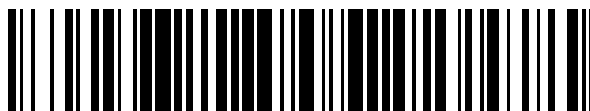


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 875**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/59** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06764058 .1**  
96 Fecha de presentación: **04.07.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1899454**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **Medio de cultivo exento de suero para la producción de gonadotropinas recombinantes**

30 Prioridad:  
**05.07.2005 EP 05106060**  
**06.07.2005 US 697077 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.10.2012**

73 Titular/es:  
**ARES TRADING S.A.**  
**ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ**  
**1170 AUBONNE, CH**

72 Inventor/es:  
**FONTA, Jean-Pierre;**  
**DUCOMMUN, Paul y**  
**DEPARIS, Véronique**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 388 875 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**

Medio de cultivo exento de suero para la producción de gonadotropinas recombinantes.

CAMPO DEL INVENTO

5 El presente invento está en el campo de la fabricación de proteínas recombinantes. Más específicamente, se refiere al uso de un medio de cultivo exento de suero, que comprende un antioxidante para reducir el nivel de formas oxidadas de gonadotropinas dímeras recombinantes durante el proceso de su fabricación. El antioxidante puede ser seleccionado del grupo que consiste en L-glutati3n, 2-mercaptoetanol, L-metionina y una combinaci3n de 3cido asc3rbico y (+)-alfa-tocoferol.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

10 EL presente invento se refiere a la producci3n de una hormona estimulante del fol3culo (FSH; del ingl3s, follicle-stimulating hormone) recombinante. La FSH pertenece a la clase de las gonadotropinas.

La FSH se usa en el tratamiento de la infertilidad y de trastornos de la reproducci3n tanto en pacientes femeninos como masculinos. La FSH se usa en pacientes femeninos para inducci3n de la ovulaci3n (OI; del ingl3s, ovulation induction) y para hiperestimulaci3n ov3rica controlada (COH; del ingl3s, controlled ovarian hyperstimulation), por ejemplo, para tecnolog3as de reproducci3n asistida (ART; del ingl3s, assisted reproductive technologies). En un r3gimen de tratamiento t3pico para inducci3n de la ovulaci3n, se administran diariamente inyecciones de FSH o de un derivado de la misma (aproximadamente de 75 a 300 UI de rFSH/d3a) a un paciente durante un periodo de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 d3as. En un r3gimen de tratamiento t3pico para hiperestimulaci3n ov3rica controlada, se administran diariamente inyecciones de FSH o de un derivado de la misma (aproximadamente 150-600 UI de rFSH/d3a) a un paciente durante un periodo de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 d3as. Tambi3n se utiliza la FSH para inducir espermatog3nesis en hombres que padecen oligospermia. Un r3gimen en que se utilizan 150 UI de FSH 3 veces a la semana en combinaci3n con 2500 UI de hCG dos veces a la semana ha resultado exitoso en cuanto a conseguir una mejora del recuento de espermatozoides en hombres que padecen hipogonadismo hipogonadotr3pico. A causa de la importancia de la FSH en el tratamiento de trastornos de la fertilidad, es deseable la provisi3n de una FSH de elevada estabilidad y elevada actividad espec3fica.

En la naturaleza, la FSH es producida por la gl3ndula pituitaria. Para uso farmac3utico, la FSH puede ser producida recombinantemente (rFSH) o puede ser aislada de la orina de hembras posmenop3sicas (uFSH). El proceso de fabricaci3n de rFSH requiere dos operaciones principales: el cultivo de una c3lula gen3ticamente modificada que exprese FSH, y la purificaci3n de la prote3na. La prote3na es luego formulada con un veh3culo farmac3uticamente aceptable con objeto de obtener una composici3n farmac3utica.

En el pasado, para el cultivo de c3lulas, el medio de cultivo sol3a estar complementado con suero, que serv3a como un nutriente universal para el crecimiento y el mantenimiento de todas las l3neas celulares de mam3fero. Sin embargo, el advenimiento de la encefalopat3a esponjiforme bovina (BSE; del ingl3s, bovine spongiform encephalopathy), una enfermedad neurodegenerativa transmisible del ganado vacuno con un largo periodo de latencia o incubaci3n, ha provocado inquietudes sobre regulaci3n relativas al uso de sueros de origen animal en la producci3n de productos biol3gicamente activos. Por lo tanto, actualmente se prefiere producir prote3nas recombinantes usando medios exentos de suero. Dichos medios son bien conocidos en la t3cnica y son comercializados por diversas compa3as, tales como, por ejemplo, Sigma, BioWhittaker, Gibco BRL, Cambrex y JRH.

Uno de los problemas encontrados cuando se almacena rFSH es la presencia de formas oxidadas de FSH. Para resolver parcialmente este problema, se puede a3adir un antioxidante a la composici3n farmac3utica con objeto de estabilizar la prote3na FSH durante el almacenamiento antes de su administraci3n al paciente que necesita el tratamiento. Por ejemplo, en el Documento EP 0853945 (Skrabanja y Van den Oetelaar, 1998) se describen formulaciones l3quidas que contienen gonadotropina mezcladas con un estabilizante, tal como, por ejemplo, citrato s3dico en una concentraci3n 25-100 mM y L-metionina en una concentraci3n 1-10 mM. Se muestra que dichas formulaciones permiten el almacenamiento de formulaciones de FSH durante periodos m3s prolongados. El Documento WO 92/15614 (Takruri, H., 1992) tambi3n se refiere a un m3todo para inhibir la oxidaci3n de un polip3ptido en una composici3n farmac3utica l3quida o semil3quida, tal como, por ejemplo, un medio de almacenamiento o una disoluci3n oft3lmica acuosa. Espec3ficamente, en el Documento WO 92/15614 se muestra que una disoluci3n oft3lmica o unguento oft3lmico que comprende L-metionina en una concentraci3n de 10 mg/l estabiliza el factor de crecimiento epid3rmico humano. Sin embargo, en los anteriores documentos s3lo se describe el uso de un antioxidante en una formulaci3n farmac3utica, y no en un medio de cultivo.

Tambi3n se pueden a3adir amino3cidos y compuestos que presentan actividad antioxidante a los medios de cultivo, sea como nutrientes o sea para proteger de la muerte celular a l3neas celulares. Por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n3 4.560.655 se describe un medio exento de suero que comprende aproximadamente 30 mg/l de L-metionina, utiliz3ndose dicho medio para el cultivo de c3lulas de test3culo de cerdo, c3lulas de mieloma AG14 y c3lulas espl3nicas murinas. En el Documento WO 95/12664 se ense3a un m3todo mediante el cual se puede superar, para una l3nea celular concreta, la desventaja debida a las cantidades insuficientes de diversos factores que limitan el

crecimiento, siendo uno de ellos el aminoácido L-metionina. Específicamente, en el Documento WO 95/12664 se enseña un método para adaptar la línea celular CHO E5F3G, que expresa M-CSF humano, a crecer en una densidad celular aumentada. En este método, las células CHO E5F3G son hechas crecer en un medio que comprende 104 mg/l de L-metionina (véanse el Ejemplo y la Tabla 2). Yun et al. enseñan que la adición de una combinación de glutatión y agentes quelantes de hierro al medio de cultivo reduce la muerte celular de células CHO (Yun et al., 2003). Saito et al. enseñan además que se pueden usar diversos antioxidantes en medios de cultivo para proteger de la muerte celular a una línea celular (Saito et al., 2003). Sin embargo, el Documento WO 95/12664, la Patente de EE.UU. n° 4.560.655, Yun et al. y Saito et al. no dicen nada sobre el posible efecto (si lo hubiera) de los aminoácidos, el glutatión y los agentes quelantes de hierro sobre el estado de oxidación de la proteína recombinante producida por la línea celular. En conclusión, en estos documentos sólo se describe el uso de L-metionina o de glutatión combinado con agentes quelantes de hierro para mejorar el crecimiento y/o la viabilidad de las células cultivadas.

El Documento WO 99/50390 se refiere a un medio de cultivo para producir interferón  $\alpha$  a partir de leucocitos, medio de cultivo que comprende metionina. Se demuestra por HPLC que la calidad de la proteína interferón  $\alpha$  después de la purificación resulta mejorada tras la adición de metionina al medio de cultivo. Los inventores del Documento WO 99/50390 proponen la hipótesis de que esta mejora puede ser debida a una oxidación disminuida de la proteína interferón  $\alpha$ . En el Documento WO 99/50390 se indica además que una cantidad demasiado pequeña de metionina da lugar a un efecto disminuido y que una cantidad demasiado grande causa menores producciones de interferón. Específicamente, en el Documento WO 99/50390 se enseña que un intervalo de aproximadamente 50 a 100 mg/l es un intervalo especialmente preferido cuando se produce interferón  $\gamma$  a partir de leucocitos. Además, en el Documento WO 99/50390 sólo se contempla un medio para la producción de interferón  $\gamma$ , que es una proteína monómera. En el Documento WO 99/50390 no se menciona ni sugiere un medio para la producción de hormonas dimeras, tal como, por ejemplo, FSH, que únicamente se secreta tras la dimerización (Matzuk et al., 1988).

En resumen, ninguno de los documentos anteriormente mencionados se refiere al uso de un antioxidante en un medio de cultivo exento de suero para reducir la oxidación de gonadotropinas dimeras.

## 25 SUMARIO DEL INVENTO

El presente invento se basa en el inesperado hallazgo de que, ya durante la fabricación de rFSH, aparecen formas oxidadas de rFSH en el sobrenadante del cultivo celular. Además, la producción de rFSH en un medio exento de suero conduce a mayores niveles de formas oxidadas que la producción de rFSH en un medio que contiene suero. En el marco del presente invento, se ha hallado sorprendentemente que se pueden reducir los niveles de formas oxidadas de rFSH no sólo durante el almacenamiento sino también durante la operación de cultivo. Esta reducción se alcanza sin dañar la productividad. La reducción se lleva a cabo por medio de la adición de un antioxidante al medio de cultivo. Específicamente, se ha hallado que complementar un medio exento de suero con cualquiera de (i) 2-mercaptoetanol, (ii) una combinación de ácido ascórbico y (+)-alfa-tocoferol, (iii) L-metionina y (iv) L-glutatión durante el cultivo de células que expresan rFSH reduce los niveles de formas oxidadas de rFSH.

35 Por lo tanto, en un primer aspecto, el invento se refiere al uso de un medio de cultivo exento de suero para reducir los niveles de formas oxidadas de una gonadotropina dímera recombinante durante el proceso de su fabricación, caracterizado por que dicho medio de cultivo comprende un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en:

- L-glutatión en una concentración que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/l;
- 2-mercaptoetanol en una concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg/l;
- 40 - L-metionina en una concentración que varía de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mg/l; y
- una combinación de ácido ascórbico en una concentración que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg/l y (+)-alfa-tocoferol en una concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mg/l.

45 En un segundo aspecto, en el invento se describe un método para reducir los niveles de formas oxidadas de una gonadotropina dímera recombinante durante el proceso de su fabricación, caracterizado por que células que expresan dicha gonadotropina dímera recombinante son cultivadas en un medio de cultivo exento de suero que comprende un antioxidante.

50 En un tercer aspecto del invento, se describe un medio de cultivo exento de suero para la producción de gonadotropinas dimeras recombinantes, caracterizado por que dicho medio de cultivo comprende un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en:

- L-glutatión en una concentración que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/l;

- 2-mercaptoetanol en una concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg/l;
- L-metionina en una concentración que varía de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 mg/l; y
- una combinación de ácido ascórbico en una concentración que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg/l y (+)-alfa-tocoferol en una concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mg/l.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

El presente invento es el resultado del hallazgo de que los niveles de formas oxidadas de rFSH pueden ser significativamente reducidos tras el cultivo de células que expresan rFSH en un medio exento de suero que comprende antioxidantes. Como se muestra en el Ejemplo 3, cualquiera de (i) 2-mercaptoetanol, (ii) una combinación de ácido ascórbico y (+)-alfa-tocoferol, (iii) L-metionina y (iv) L-glutación es particularmente ventajoso para reducir los niveles de formas oxidadas de rFSH durante el proceso de cultivo. Es importante que esta reducción puede ser alcanzada sin dañar la viabilidad ni el metabolismo de la célula y sin dañar los títulos de rFSH.

Por lo tanto, un primer aspecto del presente invento se dirige al uso de un medio de cultivo exento de suero para reducir los niveles de formas oxidadas de una gonadotropina dímera recombinante durante el proceso de su fabricación, caracterizado por que dicho medio de cultivo comprende un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en:

- L-glutación en una concentración que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/l;
- 2-mercaptoetanol en una concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg/l;
- L-metionina en una concentración que varía de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mg/l; y
- una combinación de ácido ascórbico en una concentración que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg/l y (+)-alfa-tocoferol en una concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mg/l.

Preferiblemente, el medio de cultivo exento de suero de acuerdo con el presente invento comprende L-glutación en una concentración que varía de aproximadamente 1, 1,5 ó 2 a aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ó 20 mg/l. Muy preferiblemente, el medio de cultivo exento de suero comprende L-glutación en una concentración de aproximadamente 2,5 ó 3 mg/l. Como aquí se utiliza, "glutación" se usa indistintamente con "L-glutación".

Preferiblemente, el medio de cultivo exento de suero de acuerdo con el presente invento comprende 2-mercaptoetanol en una concentración que varía de aproximadamente 5, 6, 7, 8 ó 9 a aproximadamente 11, 12, 13, 14 ó 15 mg/l. Muy preferiblemente, el medio de cultivo exento de suero comprende 2-mercaptoetanol en una concentración de aproximadamente 10 mg/l.

Preferiblemente, el medio de cultivo exento de suero de acuerdo con el presente invento comprende una combinación de ácido ascórbico en una concentración que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg/l y (+)- $\alpha$ -tocoferol en una concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mg/l. Más preferiblemente, dicho medio comprende (+)-alfa-tocoferol en una concentración que varía de aproximadamente 5, 8, 10 ó 12 a aproximadamente 16, 18, 20, 22 ó 25 mg/l y ácido ascórbico en una concentración que varía de aproximadamente 15, 20 ó 25 a aproximadamente 35, 40 ó 45 mg/l. Muy preferiblemente, dicho medio de cultivo exento de suero comprende (+)-alfa-tocoferol en una concentración de aproximadamente 14 mg/l y ácido ascórbico en una concentración de aproximadamente 30 mg/l. Como aquí se utiliza, "(+)-alfa-tocoferol" se usa indistintamente con "vitamina A", y "ácido ascórbico" se usa indistintamente con "ácido L-ascórbico".

Preferiblemente, el medio de cultivo exento de suero de acuerdo con el presente invento comprende L-metionina en una concentración que varía de aproximadamente 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240 ó 245 mg/l a aproximadamente 300, 325, 350, 375 ó 400 mg/l. Muy preferiblemente, el medio de cultivo exento de suero comprende L-metionina en una concentración de aproximadamente 250 mg/l. Como aquí se utiliza, "metionina" se usa indistintamente con "L-metionina".

Cualquier medio de cultivo exento de suero puede ser complementado con antioxidantes de acuerdo con el presente invento. Los medios exentos de suero comercialmente asequibles que se pueden utilizar de acuerdo con el presente invento incluyen, por ejemplo, SFM 90 (JRH, 67350), SFM 90.1 (JRH, 67350), Supmed300 o Supmed300 modificado (JRH, 67350), DMEM (Gibco, 7490571), DMEM/F12 (Gibco, 99.5043), SFM CHO 3a (BioWhittaker), CHO PFM (Sigma, C6970), ProCHO 5, medios EX-CELL tales como EX-CELL 302 (JRH, nº 14312-1000M del catálogo) y EX-CELL 325 (JRH, nº 14335-1000M del catálogo), CHO-CD3 (Sigma, nº C-1490 del catálogo), CHO III PFM (Gibco, nº 96-0334SA del catálogo), CHO-S-SFM II (Gibco, nº 12052-098 del catálogo), CHO-DHFR (Sigma, nº C-8862 del catálogo), ProCHO 5 (Cambrex, nº BE12-766Q del catálogo), SFM4CHO (HyClone, nº SH30549.01 del catálogo), Ultra CHO (Cambrex, nº 12-724Q del catálogo), HyQ PF CHO (HyClone, nº SH30220.01 del catálogo), HyQ SFX

CHO (HyClone, nº SH30187.01 del catálogo), HyQ CDM4CHO (HyClone, nº SH30558.01 del catálogo), IS CHO-CD (Irvine Scientific, nº #91119 del catálogo), IS CHO-V (Irvine Scientific, nº #9197 del catálogo) y derivados de los mismos. A continuación, en la Tabla 1, se muestra la composición de SFM 90, SFM 90.1, SupMed300, DMEM, DMEM/F12, SFM CHO 3<sup>a</sup> y CHP PFM, que se pueden usar de acuerdo con el presente invento.

5

**Tabla 1: Composición de cinco medios de cultivo exentos de suero comercialmente asequibles que se pueden utilizar en el marco del presente invento**

MEDIO	SFM 90	SFM 90.1	Supmed300 modificado	DMEM	DMEM/F12	SFM CHO 3a	CHO PFM
PROVEEDOR Y REFERENCIA	JRH 67350	JRH 67350	JRH 67350	Gibco 7490571	Gibco 99.5043	Bio- Whittaker	Sigma C6970
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
<b>AMINOÁCIDOS</b>							
L-ALANINA	23,36	23,36	23,36	84,00	4,45	26,73	15
Ácido L-alfa-aminobutírico							
L-ARGININA	585,04	585,04	585,04			820,4	200
L-ARGININA HCl					147,50		
L-ASPARAGINA H <sub>2</sub> O	442,07	442,07	442,07		7,50	689,4	30
L-ASPARTATO	341,29	341,29	341,29		6,65	458,93	15
L-CISTEÍNA							
L-CISTEÍNA HCl H <sub>2</sub> O	92,19	92,19	92,19		17,56	96,68	138
L-CISTINA							
L-CISTINA 2HCl	23,46	23,46	23,46		31,29		0
L-GLUTAMATO	39,34	39,34	39,34		7,35	44,13	20
L-GLUTAMINA	1204,50	1204,50	1204,50	584,00	365,00	0	0
GLICOCOLA	247,24	247,24	247,24	30,00	18,75	317,11	20
L-HISTIDINA							
L-HISTIDINA HCl H <sub>2</sub> O	70,77	70,77	70,77	42,00	31,48	109,2	100
HIDROXIPROLINA							0
L-ISOLEUCINA	248,62	248,62	248,62	105,00	54,47	299,17	140
L-LEUCINA	368,66	368,66	368,66	105,00	59,05	490,11	150
L-LISINA	1880,70	1880,70	1880,70	146,00		582,04	200
L-LISINA HCl					91,25		

ES 2 388 875 T3

L-METIONINA	115,11	115,11	115,11	30,00	17,24	154,55	50
L-ORNITINA HCl							
L-FENILALANINA	37,77	37,77	37,77	66,00	35,48	33,59	100
L-PROLINA	90,56	90,56	90,56	1500,00	17,25	140,67	200
L-SERINA	417,79	417,79	417,79	42,00	26,25	563,66	100
CISTINA SÓDICA				50,21			
L-TREONINA	562,46	562,46	562,46	95,00	53,45	741,57	125
L-TRIPTÓFANO	56,66	56,66	56,66	16,00	9,02	91,23	100
L-TIROSINA							
L-TIROSINA 2Na 2H <sub>2</sub> O	145,52	145,52	145,52	90,00	55,79	172,848	120
L-VALINA	329,66	329,66	329,66	94,00	52,85	96,9	125
<b>SALES</b>							
CaCl <sub>2</sub> ANHIDRO	87,45	87,45	87,45	199,32	116,6	200,0085	65,9
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O							0
CuCl <sub>2</sub>							0,034
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,000938	0,000938	0,000938		0,0013	95	0
<b>MEDIO</b>	<b>SFM 90</b>	<b>SFM 90.1</b>	<b>Supmed300 modificado</b>	<b>DMEM</b>	<b>DMEM/F12</b>	<b>SFM CHO 3a</b>	<b>CHO PFM</b>
FeCl <sub>3</sub>							1
FeNO <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O	0,04	0,04	0,04	0,1	0,05		0
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,313	0,313	0,313		0,417	8612	0
KCl	569,25	569,25	569,25	400	311,8	199,1	400
KNO <sub>3</sub>							0
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>							0
MgCl <sub>2</sub> ANHIDRO	107,29	107,29	107,29		28,64		155
MgSO <sub>4</sub> ANHIDRO	36,63	36,63	36,63	97,6	48,84	77,32	0
MnCl <sub>2</sub>							0
MnSO <sub>4</sub>	0,17	0,17	0,17				0
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O							
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>					71,02		

ES 2 388 875 T3

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	53,4	53,4	53,4			66,206	142
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,324	0,324	0,324				0,001
NaCl	5520	5520	5520	6400	6995,5	3300	5000
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ANHIDRO	46,88	46,88	46,88	108,5115		125	0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O					62,5		
NaHCO <sub>3</sub>	0,0375	0,0375	0,0375				0
ZnCl <sub>2</sub>							8,18
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,31275	0,31275	0,31275		0,432	3,329	0
<b>OLIGOELEMENTOS</b>							
AgNO <sub>3</sub>	0,00017	0,00017	0,00017				
AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,00217	0,00217	0,00217				
Ba(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0,00255	0,00255	0,00255				
CdCl <sub>2</sub> ANHIDRO	0,001806	0,001806	0,001806				
CdSO <sub>4</sub>							
CoCl <sub>2</sub>	0,00238	0,00238	0,00238				
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O							
Cr(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>							
CrCl <sub>3</sub>							
CrCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,00039	0,00039	0,00039				
GeO <sub>2</sub>	0,00053	0,00053	0,00053				
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>							
KBr	0,00012	0,00012	0,00012				
KI	0,00017	0,00017	0,00017				
LiCl							
(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O							
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O	0,14	0,14	0,14				
Na <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>							
NaF	0,0042	0,0042	0,0042				
(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,00124	0,00124	0,00124				
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,00065	0,00065	0,00065				

ES 2 388 875 T3

NiCl <sub>2</sub>							
NiSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,00013	0,00013	0,00013				
RbCl	0,00121	0,00121	0,00121				
SnCl <sub>2</sub>							
SnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,00012	0,00012	0,00012				
<b>MEDIO</b>	<b>SFM 90</b>	<b>SFM 90.1</b>	<b>Supmed300 modificado</b>	<b>DMEM</b>	<b>DMEM/F12</b>	<b>SFM CHO 3a</b>	<b>CHO PFM</b>
TiCl <sub>2</sub>							
ZrOCl <sub>2</sub> 8H <sub>2</sub> O	0,00322	0,00322	0,00322				
<b>HIDRATOS DE CARBONO</b>							
L-GLUCOSA	3225	3225	3225	4500	3,5	4300	4500
L-FRUCTOSA							0
L-MANOSA							0
<b>VITAMINAS</b>							
ÁCIDO ASCÓRBICO							
BIOTINA	2,02	2000	2000		0,0035	0,032	0,5
CLORURO DE COLINA	40,13	40,13	40,13	4	8,98	86,88	70
CIANOCOBALAMINA (B12)	3,57	3,57	3,57		0,68	1,288	6,8
D-PANTOTENATO DE CALCIO	4,76	4,76	4,76	4	2,24	3,544	20
ÁCIDO D,L-ALFA-LIPOICO							0
ACETATO DE D,L-ALFA-TOCOFEROL	0,7	0,7	0,7				0
FOLATO	6,9	6,9	6,9	4	2,65	13,002	20
I-INOSITOL		53,9	53,9	7,2			
MYO-INOSITOL	53,9				12,6	69,23	90
NIACINAMIDA	3,6	3,6	3,6		2,02		20
NICOTINAMIDA				4		2,0898	



ES 2 388 875 T3

PIRIDOXAL HCl	3,5	3,5	3,5	4			0
PIRIDOXINA HCl	0,163	0,163	0,163		0,031	2,3651	20
RIBOFLAVINA	0,45	0,45	0,45	0,4	2	0,5128	0,188
PANTOTENATO SÓDICO							
TIAMINA HCl	4,3	4,31	4,31	4	2,17	2,471	10,85
TOCOFEROL						24	
<b>LÍPIDOS</b>							
ÁCIDO ARAQUIDÓNICO	0,02	20	20				0,595
COLESTEROL	2,2	2,2	2,2				0
ACEITE DE HÍGADO DE BACALAO							0
ÁCIDO LÁURICO							0,595
ÁCIDO LINOLEICO	0,321	0,321	0,321		0,042	700	0,595
ÁCIDO LINOLÉNICO	0,1	0,1	0,1				0
ÁCIDO LIPOICO					0,105	0,788	
ÁCIDO MIRÍSTICO	0,1	0,1	0,1				0,595
LINOLEATO DE Na						0,273	
ÁCIDO OLEICO, sal sódica	0,108	0,108	0,108				0,595
ÁCIDO PALMÍTICO	0,1	0,1	0,1				0
ÁCIDO PALMITOLEICO	0,1	0,1	0,1				0
ÁCIDO ESTEÁRICO	0,1	0,1	0,1				0
ÁCIDO TIÓCTICO							0
<b>MISCELÁNEA</b>							
2-MERCAPTOETANOL							
<b>MEDIO</b>	<b>SFM 90</b>	<b>SFM 90.1</b>	<b>Supmed300 modificado</b>	<b>DMEM</b>	<b>DMEM/F12</b>	<b>SFM CHO 3a</b>	<b>CHO PFM</b>
ÁCIDO CÍTRICO (Na) <sub>3</sub>							59
CICLODEXTRINA							
EDTA (Na) <sub>4</sub>							10
CITRATO DE FeNH <sub>3</sub>							

ES 2 388 875 T3

CITRATO FÉRRICO	122,500	12,250					
HIPOXANTINA	14,550	14,550	14,550		2,390		
L-GLUTATIÓN							
MOPS							
PIRUVATO DE Na	288,750	288,750	288,750	110,000	55,000	421,67	110
PABA							
ROJO DE FENOL						15	0
PUTRESCINA, 2HCl	0,423	0,423	0,423		0,081	0,9763	4
TIMIDINA	1,916	1,916	1,916		0,365		
<b>DETERGENTES</b>							
ETANOLAMINA HCl FB	9,79	9,79	9,79				
PLURONIC F68	1,00E+03	1,00E+03				0	1000
TWEEN 80							
<b>COMPLEMENTOS</b>							
2 HP-BETA-CICLODEX- TRINA							
ÁCIDO AURINTRICAR- BOXÍLICO							6,3
FETUÍNA							
HIDROCORTISONA	0,5	0,5	0,5				3,6
HyPep 4601							2500
Hy-Soy						0,2	1000
IGF-1							
INSULINA	10	1				5	2
LIPOSOMAS						1200	
METIL-BETA-CICLO- DEXTRINA							115,85
PRIMATONE							
TRANSFERRINA							
<b>ADITIVOS</b>							
GLUTAMINA							

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>				1250		2100	
HEPES	2234,250	2234,250	2234,250	4766		5000	3574,5
<b>pH especificado</b>	<b>7</b>			<b>7,2-7,4</b>			
<b>TOTAL (mg/l)</b>	<b>18.545,60</b>	<b>20.444,32</b>	<b>19.431,07</b>	<b>16.176,34</b>	<b>8840,29</b>	<b>27.556,20</b>	<b>17.292,18</b>

En una realización preferida del presente invento, el medio de cultivo exento de suero es un medio químicamente definido, es decir, un medio preparado a partir de ingredientes purificados y cuya composición exacta es por lo tanto conocida. Específicamente, los medios químicamente definidos no contienen componentes de origen animal ni productos de hidrólisis indefinidos.

Las gonadotropinas que se pueden producir de acuerdo con el presente invento incluyen la hormona luteinizante (LH; del inglés, luteinizing hormone; n° de acceso 152780 del OMIM), la hormona estimulante del folículo (FSH; n° de acceso 136530 del OMIM), la gonadotropina coriónica (CG; del inglés, chorionic gonadotropin; n° de acceso 118860 del OMIM) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH; del inglés, thyroid-stimulating hormone; n° de acceso 188540 del OMIM). Las gonadotropinas son hormonas dímeras. Cada una de estas hormonas consiste en un dímero no covalente de subunidades alfa y beta. La subunidad alfa es la misma para las 4 hormonas (n° de acceso 118850 del OMIM), y las subunidades beta definen la función endocrina del dímero (Talmadge et al., 1983).

En una realización muy preferida del presente invento, la gonadotropina es FSH humana. Como aquí se utiliza, el término "**FSH**" se refiere a una proteína dímera compuesta de una subunidad alfa que corresponde al n° de acceso P01215 de SwissProt y de una subunidad beta que corresponde al n° de acceso P01225 de SwissProt. Puesto que la FSH es una proteína secretada soluble, se libera al sobrenadante del cultivo celular por medio de su péptido señal natural o por medio de un péptido señal heterólogo, es decir, un péptido señal procedente de otra proteína secretada que puede ser más eficaz en el sistema de expresión particular utilizado.

El término "FSH" incluye además variantes de corte y empalme, variantes alélicas, muteínas, derivados funcionales, fracciones activas, proteínas fusionadas y proteínas circularmente permutadas de una proteína dímera compuesta de una subunidad alfa que corresponde al n° de acceso P01215 de SwissProt y de una subunidad beta que corresponde al n° de acceso P01225 de SwissProt.

Como aquí se utiliza, el término "**muteína**" se refiere a compuestos análogos de FSH en que uno o más de los restos de aminoácido de una FSH natural o FSH vírica son sustituidos por restos de aminoácido diferentes o son suprimidos, o se añaden uno o más restos de aminoácido a la secuencia natural de FSH, sin que cambie considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la FSH silvestre. Estas muteínas se preparan mediante técnicas de síntesis y/o de mutagénesis dirigida al sitio conocidas, o mediante cualquier otra técnica conocida adecuada para ellas.

Las muteínas de acuerdo con el presente invento incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como DNA o RNA, que se hibrida con DNA o RNA, que codifica una FSH bajo condiciones rigurosas. La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones de la hibridación y el lavado subsiguiente a las que quienes tienen una experiencia normal en la técnica se refieren convencionalmente como "rigurosas" (véase, por ejemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, New York, secciones 6.3 y 6.4, 1987, 1992). Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen unas condiciones de lavado a 12-20 °C por debajo de la T<sub>m</sub> calculada del híbrido bajo estudio en, por ejemplo, SSC 2x y SDS al 0,5% durante 5 minutos, SSC 2x y SDS al 0,1% durante 15 minutos; SSC 0,1x y SDS al 0,5% a 37 °C durante 30-60 minutos y luego SSC 0,1x y SDS al 0,5% a 68 °C durante 30-60 minutos. Quienes tienen una experiencia normal en esta técnica entienden que las condiciones de rigor también dependen de la longitud de las secuencias de DNA, las sondas oligonucleotídicas (tales como de 10-40 bases) o las sondas oligonucleotídicas mixtas. Si se usan sondas mixtas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en vez de SSC. Véase Ausubel, supra.

En una realización preferida, una muteína de FSH tiene una identidad de al menos 40% con la secuencia de una FSH presente en la naturaleza. Más preferiblemente, tiene una identidad de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o, muy preferiblemente, al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con respecto a ésta.

La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinada al comparar las secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de los dos polinucleótidos o las dos secuencias polipeptídicas, respectivamente, por todo lo largo de las secuencias que se comparan.

Para secuencias en que no hay una correspondencia exacta, se puede determinar un "% de identidad". En general, las dos secuencias que se van a comparar son alineadas para obtener una máxima correlación entre las secuencias.

5 Esto puede incluir la inserción de "huecos" en una o ambas secuencias para aumentar el grado de alineamiento. Se puede determinar un % de identidad por todo lo largo de cada una de las secuencias que se comparan (llamado "alineamiento global"), lo que es particularmente adecuado para secuencias de la misma longitud o de longitudes muy similares, o por longitudes definidas más cortas (llamado "alineamiento local"), lo que es más adecuado para secuencias de longitudes desiguales. En el marco del presente invento, el "% de identidad" se refiere al porcentaje global de identidad que ha sido determinado por todo lo largo de cada una de las secuencias que se comparan.

10 Se pueden usar programas informáticos conocidos para determinar si un polipéptido concreto presenta un porcentaje de identidad con una secuencia del presente invento. Dichos algoritmos y programas incluyen, por ejemplo, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA y CLUSTALW (Altschul et al., 1.990; Altschul et al., 1997; Higgins et al., 1.996; Pearson y Lipman, 1.988; Thompson et al., 1994). Las homologías entre secuencias de proteínas y ácidos nucleicos se evalúan preferiblemente usando la Herramienta Básica para Investigación de Alineamientos Locales (BLAST; del inglés, Basic Local Alignment Search Tool), que es bien conocida en la técnica (Altschul et al., 1.990; Altschul et al., 1997; Karlin y Altschul, 1.990).

15 Los programas BLAST permiten identificar secuencias homólogas al identificar segmentos similares, a los que se hace aquí referencia como "pares de segmentos de alta calificación", entre una secuencia de aminoácidos o ácido nucleico en cuestión y una secuencia de ensayo que es preferiblemente obtenida de una base de datos de secuencias de proteínas o ácidos nucleicos. Los pares de segmentos de alta calificación son preferiblemente identificados (es decir, alineados) por medio de un matriz de calificación, muchas de las cuales son conocidas en la técnica. La matriz de calificación utilizada puede ser la matriz BLOSUM62 (Gonnet et al., 1.992; Henikoff y Henikoff, 1.993).  
20 También se pueden usar las matrices PAM y PAM250 [véase, por ejemplo, "Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure", Washington: National Biomedical Research Foundation; redactado por Schwartz y Dayhoff (1.978)]. Los programas BLAST permiten evaluar la significación estadística de todos los pares de segmentos de alta calificación identificados y seleccionar preferiblemente los segmentos que satisfacen un umbral de significación especificado por el usuario, tal como un porcentaje de homología especificado por el usuario. Preferiblemente, la significación estadística de un par de segmentos de alta calificación es evaluada usando la fórmula de significación estadística de Karlin (Karlin y Altschul, 1.990). Los programas BLAST se pueden usar con los parámetros por omisión o con parámetros modificados proporcionados por el usuario.

25 Se puede determinar un método preferido para determinar la mejor correspondencia de conjunto entre una secuencia en cuestión (una secuencia del presente invento) y una secuencia objetivo, al que también se hace referencia como alineamiento global de secuencias, usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag (Brutlag et al., 1990). En un alineamiento de secuencias, tanto la secuencia en cuestión como la objetivo son secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento global de secuencias está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en un alineamiento FASTDB de aminoácidos son: matriz = PAM 0, k-tupla = 2, penalización por falta de correspondencia = 1, penalización por unión = 20, grupo de aleatorización = 25, longitud = 0, calificación de corte = 1, tamaño de ventana = longitud de la secuencia, penalización por hueco = 5, penalización por tamaño de hueco = 0,05, tamaño de ventana = 247 o la longitud de la secuencia de aminoácidos objetivo, lo que sea más corto.

30 Si la secuencia objetivo es más corta que la secuencia en cuestión debido a supresiones N- o C-terminales, no a causa de supresiones internas, los resultados, en porcentaje de identidad, deben ser manualmente corregidos porque el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos N- y C-terminales de la secuencia objetivo cuando se calcula el porcentaje global de identidad. Para secuencias objetivo truncadas en los extremos N y C, con respecto a la secuencia en cuestión, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de restos de la secuencia en cuestión que son N- y C-terminales de la secuencia objetivo, que no están apareados/alineados con un correspondiente resto objetivo, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia en cuestión. El que un resto esté apareado/alineado viene determinado por los resultados del alineamiento FASTDB de secuencias. Este porcentaje es luego restado del porcentaje de identidad, calculado mediante el anterior programa FASTDB usando los parámetros especificados, para llegar a un porcentaje final de calificación de identidad. Este porcentaje final de calificación de identidad es lo que se usa para los fines del presente invento. Para los fines de ajustar manualmente el porcentaje de calificación de identidad, sólo se consideran los restos de los extremos N y C de la secuencia objetivo que no están apareados/alineados con la secuencia en cuestión; es decir, sólo los restos de aminoácido en cuestión al margen de los restos N- y C-terminales más distantes de la secuencia objetivo.

35 Por ejemplo, se alinea una secuencia objetivo de 90 restos de aminoácido con una secuencia en cuestión de 100 restos para determinar el porcentaje de identidad. La supresión tiene lugar en el extremo N de la secuencia objetivo y, por lo tanto, el alineamiento FASTDB no aparea/alinea los primeros restos del extremo N. Los 10 restos no apareados representan el 10% de la secuencia (número de restos no apareados en los extremos N y C/número total de restos en la secuencia en cuestión), por lo que se resta el 10% del porcentaje de calificación de identidad calculado mediante el programa FASTDB. Si los 90 restos restantes estuvieran perfectamente apareados, el porcentaje final de identidad sería 90%.

60 Los cambios preferidos para muteínas de acuerdo con el presente invento son lo que se conocen como sustituciones "conservativas". Las sustituciones conservativas de aminoácidos de FSH pueden incluir aminoácidos sinónimos

de un grupo que tienen unas propiedades fisicoquímicas suficientemente similares para que la sustitución entre miembros del grupo conserve la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Es evidente que también se pueden realizar inserciones y supresiones de aminoácidos en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o supresiones sólo afectan a unos pocos aminoácidos, por ejemplo a

5 menos de treinta y preferiblemente a menos de diez, y no eliminan ni desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, restos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas mediante dichas supresiones y/o inserciones entran dentro del alcance del presente invento.

La expresión "proteína fusionada" de FSH se refiere a un polipéptido que comprende FSH, una muteína o un fragmento de la misma, fusionado con otra proteína que, por ejemplo, tiene un tiempo de permanencia prolongado en fluidos corporales. Por ejemplo, se puede fusionar FSH con una inmunoglobulina o un fragmento de la misma, tal como una porción inmunoglobulínica Fc. También se puede fusionar la secuencia de FSH madura con un péptido señal y/o con una secuencia líder que permita una secreción aumentada.

10

En una realización preferida del invento, se fusiona la subunidad beta de FSH o un fragmento de la misma con el péptido carboxilo-terminal (CTP; del inglés, carboxyl-terminal peptide) de la subunidad beta de hCG. La proteína resultante tiene unas actividades biológicas y ligantes de receptor *in vitro* idénticas a las de FSH pero una semivida en circulación aumentada (LaPolt et al., 1992).

15

Como "fracción activa" de FSH o de muteínas de la misma, el presente invento abarca cualesquier fragmentos o precursores de la cadena polipeptídica de la molécula proteica solos o junto con moléculas asociadas o restos enlazados a los mismos, por ejemplo, restos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula proteica o los restos de azúcar en sí mismos, con tal de que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a la de FSH.

20

Como aquí se utiliza, "derivados funcionales" de FSH abarca derivados de FSH o de una muteína de la misma que pueden ser preparados a partir de los grupos funcionales que se presentan como cadenas laterales en los restos o los grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y están incluidos en el invento con tal de que se mantengan farmacéuticamente aceptables, es decir, que no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la gonadotropina y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen. Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos y prolongar la permanencia de la FSH en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acílicos de grupos amino libres de los restos de aminoácido, formados con componentes acilo (por ejemplo, grupos aroilo carbocíclicos o alcanilo), y derivados O-acílicos de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, de restos de serilo o treonilo), formados con componentes acilo. En una realización preferida, el derivado funcional corresponde a una molécula de FSH que presenta una glicosilación adicional.

25

30

El término "sales" de FSH se refiere aquí tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de grupos amino de FSH por adición de ácido. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de zinc, y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales por adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético y ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de dicha sales debe conservar la actividad biológica de la gonadotropina.

35

Como aquí se usa, la expresión "gonadotropina dímera recombinante" se refiere a una gonadotropina que se ha producido tras el cultivo de una célula genéticamente modificada. La gonadotropina se puede producir en una célula de cualquier origen. La célula genéticamente modificada que expresa una gonadotropina dímera expresa ambas subunidades de dicha gonadotropina dímera.

40

Como aquí se usa, la expresión "célula genéticamente modificada" se refiere a una célula en que se ha introducido DNA exógeno de tal modo que se permite la expresión de ambas subunidades de la gonadotropina deseada. El DNA exógeno puede comprender una secuencia que codifique las subunidades de la gonadotropina deseada. Alternativamente, el DNA exógeno puede comprender una secuencia que active la expresión de la secuencia endógena que codifica las subunidades de la gonadotropina deseada (véase, por ejemplo, el Documento WO 91/09955).

45

Las células pueden proceder de, por ejemplo, animales, insectos o microbios. Como aquí se utiliza, la expresión "célula animales" incluye células de mamíferos humanos y no humanos, células que no son de mamífero e híbridomas. Los ejemplos de células de mamífero en que se puede producir una gonadotropina dímera recombinante incluyen, por ejemplo, células 3T3, células COS, células de osteosarcoma humano, células MRC-5, células BHK, células VERO, células CHO, células rCHO-tPA, células rCHO-antígeno superficial de la hepatitis B, células HEK 293, células rHEK 293, células rC127-antígeno superficial de la hepatitis B, fibroblastos humanos normales, células estromales, hepatocitos, células PER.C6 y células amnióticas permanentes humanas. Los ejemplos de híbridomas en que se puede producir una gonadotropina dímera recombinante incluyen, por ejemplo, células DA4.4, células 123A, células 127A, células GAMMA y células 67-9-B.

50

55

En el marco del presente invento, se prefiere cultivar una célula de ovario de hámster chino (célula CHO; del inglés,

chinese hamster ovary).

5 En un segundo aspecto, en el presente invento se describe un método para reducir los niveles de formas oxidadas de una gonadotropina dímera recombinante durante el proceso de su fabricación, caracterizado por que las células que expresan dicha gonadotropina dímera recombinante son cultivadas en un medio de cultivo exento de suero que comprende un antioxidante.

Como aquí se usa, la expresión "formas oxidadas" se refiere a un polipéptido en que un oxidante ha causado la oxidación de uno o más restos de aminoácido. Dichas formas pueden ser detectadas mediante, por ejemplo, HPLC, como se describe en el Ejemplo 2.1 para la FSH.

10 El cultivo se puede llevar a cabo en cualquier ambiente adecuado, tal como placas de Petri, matraces en T o botellas giratorias, pero preferiblemente en recipientes que tienen mayores volúmenes, tales como, por ejemplo, un biorreactor.

La etapa de cultivo comprende las operaciones siguientes:

- una inoculación de dichas células en dicho medio de cultivo exento de suero;
- una fase de crecimiento; y
- 15 - una fase de producción.

La fase de crecimiento es la parte del proceso de cultivo celular en que se ajustan los parámetros de procesamiento con objeto de sustentar el crecimiento celular. Una vez que se ha alcanzado la densidad celular deseada, se cambia normalmente el cultivo celular por una fase de producción en la que se ajustan los parámetros de procesamiento con objeto de sustentar la productividad celular. Los parámetros de procesamiento pueden ser los mismos durante la fase de crecimiento y la fase de producción. Durante la fase de producción, la concentración de células tiene preferiblemente un valor comprendido en el intervalo de  $1 \cdot 10^6$  a  $5 \cdot 10^7$  células/ml, por ejemplo, de aproximadamente  $1 \cdot 10^6$ ,  $5 \cdot 10^6$ ,  $1 \cdot 10^7$  o  $5 \cdot 10^7$  células/ml. Muy preferiblemente, dicha célula es una célula CHO.

20 En una realización, el antioxidante se añade al medio de cultivo exento de suero antes de la inoculación de las células. En otra realización, el antioxidante se añade al medio de cultivo exento de suero poco después de la inoculación de las células (por ejemplo, no más de 24 horas después de la inoculación).

Preferiblemente, el proceso de fabricación aquí descrito comprende la operación de recoger el medio que comprende la gonadotropina dímera recombinante.

30 En una realización preferida, el proceso de fabricación aquí descrito comprende además purificar la gonadotropina dímera recombinante. Los métodos para purificar gonadotropinas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede purificar la FSH del modo descrito en el Documento EP 04105639.1, el Documento WO 98/20039, el Documento WO 00/63248 o el Documento WO 88/10270.

En otra realización preferida, el proceso de fabricación aquí descrito comprende además formular la gonadotropina dímera recombinante con un vehículo farmacéuticamente aceptable para obtener una composición farmacéutica.

35 Con la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como aquí se usa, se quiere abarcar todo vehículo que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el huésped al cual se administra. Por ejemplo, para administración parenteral, la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) formular en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como disolución salina, disolución de dextrosa, albúmina sérica y disolución de Ringer.

40 La composición farmacéutica aquí descrita puede ser luego administrada a un individuo de diversas maneras. Las vías de administración incluyen las vías intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, tópica, rectal e intranasal. Se puede utilizar cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, tal como, por ejemplo, la absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o mediante una terapia génica en la que se administra al paciente una molécula de DNA que codifica el agente activo (por ejemplo, a través de un vector), lo que causa que el agente activo sea expresado y secretado *in vivo*. Además, la(s) proteína(s) aquí descrita(s) se puede(n) administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como agentes tensioactivos, excipientes, agentes portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular), la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) formular como una disolución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado, junto con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, disolución salina o disolución de dextrosa) y aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación es esterilizada mediante técnicas comúnmente utilizadas.

El método para reducir los niveles de formas oxidadas de una gonadotropina dímera recombinante durante el proce-

so de su fabricación se caracteriza por que al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis operaciones de dicho proceso de fabricación se llevan a cabo en presencia de un antioxidante. Preferiblemente, todas las operaciones de dicho proceso de fabricación se llevan a cabo en presencia de un antioxidante, es decir, todo el proceso de fabricación se lleva a cabo en presencia de un antioxidante.

5 Por ejemplo, el método para reducir los niveles de formas oxidadas de una gonadotropina dímera recombinante durante el proceso de su fabricación puede comprender las operaciones de:

- cultivar células que expresan dicha gonadotropina dímera recombinante en un medio de cultivo exento de suero que comprende un antioxidante;
- recoger el medio que comprende dicha gonadotropina dímera recombinante; y

10 - purificar dicha gonadotropina dímera recombinante en presencia de un antioxidante.

Preferiblemente, el método para reducir los niveles de formas oxidadas de una gonadotropina dímera recombinante durante el proceso aquí descrito para su fabricación comprende además la operación de formular dicha gonadotropina dímera recombinante en una composición farmacéutica que comprende un antioxidante.

15 El antioxidante puede ser el mismo en todas las operaciones del proceso de fabricación en que se utiliza un antioxidante. Alternativamente, se pueden usar diferentes antioxidantes en la operación de cultivo, la operación de purificación y/o la operación de formulación. En la técnica se conocen numerosos compuestos que tienen un efecto antioxidante. Estos compuestos incluyen, por ejemplo, cisteína, ácido ascórbico, L-metionina, L-glutatión, 2-mercaptoetanol, alfa-tocoferol y derivados del mismo, BO-653, t-butil-4-metoxifenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol, bimetabisulfito de potasio o sodio, bisulfito sódico, histidina, taurina, glicocola, alanina, carnosina, anserina y 1-metilhistidina.

20 En un tercer aspecto, en el presente invento se describe un medio de cultivo exento de suero para la producción de gonadotropinas dímeras recombinantes, caracterizado por que dicho medio de cultivo comprende un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en:

- L-glutatión en una concentración que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/l;
- 25 - 2-mercaptoetanol en una concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg/l;
- L-metionina en una concentración que varía de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 mg/l; y
- una combinación de ácido ascórbico en una concentración que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg/l y (+)-alfa-tocoferol en una concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mg/l.

30 Los medios de cultivo exentos de suero comprenden normalmente agua, un agente regulador de la osmolaridad, un tampón, una fuente de energía, aminoácidos, una fuente de hierro inorgánica o recombinante, un factor de crecimiento recombinante o sintético y, opcionalmente, iones metálicos no féreos, vitaminas y cofactores. Por ejemplo, cualquiera de los medios exentos de suero comercialmente asequibles anteriormente enumerados puede ser modificado de acuerdo con el presente invento.

35 Una vez totalmente descrito este invento, los expertos en la técnica apreciarán que el mismo se puede llevar a cabo con una gran variedad de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes sin apartarse del espíritu ni el alcance del invento y sin una experimentación excesiva.

40 Aunque este invento ha sido descrito en relación con realizaciones específicas del mismo, se entenderá que permite otras modificaciones. Esta solicitud está destinada a abarcar todas las variaciones, usos o adaptaciones del invento que siguen, en general, los principios del invento e incluyendo dichas desviaciones de la presente descripción como vienen dentro de la práctica conocida o habitual de la técnica a la que pertenece el invento y como se pueden aplicar a las características esenciales anteriormente establecidas de la siguiente manera en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

45 La referencia a operaciones de métodos conocidos, operaciones de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no es en modo alguno un reconocimiento de que un aspecto, descripción o realización del presente invento sea descrito, enseñado o sugerido en la técnica pertinente.

50 La descripción precedente de las realizaciones específicas revelará tan completamente la naturaleza general del invento que otros podrán, aplicando los conocimientos pertenecientes a la experiencia de la técnica (incluyendo los contenidos de las referencias aquí citadas), modificar y/o adaptar fácilmente dichas realizaciones específicas para diversas aplicaciones sin una experimentación excesiva y sin apartarse del concepto general del presente invento. Por lo tanto, dichas adaptaciones y modificaciones están destinadas a ser en el sentido de una variedad de equivalentes de las realizaciones descritas, basadas en la enseñanza y la orientación aquí presentadas. Se ha de entender

que la fraseología o terminología presente es con el fin de descripción y no de limitación, por lo que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva ha de ser interpretada por el técnico experto a la luz de las enseñanzas y la orientación aquí presentadas, en combinación con los conocimientos de quien tiene una experiencia ordinaria en la técnica.

## 5 **EJEMPLO 1: Proceso de cultivo celular**

### 1.1 Líneas celulares y medios

10 Todos los experimentos se llevaron a cabo con una línea de células CHO que expresaba ambas subunidades de la FSH humana. La proteína producida es una gonadotropina dímica a la que además se hace referencia como rFSH. La subunidad alfa corresponde al nº de acceso P01215 de SwissProt y la subunidad beta corresponde al nº de acceso P01225 de SwissProt.

El medio utilizado para el cultivo celular era un medio exento de suero (SFM; del inglés, serum-free medium) básico, diseñado para el cultivo de células CHO. El medio SFM fue complementado con el antioxidante que se iba a examinar, como se detalla en el Ejemplo 3. En la Tabla I se muestra la concentración inicial de los antioxidantes que se iban a examinar en el SFM básico.

15 **Tabla I: Concentración inicial de los antioxidantes en el medio básico exento de suero**

Compuesto	Concentración inicial en SFM básico
L-cisteína	138 mg/l
Cistina-2HCl	0 mg/l
N-acetil-L-cisteína (NAC)	0 mg/l
Ácido L-ascórbico	0 mg/l
L-metionina	50 mg/l
L-glutati6n	0 mg/l
2-mercaptoetanol	0 mg/l
(+)-alfa-tocoferol	0 mg/l

### 1.2 Condiciones de inoculación, crecimiento y producci6n

20 El proceso de cultivo, al que tambi6n se hace referencia como "ensayo", comprende una operaci6n de inoculaci6n, una fase de crecimiento y una fase de producci6n. Se llevaron a cabo cinco ensayos diferentes, a los que se hace referencia como ensayos 1, 2, 3, 4 y 5.

Se transfirieron al menos  $2,4 \cdot 10^9$  células productoras de rFSH viables a un biorreactor de 15 l de capacidad con un volumen eficaz de trabajo de 11 l (newMBR, Zurich) que comprendía microvehículos. Inmediatamente despu6s de la siembra sigui6 una fase discontinua que dur6 dos o tres días. Luego se alimento continuamente SFM al biorreactor con un índice de diluci6n de  $1 \text{ día}^{-1}$  y un índice de perfusi6n de  $11 \text{ l-día}^{-1}$ .

25 La fase de crecimiento y la fase de producci6n se llevaron a cabo en el mismo pH y a la misma temperatura ( $37 \text{ °C}$ ,  $\text{pH} = 7$ ). El oxígeno disuelto (DO; del inglés, dissolved oxygen) se mantuvo en una saturaci6n de aire al 50% durante todo el ensayo.

## **EJEMPLO 2: Métodos analíticos**

### 2.1 Determinaci6n de formas oxidadas de rFSH

30 Se determinaron las formas oxidadas mediante RP-HPLC sobre una cosecha cruda, del modo descrito por Bassett y Driebergen (Bassett y Driebergen, 2005).

Se normalizaron los porcentajes de formas oxidadas usando como referencia el porcentaje de formas oxidadas obtenido con L-cisteína en una concentraci6n de 280 mg/l en el ensayo 2 (es decir, los porcentajes de formas oxidadas fueron divididos por 23,4%).



2.2 Medición de la concentración de células viables totales

5 La concentración de células viables totales se define como la suma de la concentración de células fijadas a microvehículos y la concentración de células viables en suspensión. La concentración de células fijadas a microvehículos fue determinada usando el método del recuento de núcleos con violeta cristal (Fluka 61135). La concentración de células viables en suspensión se determinó utilizando el método de la exclusión de azul de tripán (Sigma T-8154).

Se calculó la relación de células viables totales (TVC; del inglés, total viable cells) del modo siguiente: [concentración de células viables totales, fin del examen] / [concentración de células viables totales, inicio del examen], en que el inicio del examen se define como el día en que se introduce un nuevo antioxidante en el cultivo, y el fin del examen se define como el día antes de que se introduzca el siguiente antioxidante en el cultivo.

10 2.3 Medición de los títulos de rFSH

Se midió el título de rFSH mediante una prueba inmunofluorimétrica, usando el kit Delphia hFSH de Wallac-ADL (nº A017-201 del catálogo).

2.4 Medición del índice de consumo de glucosa (GCR)

15 Se calculó el índice de consumo de glucosa (GCR; del inglés, glucose consumption rate), expresado en gramos por litro y por día, del modo siguiente:  $GCR = (G_0 - G_t)D_t + (G_{t-1} - G_t)$ .

G representa la "concentración de glucosa" y D representa "el índice de dilución". Los subíndices se refieren a lo siguiente:

- 0: en SFM de alimentación;
- t: medición a tiempo t; y
- 20 - t-1: medición a tiempo t-1

**EJEMPLO 3: Efecto de diversos antioxidantes**

Con objeto de reducir el nivel de formas oxidadas obtenido con el proceso exento de suero, se llevaron a cabo dos ensayos de 15 l (ensayos 1 y 2) para examinar el efecto de diversos antioxidantes. Como testigo, se llevó a cabo un ensayo sin adición de antioxidante alguno (ensayo 3).

25 Se complementó el SFM con diversos antioxidantes o combinaciones de antioxidantes con objeto de alcanzar la concentración final mostrada en la Tabla II. Se examinó cada antioxidante o combinación de antioxidantes durante un periodo de aproximadamente diez días. El primer día del examen, se añadió el volumen de disolución de antioxidante necesario para alcanzar el punto establecido. Cada día después, se separó una cierta cantidad de antioxidante del biorreactor por perfusión y se substituyó por una adición de una sola vez (para un índice de dilución de 1 d<sup>-1</sup>, se renovó el 63.2% del volumen del biorreactor cada 24 horas, y esto representa la cantidad de antioxidante que se ha de substituir cada día). Al final del período de examen, se separó el antioxidante del biorreactor por perfusión y se substituyó por otro antioxidante que se había de examinar.

30 Se midió el porcentaje de formas oxidadas de rFSH al final de cada examen (Tabla II). Un valor normalizado inferior a 1,0 indica que el antioxidante examinado es más eficaz que la L-cisteína para disminuir los niveles de formas oxidadas de rFSH.

35 Se midieron diariamente la concentración de células viables totales, el GCR y los títulos de rFSH. En la Tabla II se indica la relación de células viables totales (relación de TVC). Una relación de TVC superior o igual a 1,0 indica que el antioxidante examinado no ejerce efecto tóxico alguno sobre las células.

**Tabla II: Efecto de antioxidantes sobre las formas oxidadas de rFSH**

Días operativos (WD) en que se examinó el antioxidante	WD en que se midieron las formas oxidadas	Antioxidante	Concentración media (mg/l)	% de formas oxidadas	Formas oxidadas (valor normalizado)	Relación de TVC
<b>Ensayo 1</b>						
WD10 a WD20	WD20	L-cisteína	280	21,5	0,92	8,6
WD20 a WD30	WD30	Ácido L-ascórbico	10	17,3	0,74	1,3

WD30 a WD40	WD38	L-metionina	186	14,3	0,61	1,4
WD40 a WD50	WD50	L-glutati3n	3	14,2	0,61	1,2
WD50 a WD60	WD59	2-mercaptoetanol	10	12,3	0,53	0,8
WD60 a WD70	WD70	L-metionina	734	14,0	0,60	1,0
WD70 a WD80	WD79	Ácido L-asc3rbico + (+)-alfa-tocoferol	30 14	14,8	0,63	1,0

**Ensayo 2**

WD0 a WD20	WD20	L-cisteína	280	23,4	1,00	6,3
WD20 a WD30	WD30	Cisteína 2HCl	50	17,3	0,74	1,4
WD30 a WD40	WD38	N-acetil-L-cisteína	260	18,1	0,77	1,3
WD40 a WD50	WD50	L-cisteína	350	20,5	0,88	1,0
WD50 a WD56	WD56	L-cisteína + ácido L-asc3rbico + 2-mercaptoetanol	280 10 10	19,0	0,81	1,0

WD ( del ingl3s, working days) significa "días operativos"

Los resultados mostrados en la Tabla II indican que el 2-mercaptoetanol, una combinaci3n de ácido asc3rbico y (+)-alfa-tocoferol, la L-metionina y el L-glutati3n son los mejores antioxidantes para obtener bajos niveles de formas oxidadas de rFSH.

- 5 Sólo se obtiene una relaci3n de células viables totales (TVC) inferior a 1,0 en el caso del 2-mercaptoetanol. Por lo tanto, todos los antioxidantes examinados en los ensayos 1 y 2 son atóxicos salvo el 2-mercaptoetanol. Además, la medici3n del GCR y de los títulos de rFSH mostr3 que ninguno de los diferentes antioxidantes producía un impacto importante sobre el metabolismo ni sobre los patrones de productividad (datos no mostrados).

- 10 Se escogieron la L-metionina y el L-glutati3n para una ulterior optimizaci3n del proceso de producci3n. Se llevó a cabo un ensayo (ensayo 3) para examinar diversas concentraciones de L-glutati3n (de 1 a 20 mg/l) y se llevó a cabo un ensayo (ensayo 4) para examinar diversas concentraciones de L-metionina (de 0,25 a 3 g/l), y el ensayo 3 en que se examinaba L-glutati3n se detuvo prematuramente el día 30 de producci3n porque los microvehículos estaban dañados. En la Tabla III se muestran las concentraciones examinadas de L-glutati3n y L-metionina durante los ensayos 3 y 4. El Día Operativo cero (WD0) se define como el día durante el cual se siembra el biorreactor. El Día de Producci3n (PD; del ingl3s, production day) cero (PD0) se define como el día durante el cual se cambia el proceso de cultivo celular, de la fase de crecimiento a la fase de producci3n. Además, se llevó a cabo un ensayo sin variar la concentraci3n de antioxidante. En este ensayo, se añaó la L-metionina en una concentraci3n de 250 mg/l desde el principio (ensayo 5). Para todos los ensayos, se midi3 regularmente el porcentaje de formas oxidadas de rFSH (Tabla IV).

20

**Tabla III: Concentraci3n de antioxidante en los ensayos 3 y 4**

	<b>Ensayo 3</b>	<b>Ensayo 4</b>
WD0 de la fase de crecimiento	sin L-glutati3n	50 mg/l de L-metionina
WD1 de la fase de crecimiento hasta PD0 (no incluido)	1 mg/l de L-glutati3n	250 mg/l de L-metionina
PD0-PD9	1 mg/l de L-glutati3n	250 mg/l de L-metionina
PD10-PD19	2,5 mg/l de L-glutati3n	500 mg/l de L-metionina
PD20-PD29	5mg/l de L-glutati3n	1000 mg/l de L-metionina

PD30-PD39	10 mg/l de L-glutación	2000 mg/l de L-metionina
PD40-PD49	20 mg/l de L-glutación	3000 mg/l de L-metionina

**Tabla IV: Efecto de antioxidantes sobre las formas oxidadas de rFSH**

WD en que se midieron las formas oxidadas	Antioxidante	Concentración media (mg/l)	% de formas oxidadas
<b>Ensayo 3</b>			
WD19	L-glutación	1	18,31
WD28	L-glutación	2,5	14,26
WD40	L-glutación	5	23,99
<b>Ensayo 4</b>			
WD19	L-metionina	250	15,37
WD28	L-metionina	500	14,26
WD40	L-metionina	1000	13,56
WD49	L-metionina	2000	9,77
WD59	L-metionina	3000	12,66
<b>Ensayo 5</b>			
WD16-17	L-metionina	250 mg/l	16,91
WD20-21			14,45
WD22-23			12,94
WD24-25			12,16
WD26-27			10,54
WD28-29			12,83
WD30-31			13,21

5 Los análisis de las formas oxidadas de rFSH cuando se añadió antioxidante al medio de cultivo mostraron que la L-metionina es un buen antioxidante. En el ensayo 5, en la que se cultivaron las células en presencia de L-metionina en una concentración de 250 mg/l, el porcentaje medio de formas oxidadas resultó disminuido en aproximadamente un 40% en comparación con los resultados obtenidos en el ensayo 1 y el ensayo 2 con L-cisteína como antioxidante (véanse las Tablas II y IV). También el L-glutación es un buen antioxidante, especialmente en una concentración de aproximadamente 2,5 mg/l. En el ensayo 3, el porcentaje de formas oxidadas resultó disminuido en aproximadamente un 35% cuando se cultivaron las células en presencia de L-glutación en una concentración de 2,5 mg/l, en comparación con los resultados obtenidos en el ensayo 1 y el ensayo 2 con L-cisteína como antioxidante (véanse las Tablas II y IV).

10 Parece que concentraciones crecientes de L-metionina presentan una pauta decreciente sobre el porcentaje de formas oxidadas entre 250 y 2000 mg/l en el ensayo 4. Sin embargo, parece que las diferencias observadas están dentro de la variabilidad del método ya que se observaron variaciones comparables en el ensayo 5, en la que se

examinaba una concentración de L-metionina de 250 mg/l durante todo el ensayo. Además, se confirmó que el L-glutación y la L-metionina no ejercían un impacto importante sobre la viabilidad de las células, el metabolismo ni los patrones de productividad en el intervalo de concentraciones que se examinó (datos no mostrados).

#### REFERENCIAS

- 5 1. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool., *J. Mol. Biol.* *215*, 403-410.
2. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* *25*, 3389-3402.
- 10 3. Bassett, R. M. y Driebergen, R. (2005). Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. *Reprod. Biomed. Online.* *10*, 169-177.
4. Brutlag, D. L., Dautricourt, J. P., Maulik, S. y Relph. J. (1990). Improved sensitivity of biological sequence database searches, *Comput. Appl. Biosci.* *6*, 237-245.
- 15 5. Gonnet, G. H., Cohen, M. A. y Benner, S. A. (1992). Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* *256*, 1443-1445.
6. Grantham, R. (1974). Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* *185*, 862-864.
7. Henikoff, S. y Henikoff, J. G. (1993). Performance evaluation of amino acid substitution matrices. *Proteins* *17*, 49-61.
- 20 8. Higgins, D. G., Thompson, J. D. y Gibson, T. J. (1996). Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* *266*, 383-402.
9. Karlin, S. y Altschul, S. F. (1990). Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 2264-2268.
- 25 10. LaPolt, P. S., Nishimori, K., Fares, F. A., Perlas, E., Boime, I. y Hsueh, A. J. (1992). Enhanced stimulation of follicle maturation and ovulatory potential by long acting follicle-stimulating hormone agonists with extended carboxyl-terminal peptides. *Endocrinology* *131*, 2514-2520.
11. Matzuk, M. M., Kornmeier, C. M., Whitfield, G. K., Kourides, I. A. y Boime, I. (1988). The glycoprotein alpha-subunit is critical for secretion and stability of the human thyrotropin beta-subunit. *Mol. Endocrinol.* *2*, 95-100.
12. Pearson, W. R. y Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 2444-2448.
- 30 13. Saito, Y., Yoshida, Y., Akazawa, T., Takahashi, K. y Niki, E. (2003). Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J. Biol. Chem.* *278*, 39.428-39.434.
14. Skrabanja, A. y Van den Oetelaar, P. Liquid gonadotropin containing formulations. EP 0 853 945 A1. 22-7-1998.
15. Takruri, H. Method for the stabilisation of methionine-containing polypeptides. WO 92/15614. 17-9-1992.
- 35 16. Talmadge, K., Boorstein, W. R. y Fiddes, J. C. (1983). The human genome contains seven genes for the beta-subunit of chorionic gonadotropin but only one gene for the beta-subunit of luteinizing hormone. *DNA* *2*, 281-289.
17. Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4673-4680.
- 40 18. Yun, Z., Takagi, M. y Yoshida, T. (2003). Combined addition of glutathione and iron chelators for decrease of intracellular level of reactive oxygen species and death of Chinese hamster ovary cells. *J. Biosci. Bioeng.* *95*, 124-127.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un medio de cultivo exento de suero para reducir los niveles de formas oxidadas de una gonadotropina dímica recombinante durante el proceso de su fabricación, en que dicho medio de cultivo comprende un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en:
  - 5           - L-glutati3n en una concentraci3n que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/l;
  - 2-mercaptoetanol en una concentraci3n que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg/l;
  - L-metionina en una concentraci3n que varía de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mg/l; y
  - una combinaci3n de ácido asc3rbico en una concentraci3n que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg/l y (+)-alfa-tocoferol en una concentraci3n que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mg/l.
- 10           2. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 1, en que dicho antioxidante es seleccionado del grupo que consiste en:
  - L-glutati3n en una concentraci3n de aproximadamente 3 mg/l;
  - 2-mercaptoetanol en una concentraci3n de aproximadamente 10 mg/l;
  - L-metionina en una concentraci3n de aproximadamente 250 mg/l; y
  - 15           - una combinaci3n de ácido asc3rbico en una concentraci3n de aproximadamente 30 mg/l y (+)-alfa-tocoferol en una concentraci3n de aproximadamente 14 mg/l.
3. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 1 ó 2, en que dicho medio de cultivo es un medio químicamente definido.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que dicho medio de cultivo es seleccionado del grupo que consiste en SFM 90, SFM 90.1, SupMed300, DMEM, DMEM/F12, SFM CHO 3a, CHP PFM, Pro-CHO 5, EX-CELL, CHO-CD3, CHO III PFM, CHO-S-SFM II, CHO-DHFR, SFM4CHO, Ultra CHO, HyQ PF CHO, HyQ SFX CHO, HyQ CDM4CHO, IS CHO-CD, IS CHO-V y derivados de los mismos.
- 20           5. El uso de acuerdo con la reivindicaci3n 4, en que dicha gonadotropina dímica es la hormona estimulante del folículo (FSH).
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que dicha gonadotropina dímica recombinante se produce en células de ovario de hámster chino (CHO).
- 25