemplo 5 en dos botellas rotativas de 850 cm² ("GM-1 Lot 2"). El volumen del medio de producción libre de suero (DMEM-F12 + IFCS) acondicionado en este experimento fue de 2600 ml. Una pequeña cantidad (13 mls de sobrenadante de cultivo concentrado que contenía 0,2 mg de GM-1 que permanecía almacenado a -80C en SRBI ya que una alícuota de 36 ml del sobrenadante de cultivo concentrado se perdió durante una transferencia de diálisis. La cuantificación fue por DSL Active[®] FSH ELISA usando la conversión 1IU = 138 ng FSH.

Ejemplo 7**Purificación de FSH Mutante**

Preparación de la Muestra

5 El medio de producción que contenía la FSH mutante fue recogida y filtrada usando unidades de filtro de 0,22 μm y congelado a -70°C . Las proteínas diana en el medio fueron descongeladas durante toda la noche a 4°C , y se concentraron por ultrafiltración usando un aparato Ultrasette Screen Channel TFF, membrana 10 K Omega, P/N 0S010C70, de Pall Life Science. Se recuperó el retenido y se dializó durante toda la noche versus versus Tris 0,1 M, pH 7,4 containing NaCl 0,5 M, 3 X 5 Litros. La proteína dializada se recuperó, se filtró sobre 0,22 μm , y se purificó inmediatamente o almacenó a -70°C hasta purificación.

10 Purificación por Inmunofinidad

15 El mutante de glicosilación GM-1 se purificó por resina B5 de inmunofinidad anti FSH (Serobio) que contenía 2,2 mg de anticuerpo anti-FSH por ml de resina. Se preparó un volumen de columna de 10,2 ml en una columna OmniFit de 1,5cm X 10cm. La resina se estabilizó previamente con Tris 0,1 M, pH 7,4 que contenía NaCl 0,5 M. El crudo de proteína dializada se cargó a un ml/min. La columna se lavó secuencialmente con los volúmenes de cinco columnas de Tris 0,1 M, pH 7,4 que contenía NaCl 0,5 M, volúmenes de cinco columnas de bicarbonato amónico 100 mM, pH 7,6, y la proteína diana se eluyó con el volúmenes de 18-20 columnas de NH_4OH 1 M. Las fracciones que contenían la proteína eluida se juntaron, se neutralizaron con ácido acético glacial, y se concentraron por ultrafiltración con un aparato de células agitadas Amicon usando una membrana Amicon YM 10. El retenido se dializó en "Pierce Snakeskin dialysis tubing", 10 K MWCO, versus 4 X 5 litros de agua durante 24 horas. La proteína dializada se recuperó y se concentró mediante Centriprep YM 10 hasta disminuir el volumen hasta aproximadamente un ml.

Caracterización

25 La recuperación aparente de la proteína purificada GM-1 a través de este procedimiento de inmunofinidad de una sola etapa es 31,4-52,9% a 73,8 a 80,6% de pureza del heterodímero con una concentración de proteína determinada mediante análisis de la composición de aminoácidos y peso molecular originalmente estimado en 35,000 Da de la distribución de la glicofoma por MALDI-TOF de las subunidades.

30 La identidad de la proteína se confirmó por secuenciación de péptido N-terminal. Todas las secuencias N-terminal que podrían ser identificadas en GM-1 reflejan términos bien de la subunidad α o bien de la subunidad β de FSH. Aunque la identidad de una banda única de proteína con baja abundancia visible mediante tinción con plata no podría quedar establecida, los datos serían consistentes con $\geq 80\%$ de pureza de la subunidad.

Ejemplo 8**Morfología de FSH Mutante**

35 Parar determinar la distribución de la glicofoma de la proteína purificada, se llevó a cabo espectrometría de masas MALDI-TOF de GM-1 y Gonal-F. El análisis del espectro de masas mostrado en la Figura 4A muestra un incremento del 26% en abundancia relativa de las clases de masas que contienen formas hiperglicosiladas en GM-1 relativo a Gonal-F donde contienen 36,8% de las glicofomas de la subunidad totales frente al 29,2% de las glicofomas de la subunidad en Gonal-F. La diferencia entre los espectros de masas MALDI-TOF de Gonal F y GM-1 es consistente con los desplazamientos en las distribuciones de peso molecular aparente de la subunidad y heterodímero vistos con tinción con plata para gel de poliacrilamida (PAGE) y western blotting (Figura 4B).

40 Bajo las condiciones de espectrometría de masas MALDI-TOF GM-1 parece mantener preferentemente la conformación de heterodímero $\alpha\beta$ en la Figura 4C, en contraste con la distribución aleatoria de los dímeros $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ y $\beta\beta$ mostrados para Gonal F. Esto sugiere que GM-1 se disocia menos que Gonal-F bajo las condiciones de preparación de muestras para MALDI-TOF y es consistente con atribuir la posibilidad de una estabilidad cinética y termodinámica mayor que el heterodímero GM-1. Se calculó un modelo de glicosilación de GM-1 como la distribución binomial de ocupación aleatoria de seis sitios por glicofomas bianterias, fucosiladas, disialiladas sin clases para subunidades no totalmente glicosiladas y se comparó con el espectro de masas observado. Los resultados indican una ocupación mayor que la predicha (0,021, vs 0,0) de la clase extrema ($\alpha 0$), menor ocupación (0,095 vs 0,214) ocupación de la clase ($\alpha 1$ ó $\beta 0$), mayor ocupación (0,516 vs 0,428) de la clase ($\alpha 2$ ó $\beta 1$), mayor ocupación (0,312 vs 0,285) de la clase ($\alpha 3$ ó $\beta 2$) y menos ocupación (0,056 vs 0,071) de la clase $\beta 3$.

50 **Ejemplo 9****Análisis de FSH Mutante**Unión *In Vitro* de FSH Mutante

La eficacia de GM-1 Lot 1 y GM-1 Lots 2 se determinó en un ensayo cAMP/FSHR. Los lotes grandes de líneas celulares CHO que expresan de forma recombinante el receptor humano de FSH o receptor de LH humano se hicieron crecer y se alteraron por cavitación con nitrógeno (equilibrado de 20 min a 900 psi, seguido de rápida liberación de presión) en Tris 0,025 M pH 7,4 que contenía sacarosa 0,25 M, $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 1 mM y una parte por mil de cóctel de Inhibidores de Proteasa de Sigma (p8350). Siguiendo a la clarificación previa (10 min x 1000 x g a 4°C) la fracción de membranas fue preformada (60 min x 100,000 x g x 4°C) por ultracentrifugación. La fracción de membranas se resuspendió en tampón de unión (Tris 0,01 M pH 7,4 que contenía $MgCl_2$ 5 mM), se estimó la concentración de proteína por análisis Bradford de la proteína (BioRad) y se almacenó congelada a -80°C para un futuro uso. Típicamente se analizaron apropiadamente 15 µg de proteína de membrana con FSHR o LHR marcada, por pocillo, en ensayos de competición.

La unión a radioligandos fue evaluada en placas de 96 pocillos, 100 µl/muestra pocillo. El tampón de ensayo fue Tris 0,01 M pH 7,4 que contenía $MgCl_2$ 5 mM y BSA 0,1% y ^{125}I -hCG 0,3 nM (para LHR) o ^{125}I -FSH 0,4 nM (para FSHR). La GM-1 competitiva se diluyó con tampón de ensayo y se mezcló con ligando radiomarcado antes de la adición de las membranas con el receptor marcado. La unión no específica se determinó en presencia de hCG o FSH 500 nM no marcada. Se dejó estabilizar la unión durante 90 min a 37°C con agitación. Los ensayos de unión se terminaron con la filtración a través de una membrana durapore de baja asociación con proteínas (Millipore Multiscreen) preincubada en tampón de ensayo. Los pocillos filtrados se lavaron tres veces con tampón de unión enfriado con hielo (tampón de ensayo libre de BSA), se secaron, y se extrajeron. La radioactividad unida se midió en un contador gamma HP Cobra II usando una ventana de detección pre-programada específica de emisión de ^{125}I . Los datos se analizaron usando un modelo de sitio único y el programa informático Graph Pad Prism.

Función *In Vitro* de la FSH Mutante

La función de GM-1 Lot 1 y GM-1 Lot 2 se determinó midiendo las curvas de respuesta de dosis de la producción de cAMP en las células CHO transfectadas con el receptor de gonadotropina descrito anteriormente. Los datos de cualificación sacados para los dos lotes de cada proteína llevada se recogen en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3 - Función *in vitro* y características de unión al receptor de GM-1

Proteína/Lote	CE ₅₀ de FSHR	K _i de FSHR
GM-1/1	61,2 ± 4,5 x 10 ⁻¹² M	1,9 ± 0,3x 10 ⁻⁹ M
GM-1/2	20,9 ± 2,0 x 10 ⁻¹² M	2,3 ± 0,6 x 10 ⁻⁹ M

Ejemplo 10

Estabilidad de FSH Mutante

Se llevó a cabo un estudio de estabilidad a tres meses de bioactividad de GM-1 manteniendo una alícuota estéril de GM-1 a 4°C durante tres meses. El GM-1 en esta alícuota fue muestreada y se ensayó en el ensayo FSHR cAMP a tiempo cero, siete días, 32 días y 91 días. Bajo las condiciones de este estudio la CE₅₀ de GM-1 cambió menos del doble durante 91 días de almacenamiento a 4°C. Estos datos indican que la bioactividad de GM-1 almacenada a 4°C es estable hasta tres meses.

Ejemplo 11

Actividad de FSH Mutante

La Figura 5 muestra la eficacia de GM-1 en el modelo de inducción de ovulación de dos días en rata inmadura. Administrada como única dosis, la hFSH recombinante falló en provocar una respuesta ovulatoria mientras GM-1 fue capaz de hacerlo. Además, la eficacia de GM-1 en el ensayo estándar de Steel-man Pohley de ganancia de peso ovárica fue comparable al de Gonal-F (datos no mostrados).

Las dosis ensayadas en la Figura 5 corresponden a 6, 12 y 24 IU de FSH. Cuando se ensayó FSH-CTP (Organon 36286) en este modelo a una dosis única, 10 IU, con un régimen de tres dosis (4x 25%, 2 x 50% y 1 x 100%) la media de números de ovarios observada por animal fue de 16,3 ± 3,8, 19, 1 ± 3, 6 y 21,5 ± 3,9, respectivamente (datos no mostrados). De los datos anteriores 12 IU de GM-1 administrada 1 x 100% provocó la respuesta ovulatoria media 9,4 ± 2,1 ova por animal (6,8 ± 1,6 ova/animal a 6 IU y 14,6 ± 3, 6 ova/animal a 24 IU). Los datos son consistentes con la posibilidad de que GM-1 puede ser más respetuoso de "mono-ovulación" o más controlable por manipulación del régimen de dosis.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Garone, Louise
 Arkinstall, Steven
 Brondyk, William
 5 Campbell, Robert
 Jiang, Xuliang
 McKenna, Sean
 Tepper, Mark
 <120> Mutante de Glicosilación de FSH
 10 <130> 05558.00003.00PC00
 <160 > 8
 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 <211 > 92
 15 <212 > PRT
 <213 > Homo 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
 20 <211 > 111
 <212 > PRT
 <213 > Homo sapiens

ES 2 367 784 T3

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

<210> 4

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223>mutante de la subunidad beta E55N/V57T

10

<400> 4

ES 2 367 784 T3

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 > 5

<211 > 26

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> mutagénesis oligo 1 para alfa H83N

10 <400 > 5

cacacggcgt gcaactgcag tacttg

26

<210 > 6

<211 > 26

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> mutagénesis oligo 2 para alfa H83N

20 <400 > 6

caagtactgc agttgcacgc cgtgtg

26

<210 > 7

<211 > 49

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> mutagénesis oligo 1 para beta E55N/V57T

10

<400 > 7

gcactctcac tgtttcatat gtcaggttct tgaaggtaca tgttttctg

49

<210 > 8

15 <211 > 49

<212> ADN

<13> Artificial

<220>

20 <223> mutagénesis oligo 2 para beta E55N/V57T

<400 > 8

cagaaaacat gtaccttcaa gaacctgaca tatgaaacag tgagagtgc

49

25

REIVINDICACIONES

1. Una FSH recombinante, en la que la subunidad alfa de la FSH comprende la secuencia de SEQ ID NO:3 y en la que la subunidad beta de FSH comprende la secuencia de SEQ ID NO:4.
2. La FSH recombinante de la reivindicación 1, en la que N55 de la subunidad beta está glicosilada.
- 5 3. Un vector que codifica la subunidad alfa de la FSH que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y una subunidad beta de la FSH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:4.
4. El vector de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho vector es un vector de expresión.
5. Una célula aislada que comprende el vector de la reivindicación 4.
- 10 6. Una célula aislada que comprende un primer vector que comprende ADN que codifica una subunidad alfa de la FSH que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 3 y un segundo vector que comprende ADN que codifica una subunidad beta de la FSH que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 4.
7. La célula de la reivindicación 6, en la que el primer y segundo vectores son vectores de expresión.
8. La célula de la reivindicación 7, en la que la célula es una célula de mamífero.
9. Un método para producir un mutante de la FSH que comprende:
15 (a) proporcionar células de mamífero, en las que las células comprenden un primer vector de expresión y un segundo vector de expresión; y
(b) inducir la expresión del mutante de la FSH, en el que el primer vector de expresión codifica la subunidad alfa de la FSH que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 3 y en el que el segundo vector de expresión codifica la subunidad beta de la FSH que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 4. en el que las células son capaces de
20 glicosilar proteínas.
10. Una composición que comprende la FSH recombinante de la reivindicación 1 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. Un mutante de la FSH recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en un método para tratar un animal infértil.
- 25 12. Un mutante de la FSH recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en un método para estimular la foliculogénesis en un mamífero.
13. Un mutante de la FSH recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en un método para inducir la hiperestimulación ovárica en un mamífero.

FIGURA 1

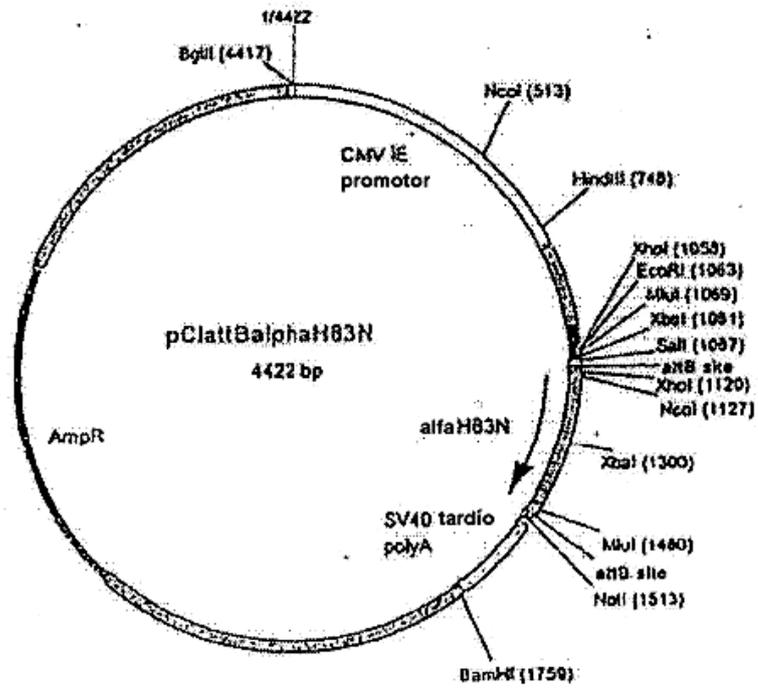


FIGURA 2

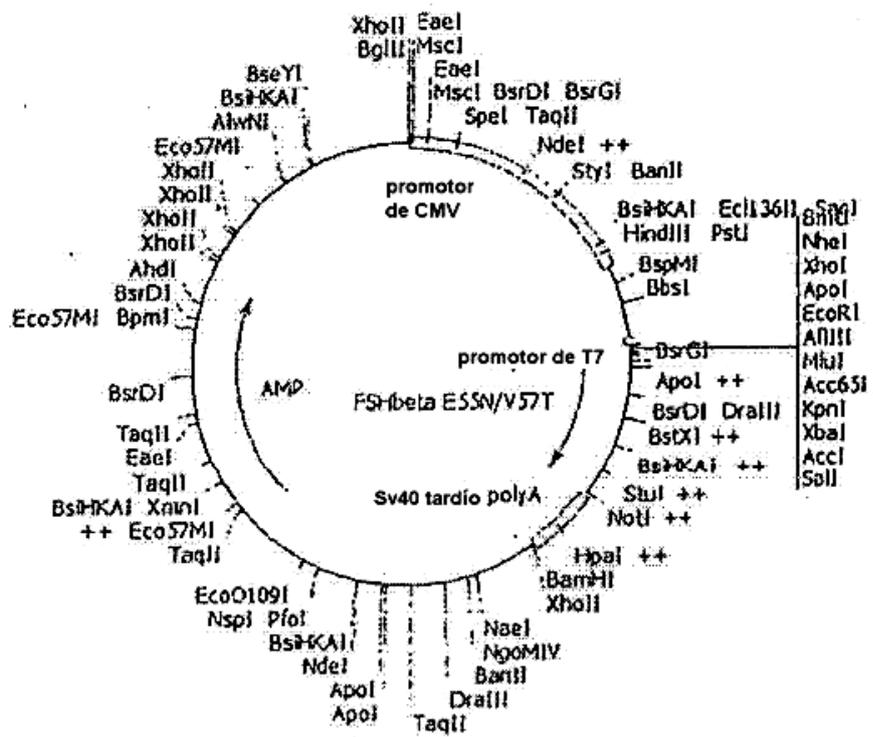


FIGURA 3

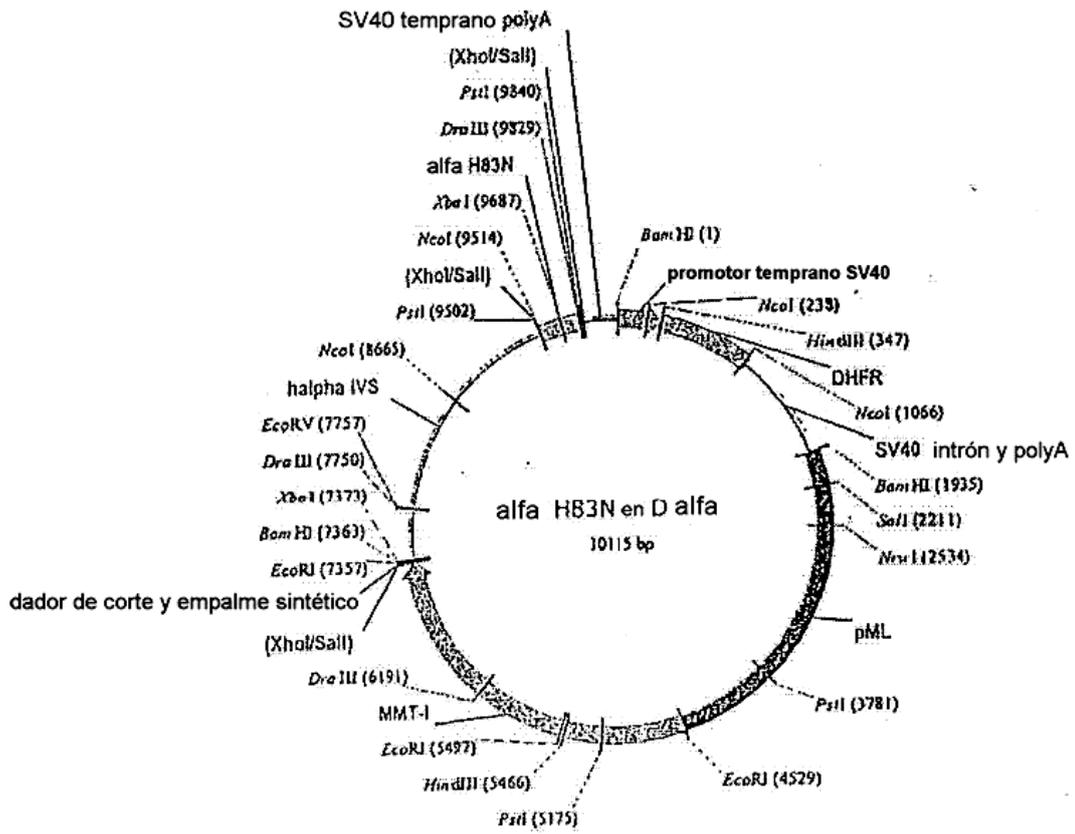


FIGURA 4

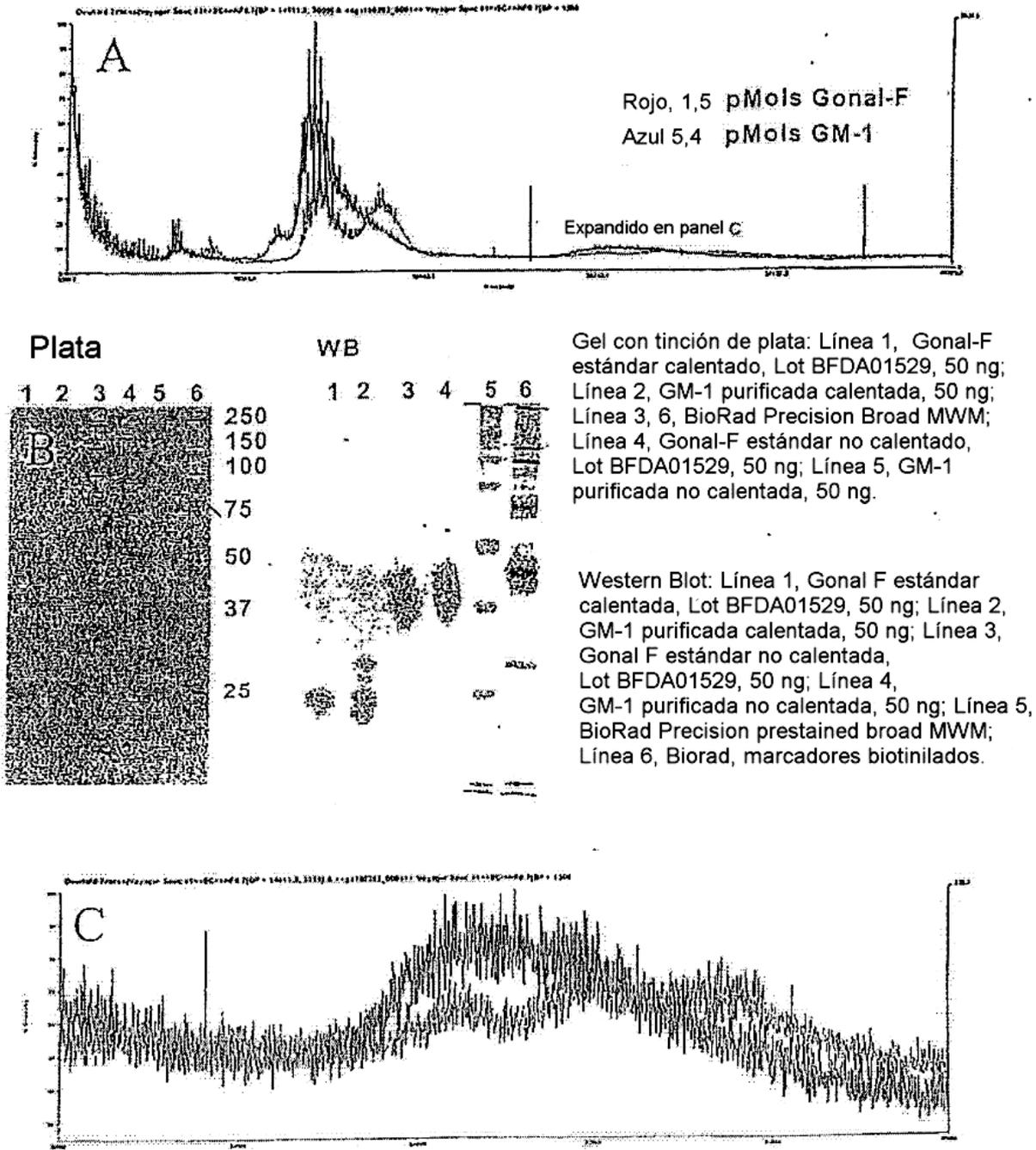
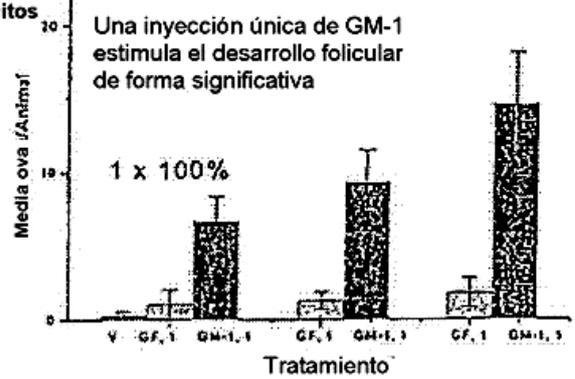
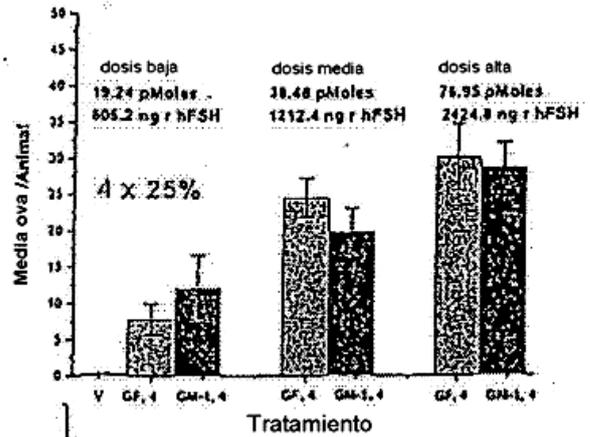
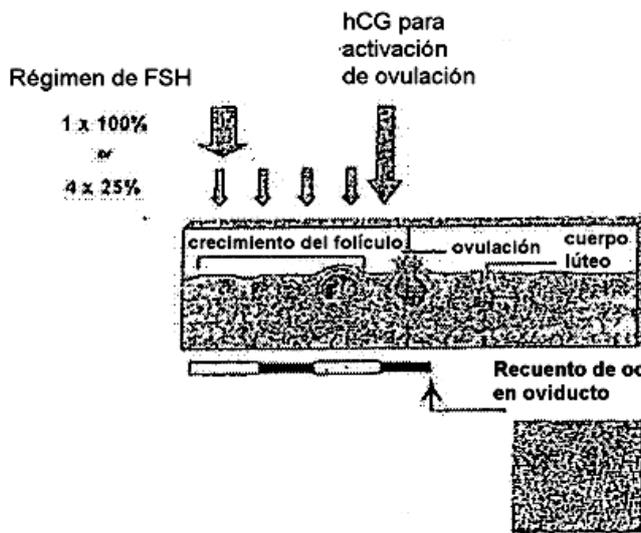


FIGURA 5



Nota diferencia de escala del eje y entre diagramas de barra de 4 x 25% y 1 x 100%