

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 318**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/59 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 09733497 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2268666**

54 Título: **FSH recombinante que incluye sialilación en alfa 2,3- y alfa 2,6**

30 Prioridad:

16.04.2008 US 45424 P
25.04.2008 EP 08251528

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2014

73 Titular/es:

FERRING B.V. (100.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL

72 Inventor/es:

COTTINGHAM, IAN;
PLAKSIN, DANIEL y
WHITE, RICHARD BOYD

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 468 318 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

FSH recombinante que incluye sialilación en alfa 2,3- y alfa 2,6

5 La presente invención se refiere a gonadotropinas para su uso en el tratamiento de la infertilidad. En particular se refiere a la hormona foliculoestimulante (FSH).

10 Las gonadotropinas son un grupo de hormonas glicoproteínas heterodiméricas que regulan la función gonádica en el macho y la hembra. Incluyen la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (CG).

15 FSH es secretada de forma natural por la hipófisis anterior y funciona para apoyar el desarrollo folicular y la ovulación. FSH comprende una subunidad alfa de 92 aminoácidos, también común a otras hormonas glicoproteínas LH y CG, y una subunidad beta de 111 aminoácidos única a FSH que confiere la especificidad biológica de la hormona (Pierce y Parsons, 1981). Cada subunidad se modifica postraduccionalmente mediante la adición de residuos glucídicos complejos. Ambas subunidad tienen 2 sitios para unión de glicano unido en N, la subunidad alfa en los aminoácidos 52 y 78 y la subunidad beta en los residuos de aminoácidos 7 y 24 (Rathnam y Saxena, 1975, Saxena y Rathnam, 1976). Por tanto, FSH está glicosilada hasta aproximadamente el 30% en masa (Dias y Van Roey, 2001. Fox *et al.* 2001).

20 Se ha usado FSH purificada de orina humana posmenopáusica durante muchos años en el tratamiento de la infertilidad; tanto para fomentar la ovulación en la reproducción natural como para proporcionar ovocitos para tecnologías de reproducción asistida. Dos versiones recombinantes de FSH, Gonal-F (Serono) y Puregon (Organon) estuvieron disponibles a mediados de los años 90. Estas se expresan ambas en células de ovario de hámster chino (CHO) (Howles, 1996).

30 Hay considerable heterogeneidad asociada con las preparaciones de FSH que se relaciona con diferencias en las cantidades de varias isoformas presentes. Las isoformas individuales de FSH muestran secuencias de aminoácidos idénticas pero se diferencian en el grado al que están modificadas postraduccionalmente; las isoformas particulares se caracterizan por la heterogeneidad de las estructuras de las ramificaciones de hidratos de carbono y cantidades diferentes de la incorporación de ácido siálico (un azúcar terminal), ambas de las cuales parecen influir la bioactividad de la isoforma específica.

35 La glicosilación de FSH natural es muy compleja. Los glicanos en la FSH hipofisaria derivada de forma natural pueden contener una amplia gama de estructuras que pueden incluir combinaciones de glicanos bi-, tri- y tetra-antenarios (Pierce y Parsons, 1981. Ryan *et al.*, 1987. Baenziger y Green, 1988). Los glicanos pueden tener modificaciones adicionales: fucosilación del núcleo, glucosamina bisectante, cadenas extendidas con acetil-lactosamina, sialilación parcial o completa, sialilación con enlaces α 2,3 y α 2,6 y galactosamina sulfatada sustituida por galactosa (Dalpathado *et al.*, 2006). Además, hay diferencias entre la distribución de las estructuras de glicano en los sitios de glicosilación individuales. Se ha encontrado un nivel comparable de complejidad de glicanos en FSH derivada del suero de individuos y de la orina de mujeres posmenopáusicas (Wide *et al.*, 2007).

45 La glicosilación de productos de FSH recombinante refleja la gama de glicosiltransferasas presentes en la línea celular huésped. Los productos de rFSH existentes derivan de células de ovario de hámster chino (células CHO) manipuladas. La gama de modificaciones de glicano en rFSH derivada de CHO está más limitada que las encontradas en los productos naturales, derivados de extractos hipofisarios u orina. Los ejemplos de la heterogeneidad de glicanos reducida encontrada en rFSH derivada de CHO incluyen una falta de glucosamina bisectante y un contenido reducido de fucosilación del núcleo y extensiones de acetil-lactosamina (Hard *et al.*, 1990). Además, las células CHO solo pueden añadir ácido siálico usando el enlace α 2,3 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). Esto es diferente de la FSH producida de forma natural que contiene glicanos con una mezcla de ácido siálico unido en α 2,3 y α 2,6.

50 Se ha demostrado que una preparación de FSH recombinante (Organon) se diferencia en las cantidades de FSH con un punto isoeléctrico (pI) por debajo de 4 (consideradas las isoformas ácidas) cuando se comparan con FSH hipofisaria, sérica o de orina posmenopáusica (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). La cantidad de isoformas ácidas en las preparaciones urinarias era mucho mayor comparada con los productos recombinantes, Gonal-f (Serono) y Puregon (Organon) (Andersen *et al.*, 2004). Esto debe reflejar un contenido molar menor de ácido siálico en la rFSH ya que el contenido de glicano cargado negativamente modificado con sulfato es bajo en FSH. El menor contenido en ácido siálico, comparado con la FSH natural, es una característica de ambos productos de FSH comercialmente disponibles y por tanto debe reflejar una limitación en el proceso de fabricación (Bassett y Driebergen, 2005).

60 Existe un gran cuerpo de trabajo científico que analiza e intenta explicar las variaciones en la glicosilación de FSH entre individuos y cambios durante el curso de un ciclo de ovulación. Una de las discusiones principales se refiere a la observación de que la concentración de FSH y el contenido de ácido siálico disminuyen ambos durante la fase preovulatoria del ciclo. El contenido disminuido en ácido siálico produce una FSH más básica que tanto se depura más rápidamente como, al menos in vitro, es más potente en el receptor diana (Zambrano *et al.*, 1996). La pregunta

respecto a la relevancia biológica de estos cambios y cómo pueden estar implicados en la selección del folículo dominante permanece sin resolver (revisado por Ulloa-Aguirre, 2003).

Se ha documentado el tiempo de vida circulatoria de la FSH para materiales de una variedad de fuentes. Algunos de estos materiales se han fraccionado basándose en la carga molecular total, caracterizados por su pl, en los que más ácido equivale a mayor carga negativa. Como se ha indicado previamente el principal contribuidor a la carga molecular global es el contenido total en ácido siálico de cada molécula de FSH. Por ejemplo, rFSH (Organon) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 8 mol/mol, mientras que la FSH derivada de orina tiene un contenido mayor de ácido siálico (de Leeuw *et al.*, 1996). Las velocidades de depuración en plasma correspondientes en rata son 0,34 y 0,14 ml/min (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2003). En otro ejemplo donde una muestra de FSH recombinante se separó en fracciones de alto y bajo pl, la potencia *in vivo* de la fracción de pl alto (menor contenido en ácido siálico) disminuyó y tenía una semivida en plasma más corta (D'Antonio *et al.*, 1999). También se ha descrito que la FSH más básica que circula durante los estadios tardíos del ciclo de ovulación es debido a la disminución de la α 2,3 sialiltransferasa en la hipófisis anterior que se produce al aumentar los niveles de estradiol (Damian-Matsumara *et al.* 1999. Ulloa-Aguirre *et al.* 2001). No se han descrito resultados para la α 2,6 sialiltransferasa.

El contenido total en ácido siálico de la FSH y rFSH no es directamente comparable ya que los ácidos siálicos comúnmente se unen de dos maneras. La FSH hipofisaria/sérica/urinaria contiene ácido siálico unido tanto en α 2,3 como α 2,6, con una predominancia del primero. Sin embargo los recombinantes derivados de células CHO solo contienen α 2,3 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). Esta es otra diferencia entre los productos naturales y recombinantes actuales además del menor contenido total en ácido siálico del último.

Las células CHO se usan comúnmente para la producción de proteínas recombinantes humanas farmacéuticas. Un análisis estructural ha identificado que el ácido siálico está exclusivamente unido por un enlace α 2,3 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). Muchas glicoproteínas humanas contienen una mezcla de enlaces tanto α 2,3 como α 2,6. Por tanto, las proteínas recombinantes expresadas usando el sistema de CHO se diferenciarán de sus homólogos naturales en su tipo de enlaces de ácido siálico terminal. Esta es una consideración importante en la producción de productos biológicos para uso farmacéutico ya que las fracciones glucídicas pueden contribuir a los atributos farmacológicos de la molécula.

Es deseable tener un producto de rFSH que replique o mimetice más estrechamente el perfil fisicoquímico y farmacocinético del producto producido de orina humana. Es deseable tener un producto de rFSH que tenga propiedad o propiedades farmacocinética(s) mejorada(s) comparado con el producto recombinante conocido.

Según la presente invención se proporciona FSH recombinante ("rFSH" o "recFSH") que incluye sialilación en α 2,3 y sialilación en α 2,6 en donde el 60% o más de la sialilación total es sialilación en α 2,3 y del 5 al 40% de la sialilación total es sialilación en α 2,6; en donde la FSH recombinante tiene un contenido en ácido siálico [expresado en términos de una proporción de moles de ácido siálico respecto a moles de proteína] de 10 mol/mol a 15 mol/mol. La rFSH (o preparación de rFSH) de la invención puede tener el 5% o menos de la sialilación total que es sialilación en α 2,8, por ejemplo, del 0,1-4% de la sialilación total puede ser sialilación en α 2,8.

Los solicitantes han encontrado que el tipo de enlace de ácido siálico, α 2,3 o α 2,6, puede tener una influencia drástica en la depuración biológica de FSH. Las líneas celulares humanas, en oposición a las líneas de células CHO, pueden expresar FSH recombinante con ácidos siálicos unidos por enlaces tanto α 2,3 como α 2,6. En el ejemplo 4 se hizo una línea celular con FSH recombinante que expresaba FSH que contenía glicanos con bajos niveles de ácido siálico unidos tanto en α 2,3 como en α 2,6 (figura 6). Este material básico, con contenido limitado en ácido siálico (figura 4) se depuraba de forma muy rápida de la circulación en rata como se predeciría (figura 7). La línea celular se sometió después a un segundo paso de manipulación con la adición del gen que codifica la α 2,6-sialiltransferasa (ejemplo 5). La rFSH resultante estaba altamente sialilada mostrando un contenido en ácido siálico y distribución de pl comparable con la FSH urinaria (figura 5). Sin embargo, el material se depuraba muy rápidamente de la circulación de ratas a una velocidad comparable al material original que tenía bajo contenido en ácido siálico (figura 8). Esta era una observación inesperada ya que se sabe que una proporción de ácido siálico en la FSH natural y biológicamente activa está unido en α 2,6. Se encontró que la depuración de rFSH sialilada en α 2,6 estaba mediada por el receptor de asialoglicoproteína (ASGP) encontrado en el hígado (ejemplo 9). Esto se demostró por el bloqueo transitorio de los receptores de ASGP usando un exceso de otro sustrato para el receptor. Con el receptor bloqueado por asialofetuína, la depuración esperada por el material altamente sialilado se restableció (figura 9). Esto se mantuvo durante varias horas hasta que el bloqueo se superó y la rFSH altamente sialilada unida en α 2,6 reanudó su rápida depuración.

Se hizo FSH recombinante con una mezcla de ácido siálico unido tanto en α 2,3 como α 2,6 manipulando una línea celular humana para que exprese tanto rFSH como α 2,3-sialiltransferasa (ejemplo 4 y 5). El producto expresado es muy ácido y tiene una mezcla de ácidos siálicos unidos tanto en α 2,3 como α 2,6; el último proporcionado por la actividad sialiltransferasa endógena (figura 6). Esto tiene dos ventajas sobre rFSH expresada en células CHO convencionales: primero el material está más altamente sialilado debido a las actividades combinadas de las dos sialiltransferasas; y en segundo lugar el material se parece más estrechamente a la FSH natural. Esto es probable

que sea más biológicamente apropiado comparado con los productos recombinantes derivados de células CHO que producen solo ácido siálico unido en $\alpha 2,3$ (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990) y tienen contenido disminuido en ácido siálico (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995, Andersen *et al.*, 2004).

5 Los solicitantes han encontrado sorprendentemente que la rFSH de la invención puede replicar o mimetizar más estrechamente el perfil fisicoquímico y farmacocinético del producto urinario humano natural que otros productos recombinantes. En otras palabras, la rFSH de la invención puede ser más cercana a la FSH "natural". Esto puede tener ventajas significativas respecto a la dosificación, etc. Además, un producto más "natural" o más "humano" puede ser más deseable para el paciente, que puede desear que la terapia, aunque en un sentido artificial, sea tan
10 "natural" como sea posible. Puede haber otras ventajas (por ejemplo, ventajas farmacocinéticas) en un producto recombinante que tiene estructura glucídica (por ejemplo, glicano) que es más cercana a la FSH natural (por ejemplo, urinaria humana) que otros productos recombinantes.

15 Por tanto, la invención es una versión recombinante de FSH que tiene una mezcla de ácido siálico en $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ y por tanto se parece más estrechamente a la FSH natural. Se espera que el uso de este compuesto para la estimulación ovárica controlada, en técnicas de FIV, e inducción de la ovulación produzca una estimulación más natural del ovario comparado con productos recombinantes existentes.

20 Según la presente invención se proporciona FSH recombinante ("rFSH" o "recFSH") que incluye sialilación en $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ en donde el 60% o más de la sialilación total es sialilación en $\alpha 2,3$ y desde el 5 al 40% de la sialilación total es sialilación en $\alpha 2,6$; en donde la FSH recombinante tiene un contenido en ácido siálico [expresado en términos de una proporción de moles de ácido siálico respecto a moles de proteína] de 10 mol/mol a 15 mol/mol. La rFSH o preparación de rFSH pueden opcionalmente incluir además sialilación en $\alpha 2,8$.

25 En formas de realización de la invención, la rFSH puede estar presente como un única isoforma o como una mezcla de isoformas.

30 La rFSH según la invención tiene un contenido en ácido siálico [expresado en términos de una proporción de moles de ácido siálico respecto a moles de proteína] de entre 10 mol/mol y 15 mol/mol, por ejemplo entre 10 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo, entre 11 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo, entre 12 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo, entre 12 mol/mol y 13 mol/mol. La rFSH de la invención se puede producir o expresar en una línea celular humana.

35 La rFSH (o preparación de rFSH) según la invención tiene el 60% o más de la sialilación total que es sialilación en $\alpha 2,3$. Por ejemplo, el 70, 80 o 90% o más de la sialilación total puede ser sialilación en $\alpha 2,3$. La rFSH puede incluir sialilación en $\alpha 2,3$ en una cantidad que es desde el 65 al 85% de la sialilación total, por ejemplo del 70 al 80% de la sialilación total, del 71 al 79% de la sialilación total. La rFSH de la invención puede tener desde el 5 al 40% de la sialilación total que es sialilación en $\alpha 2,6$. La rFSH puede incluir sialilación en $\alpha 2,6$ que es desde el 15 al 35% de la sialilación total, por ejemplo desde el 20 al 30% de la sialilación total, por ejemplo desde el 21 al 29% de la sialilación total. La rFSH de la invención puede tener el 5% o menos de la sialilación total que es sialilación en $\alpha 2,8$. Por ejemplo el 2,5% o menos de la sialilación total puede ser sialilación en $\alpha 2,8$. La rFSH puede incluir sialilación en $\alpha 2,8$ en una cantidad que es desde el 0,1 al 4% de la sialilación total, por ejemplo desde el 0,5 al 3% de la sialilación total, por ejemplo, desde el 0,5 al 2,5% de la sialilación total. Mediante sialilación se quiere decir la cantidad de residuos siálicos presentes en las estructuras glucídicas de la FSH. La sialilación en $\alpha 2,3$ significa sialilación en la posición 2,3 (como se sabe bien en la técnica) y sialilación en $\alpha 2,6$ en la posición 2,6 (como se sabe bien en la técnica). Por tanto, el "% de la sialilación total que es sialilación en $\alpha 2,3$ " se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,3. El término "% de sialilación total que es sialilación en $\alpha 2,6$ " se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,6.

50 La FSH recombinante expresada en células de ovario de hámster chino (CHO) incluye exclusivamente sialilación en $\alpha 2,3$ (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990).

55 La rFSH de la invención se puede producir o expresar en una línea celular humana. Esto puede simplificar (y hacer más eficaz) el método de producción porque la manipulación y control de, por ejemplo, el medio de crecimiento celular para retener la sialilación puede ser menos crítico que con procesos conocidos. El método también puede ser más eficaz porque hay poca rFSH básica producida que en la producción de productos de rFSH conocidos; se produce rFSH más ácida y la separación/eliminación de FSH básica es menos problemática. La rFSH se puede producir o expresar en una línea de células Per.C6, una línea celular derivada de Per.C6 o una línea de células Per.C6 modificada. La línea celular se puede modificar usando $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa. La línea celular se puede
60 modificar usando $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa. Alternativa o adicionalmente, la rFSH puede incluir ácidos siálicos unidos en $\alpha 2,6$ (sialilación en $\alpha 2,6$) proporcionados por la actividad sialiltransferasa endógena [de la línea celular].

65 La rFSH se puede producir usando $\alpha 2,3$ - y/o $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa. La rFSH se puede producir usando $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa. La rFSH puede incluir ácidos siálicos unidos en $\alpha 2,6$ (sialilación en $\alpha 2,6$) proporcionados por la actividad sialiltransferasa endógena.

Según la presente invención en un aspecto adicional se proporciona un método de producción de rFSH como se describe en el presente documento (según aspectos de la invención) que comprende el paso de producir o expresar la rFSH en una línea celular humana, por ejemplo una línea celular Per.C6, una línea celular derivada de Per.C6 o una línea celular Per.C6 modificada, por ejemplo una línea celular que se ha modificado usando α 2,3-sialiltransferasa.

La estructura de rFSH contiene fracciones de glicano. Se pueden producir ramificaciones con el resultado que el glicano puede tener 1, 2, 3, 4 o más residuos de azúcares terminales o "antenas", como se sabe bien en la técnica. La rFSH de la invención puede tener glicanos con presencia de sialilación en estructuras monoantennarias y/o diantennarias y/o triantennarias y/o tetrantennarias. La rFSH puede incluir preferiblemente estructuras de glicano monosialilado, disialilado, trisialilado y tetrasialilado con cantidades relativas como sigue: 9-15% monosialilado, 27-30% disialilado, 30-36% trisialilado y 25-29% tetrasialilado (por ejemplo, como se muestra por análisis WAX de glicanos cargados, como se explica en el ejemplo 8 c).

Según la presente invención en un aspecto adicional se proporciona una composición farmacéutica que comprende rFSH que incluye sialilación en α 2,3 y sialilación en α 2,6 en donde el 60% o más de la sialilación total es sialilación en α 2,3 y desde el 5 al 40% de la sialilación total es sialilación en α 2,6; y que tiene un contenido en ácido siálico [expresado en términos de una proporción de moles de ácido siálico respecto a moles de proteína] de 10 mol/mol a 15 mol/mol.

La composición farmacéutica puede comprender además hCG y/o LH.

Se puede obtener hCG por cualquier medio conocido en la técnica. hCG, como se usa en el presente documento, incluye hCG humana y recombinante. Se puede purificar hCG humana de cualquier fuente apropiada (por ejemplo, orina y placenta) por cualquier método conocido en la técnica. Los métodos de expresar y purificar hCG recombinante se conocen bien en la técnica.

Se puede obtener LH por cualquier medio conocido en la técnica. LH, como se usa en el presente documento, incluye LH humana y recombinante. Se puede purificar LH humana de cualquier fuente apropiada (por ejemplo, orina) por cualquier método conocido en la técnica. Los métodos de expresar y purificar LH recombinante se conocen bien en la técnica.

La composición farmacéutica puede ser para el tratamiento de infertilidad, por ejemplo, para uso en, por ejemplo, tecnologías de reproducción asistida (TRA), inducción de la ovulación o inseminación intrauterina (IIU). La composición farmacéutica se puede usar, por ejemplo, en indicaciones médicas donde se usan preparaciones de FSH conocidas. La presente invención también proporciona el uso de rFSH descrita en el presente documento (según aspectos de la invención) para, o en la fabricación de un medicamento para, el tratamiento de infertilidad.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular en composiciones bien conocidas para cualquier vía de administración de fármacos, por ejemplo, oral, rectal, parenteral, transdérmica (por ejemplo, tecnología de parches), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intrasusternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, pomadas o gotas) o como un aerosol yugal o nasal. Una composición típica comprende un soporte farmacéuticamente aceptable, tal como una solución acuosa, excipientes no tóxicos, incluyendo sales y conservantes, tampones y similares, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences decimoquinta edición (Matt Publishing Company, 1975), en las páginas 1405 a 1412 y 1481 -- 87, y el formulario nacional XIV decimocuarta edición (American Pharmaceutical Association, 1975) entre otros.

Los ejemplos de soportes, diluyentes, solventes o vehículos farmacéuticos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tal como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo.

Las composiciones de la presente invención también pueden contener aditivos tales como, pero no limitados a, conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También pueden estar incluidos agentes antibacterianos y antifúngicos para prevenir el crecimiento de microbios e incluyen, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Además, puede ser deseable incluir agentes isotónicos tal como azúcares, cloruro de sodio, y similares.

En algunos casos, para realizar una acción prolongada es deseable ralentizar la absorción de FSH (y otros principios activos, si están presentes) de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con mala solubilidad en agua. La velocidad de absorción de FSH depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño de los cristales y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retrasada de una forma de combinación de FSH administrada por vía parenteral se logra disolviendo o resuspendiendo la combinación de FSH en un vehículo oleaginoso.

Las formas en depósito inyectables se pueden hacer formando matrices microencapsuladas de FSH (y otros agentes, si están presentes) en polímeros biodegradables tal como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la proporción de FSH respecto al polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación de FSH. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen polivinilpirrolidona, poli(ortoésteres), poli(anhídridos) etc. Las formulaciones inyectables en depósito también se preparan atrapando la FSH en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales.

Las formulaciones se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de filtro que retiene bacterias, o incorporando agentes de esterilización en forma de composiciones estériles sólidas que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso. Las formulaciones inyectables se pueden suministrar en cualquier envase adecuado, por ejemplo, vial, jeringuilla ya rellena, cartuchos de inyección, y similares.

Las formulaciones inyectables se pueden suministrar como un producto que tiene composiciones farmacéuticas que contienen FSH (opcionalmente con hCG, LH, etc.). Si hay más de un principio activo (es decir, FSH y por ejemplo, hCG o LH) estos pueden ser adecuados para la administración por separado o juntos. Si se administran por separado, la administración puede ser secuencial. El producto se puede suministrar en cualquier envase adecuado. Por ejemplo, un producto puede contener un número de jeringas ya rellenas que contienen bien FSH, hCG o una combinación de tanto FSH como hCG, las jeringas embaladas en un blíster u otro medio para mantener la esterilidad. Un producto puede contener opcionalmente instrucciones para usar las formulaciones de FSH y hCG.

El pH y la concentración exacta de los varios componentes de la composición farmacéutica se ajustan según práctica de rutina en este campo. Véase, GOODMAN y GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7^a ed. En una forma de realización preferida, las composiciones de la invención se suministran como composiciones para la administración parenteral. Los métodos generales para la preparación de las formulaciones parenterales se conocen en la técnica y se describen en REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, anteriormente, en las páginas 780-820. Las composiciones parenterales se pueden suministrar en formulación líquida o como un sólido que se mezclará con un medio inyectable estéril justo antes de la administración. En una forma de realización especialmente preferida, las composiciones parenterales se suministran en formas farmacéuticas unitarias para la facilidad de administración y uniformidad de dosis.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos y a las figuras adjuntas en las que:

la figura 1 muestra un mapa plasmídico del vector de expresión pFSH α /beta;

la figura 2 muestra el vector de expresión de α 2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4);

la figura 3 muestra el vector de expresión de α 2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1);

la figura 4 muestra el isoelectroenfoque de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan establemente FSH;

la figura 5 muestra un ejemplo de clones analizados por isoelectroenfoque de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan establemente FSH después de manipularlas con α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa;

la figura 6 muestra el análisis de los enlaces de ácido siálico de Per.C6 FSH;

la figura 7 muestra los índices de depuración metabólica (MRC) de muestras de Per.C6 FSH;

la figura 8 muestra los MRC de muestras de Per.C6 FSH manipuladas con α 2,6-sialiltransferasa;

la figura 9 muestra los MRC de muestras de Per.C6 FSH manipuladas con α 2,6-sialiltransferasa;

la figura 10 muestra los MRC de muestras de Per.C6 FSH manipuladas con α 2,3-sialiltransferasa;

la figura 11 muestra el aumento de peso ovárico por clones de Per.C6 rFSH de Per.C6 rFSH parentales, según el método de Steelman y Pohley (1953);

la figura 12 muestra el aumento de peso ovárico por clones de Per.C6 rFSH de Per.C6 rFSH manipuladas (α 2,6-sialiltransferasa); y

la figura 13 muestra el aumento de peso ovárico por clones de Per.C6 rFSH de Per.C6 rFSH manipuladas (α 2,3-sialiltransferasa).

Selección de secuenciasFSH humana

5 Se usó la región codificante del gen para el polipéptido alfa de FSH según Fiddes y Goodman (1981). La secuencia está depositada como AH007338 y en el momento de construcción no había otras variantes de esta secuencia de proteína. La secuencia se denomina en el presente documento SEQ ID 1.

10 Se usó la región codificante del gen para el polipéptido beta de FSH según Keene *et al* (1989). La secuencia está depositada como NM_000510 y en el momento de construcción no había otras variantes de esta secuencia de proteína. La secuencia se denomina en el presente documento SEQ ID 2.

Sialiltransferasa

15 α 2,3-sialiltransferasa - Se usó la región codificante del gen para la beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 (α 2,3-sialiltransferasa, ST3GAL4) según Kitagawa y Paulson (1994). La secuencia está depositada como L23767 y se denomina en el presente documento SEQ ID 3.

20 α 2,6-sialiltransferasa - Se usó la región codificante del gen para la beta-galactósido alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (α 2,6-sialiltransferasa, ST6GAL1) según Grundman *et al.* (1990). La secuencia está depositada como NM_003032 y se denomina en el presente documento SEQ ID 4.

Ejemplos**Ejemplo 1. Construcción del vector de expresión de FSH**

La secuencia codificante del polipéptido alfa de FSH (AH007338, SEQ ID 1) y del polipéptido beta de FSH (NM_003032, SEQ ID 2) se amplificaron por PCR usando las combinaciones de cebadores FSHa-fw y FSHa-rev y FSHb-fw y FSHb-rec respectivamente.

35 FSHa-fw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGGATTACTACAGAAAAATATGC-3'
 FSHa-rev 5'-GGATGGCTAGCTTAAGATTTGTGATAATAAC-3'
 FSHb-fw 5'-CCAGGCGCGCCACCATGAAGACACTCCAGTTTTTC-3'
 FSHb-rev 5'-CCGGGTTAATTATTATTCTTTTCATTTACCAAAGG-3'

El ADN de FSH beta amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Ascl* y *HpaI* y se insertó en los sitios *Ascl* y *HpaI* en el vector de expresión de mamíferos dirigido por CMV que tiene un marcador de selección de neomicina. Similarmente, el ADN de FSH alfa se digirió con *BamHI* y *NheI* y se insertó en los sitios *BamHI* y *NheI* en el vector de expresión que ya contiene el ADN del polipéptido beta de FSH.

Se usó el ADN del vector para transformar la cepa DH5 α de *E. coli*. Se cogieron sesenta colonias para amplificación y cincuenta y siete contenían el vector que contiene FSH tanto alfa como beta. Se seleccionaron veinte de estas para secuenciación y todas contenían las secuencias correctas según SEQ ID 1 y SEQ ID 2. Se seleccionó el plásmido pFSH A+B#17 para transfección (figura 1).

Ejemplo 2. Construcción del vector de expresión de ST3

Se amplificó la secuencia de beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 (ST3, L23767, SEQ ID 3) por PCR usando la combinación de cebadores 2,3STfw y 2,3STrev.

2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3'
 2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'

55 El ADN de ST3 amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *AflI* y se insertó en los sitios *BamHI* y *AflI* del vector de expresión de mamíferos dirigido por CMV que tiene un marcador de resistencia a higromicina. El vector se amplificó como se ha descrito previamente y se secuenció. El clon pST3#1 (figura 2) contenía la secuencia correcta según SEQ ID 3 y se seleccionó para transfección.

Ejemplo 3. Construcción del vector de expresión de ST6

Se amplificó la secuencia de beta-galactósido alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (ST6, NM_003032, SEQ ID 4) por PCR usando la combinación de cebadores 2,6STfw y 2,6STrev.

65 2,6STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGATTCACACCAACCTGAAG-3'
 2,6STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTTAGCAGTGAATGGTCCGG-3'

El ADN de ST6 amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *A*flI y se insertó en los sitios *Bam*HI y *A*flI del vector de expresión de mamíferos dirigido por CMV que tiene un marcador de resistencia a higromicina. El vector se amplificó como se ha descrito previamente y se secuenció. El clon pST6#11 (figura 3) contenía la secuencia correcta según SEQ ID 4 y se seleccionó para transfección.

Ejemplo 4. Expresión estable de pFSH A+B en células PER.C6. Transfección, aislamiento y cribado de clones

Se generaron clones de Per.C6 que producen FSH que expresan ambas cadenas polipeptídicas de FSH a partir de un único plásmido (véase el ejemplo 1).

Para obtener clones estables un agente de transfección basado en liposomas con la construcción pFSH A+B. Se seleccionaron clones estables en VPRO suplementado con STF al 10% y que contenía G418. Tres semanas después de la transfección los clones resistentes a G418 crecieron. Se seleccionaron un total de 250 clones para aislamiento. Los clones aislados se cultivaron en medio de selección hasta el 70-80% de confluencia. Se ensayó el contenido de la proteína FSH de los sobrenadantes usando un ELISA selectivo de FSH y la actividad farmacológica en el receptor de FSH en la línea celular clonada, usando un ensayo de acumulación de AMPc. Se siguió adelante con los clones (98) que expresaban proteína funcional para expansión del cultivo a 24 pocillos, 6 pocillos y botellas T80.

Se iniciaron estudios para determinar la productividad y calidad del material de siete clones en botellas T80 para generar material suficiente. Las células se cultivaron en medio suplementado como se ha descrito previamente durante 7 días y el sobrenadante se recogió. Se determinó la productividad usando el ELISA selectivo para FSH. Se determinó el perfil isoeléctrico del material (figura 6). Se muestran muestras representativas en la figura 4. La información del IEF se usó para seleccionar clones para análisis de índice de depuración metabólica (ejemplo 9). Se seleccionaron clones (005, 104, 179, 223, 144) con suficiente productividad y calidad para manipulación con sialiltransferasa.

Ejemplo 5. El nivel de sialilación aumenta en células que sobreexpresan α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa. Expresión estable de pST3 o pST6 en células PER.C6 que expresan FSH; Transfección, aislamiento y cribado de clones

Se generaron clones de Per.C6 que producían FSH altamente sialilada expresando α 2,3-sialiltransferasa o α 2,6-sialiltransferasa de plásmidos separados (véanse los ejemplos 2 y 3) en células Per.C6 que ya expresan ambas cadenas polipeptídicas de FSH (véase el ejemplo 4). Se seleccionaron cuatro clones producidos de células PER.C6@ como se muestra en el ejemplo 4 por sus características incluyendo productividad, buen perfil de crecimiento, producción de proteína funcional y FSH producida que incluía algo de sialilación.

Se generaron clones estables como se ha descrito previamente en el ejemplo 4. Un total de 202 clones del programa de α 2,3-sialiltransferasa y 210 clones del programa de α 2,6-sialiltransferasa se aislaron, expandieron y ensayaron. El número final de clones para el estudio de α 2,3 fue 12 y 30 para el estudio de α 2,6.

Los clones de α 2,3-sialiltransferasa se adaptaron a medio sin suero y condiciones en suspensión.

Como los clones anteriores se ensayaron usando un ELISA selectivo de FSH, respuesta funcional en un línea celular con receptor de FSH, IEF (Ejemplo 6), índice de depuración metabólica (ejemplo 9) y análisis de Steelman Pohley (ejemplo 10). Los resultados se compararon a una FSH recombinante comercialmente disponible (Gonal-f, Serono) y al líneas células Per.C6 con FSH parentales. Se muestran muestras representativas en la figura 5. Algunos clones no demostraron un aumento en sialilación pero se puede ver que la FSH producida por la mayoría de los clones tiene sialilación significativamente mejorada (es decir, de media más isoformas de FSH con números altos de ácidos siálicos) comparada con FSH expresada sin α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa.

En conclusión, la expresión de FSH junto con sialiltransferasa en células Per.C6 produce niveles aumentados de FSH sialilada comparada con células que expresan solo FSH.

Ejemplo 6. Análisis del pI de isoformas de FSH producidas en Per.C6 mediante isoelectroenfoque

La electroforesis se define como el transporte de moléculas cargadas a través de un solvente mediante un campo eléctrico. La movilidad de una molécula biológica a través de un campo eléctrico dependerá de la fuerza del campo, la carga neta en la molécula, el tamaño y la forma de la molécula, la fuerza iónica y las propiedades del medio a través del cual migran las moléculas.

El isoelectroenfoque (IEF) es una técnica electroforética para la separación de proteínas basada en su pI. El pI es el pH al que la proteína no tiene carga neta y no migrará en un campo eléctrico. El contenido en ácido siálico de las isoformas de FSH altera sutilmente el punto de pI para cada isoforma, lo que se puede explotar usando esta técnica para visualizar la isoformas de Per.C6 FSH de cada clon.

Se analizaron los puntos isoeléctricos de las isoformas de FSH producidas en Per.C6 en sobrenadantes de cultivo celular usando isoelectroenfoque. Se produjo medio de cultivo celular de clones de Per.C6 FSH como se ha descrito en el ejemplo 4 y 5.

Las muestras de Per.C6 FSH se separaron en geles de IEF Novex® que contenían poliacrilamida al 5% en condiciones nativas en un gradiente de pH 3,0-7,0 en una solución de anfolitos de pH 3,0-7,0.

Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa apoyada y se visualizaron usando un anticuerpo monoclonal primario anti-FSH α , un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina y reactivo fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) y nitroazul de tetrazolio (NBT) para visualizar las bandas.

Como se indica en las figuras 4 y 5, las bandas representan isoformas de FSH que contienen diferentes números de moléculas de ácido siálico.

Usando este método se identificaron clones que producen isoformas de FSH con un número mayor de moléculas de ácido siálico. La manipulación con α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa produjo clones con más ácido siálico y un pI menor.

Ejemplo 7. Análisis de los enlaces de ácido siálico en Per.C6 FSH

Se analizaron glicoconjugados usando un método de diferenciación de glicano basado en lectina. Con este método se pueden caracterizar glicoproteínas y glicoconjugados unidos a nitrocelulosa. Las lectinas reconocen selectivamente una fracción particular, por ejemplo ácido siálico unido en α 2,3. Las lectinas aplicadas se conjugan con el hapteno esteroide digoxigenina que permite la detección inmunológica de las lectinas unidas.

Se separaron FSH de Per.C6 purificada de un clon parental (sin sialiltransferasa adicional), un clon manipulado con α 2,3-sialiltransferasa y un clon manipulado con α 2,6-sialiltransferasa usando técnicas de SDS-PAGE estándar. Una FSH recombinante comercialmente disponible (Gonal-f, Serono) se usó como patrón.

Se analizó el ácido siálico usando el kit DIG Glycan Differentiation (No. de catálogo 11 210 238 001, Roche) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones positivas con aglutinina de Sambucus nigra (SNA) indicaban ácido siálico unido terminalmente en (2-6). Las reacciones positivas con aglutinina II de Maackia amurensis (MAA) indicaban ácido siálico terminalmente unido en (α 2-3).

En resumen el clon parental 005 contenía niveles bajos de ácido siálico tanto en α 2,3 como en α 2,6. Los clones manipulados con α 2,3-sialiltransferasa contenían niveles altos de enlaces de ácido siálico α 2,3 y niveles bajos de enlaces de ácido siálico α 2,6. Los clones manipulados con α 2,6-sialiltransferasa contenían niveles altos de enlaces de ácido siálico α 2,6 y niveles bajos de enlaces de ácido siálico α 2,3. El control estándar Gonal-f solo contiene enlaces de ácido siálico α 2,3. Esto es consistente con lo que se sabe sobre las proteínas recombinantes producidas en células de ovario de hámster chino (CHO) (Kagawa *et al*, 1988, Takeuchi *et al*, 1988, Svensson *et al*, 1990).

En conclusión, la manipulación de células Per.C6 FSH con α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa aumentó con éxito el número de moléculas de ácido siálico conjugadas a la FSH en la muestra.

Ejemplo 8a. Cuantificación del ácido siálico total

El ácido siálico es un hidrato de carbono unido a proteína que se considera que es un monosacárido y se produce en combinación con otros monosacáridos como galactosa, manosa, glucosamina, galactosamina y fucosa.

El ácido siálico total en rFSH purificada (ejemplo 11) se midió usando un kit de cuantificación enzimática de ácido siálico según el protocolo del fabricante (Sigma, Sialic-Q). Brevemente, la ácido N-acetilneuramínico aldolasa cataliza ácido siálico a N-acetilmanoasina y ácido pirúvico. El ácido pirúvico se puede reducir a ácido láctico por β -NADH y láctico deshidrogenasa. La oxidación de B-NADH se puede medir de forma precisa espectrofotométricamente.

Se midió la concentración de proteína en placas de microtitulación usando un kit comercial de ensayo del ácido bicinconínico (BCA) (Sigma, B 9643) basado en el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951).

El contenido total de ácido siálico de Per.C6 FSH se midió y se encontró que era mayor que 6 mol/mol.

Ejemplo 8b. Cuantificación de cantidades relativas de ácido siálico en α 2,3, α 2,6 y α 2,8

Se midieron las cantidades de porcentaje relativo de ácido siálico en α 2,3, α 2,6 y α 2,8 en rFSH purificada (ejemplo 11) usando técnicas conocidas.

Cada muestra de rFSH se inmovilizó (bloque de gel), lavó, redujo, alquilo y digirió con PNGasa F durante la noche. Los N-glicanos se extrajeron y procesaron después. Se marcaron los N-glicanos para análisis de NP-HPLC y WAX-HPLC con el fluoróforo 2AB como se detalla en Royle et al. Los N-glicanos se corrieron en HPLC de fase normal (NP) en una columna TSK amida (como se detalla en Royle et al) con los tiempos de retención expresados en unidades de glucosa (UG).

Las muestras de los glicanos extraídos, juntados (extraídos como anteriormente) se digirieron con diferentes sialidasas para determinar los enlaces. NAN 1 (sialidasa recombinante) libera ácidos siálicos terminales no reductores unidos en α 2,3 (NeuNAc y NeuNGc), ABS (sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens*) libera ácidos siálicos terminales no reductores unidos en α 2,3, α 2,6 y α 2,8 (NeuNAc y NeuNGc). Las muestras se analizaron por NP-HPLC, para permitir la comparación de la muestra sin digerir con la digerida con NAN1 y la digerida con ABS. La comparación de las tres trazas de NP-HPLC (sin digerir, digerida con NAN1, digerida con ABS) muestra que la digestión con ABS y NAN1 da diferentes resultados. Esto indica que las muestras tienen ácidos siálicos con enlaces α 2,3, α 2,6 y α 2,8. Se calcularon los porcentajes relativos de estructuras presentes en el conjunto de glicanos sin digerir y se encontró que estaban en los intervalos 65%-85% (por ejemplo, 77,75%) para sialilación en α 2,3; del 15 al 35% (por ejemplo, 21,46%) para sialilación en α 2,6; y del 0,1 al 3% para sialilación en α 2,8.

Ejemplo 8c. Cuantificación de las cantidades relativas de estructuras sialiladas mono, di, tri y tetra antenarias

Se midieron las cantidades de porcentaje relativo de estructuras mono, di, tri y tetra sialiladas en glicanos extraídos de rFSH purificada (ejemplo 11) usando técnicas conocidas.

Cada muestra de rFSH se inmovilizó (bloque de gel), lavó, redujo, alquilo y digirió con PNGasa F durante la noche. Los N-glicanos se extrajeron y procesaron después. Se marcaron los N-glicanos para análisis de NP-HPLC y WAX-HPLC con el fluoróforo 2AB como se detalla en Royle et al.

Se llevó a cabo HPLC de intercambio aniónico débil (WAX) para separar los N-glicanos por carga (ejemplo 8b) como se muestra en Royle et al, con un estándar de fetuina N-glicano como referencia. Los glicanos eluyeron según el número de ácidos siálicos que contenían. Todas las muestras incluían estructuras mono (1S), di (2S), tri (3S) y tetra (4S) sialiladas. Se encontró que las cantidades relativas de las estructuras sialiladas estaban los siguientes intervalos (1S:2S:4S:4S): 9-15%, 27-30%, 30-36%, 25-29% (por ejemplo, 10,24:28,65:35,49:25,62).

Ejemplo 9. Determinación de los índices de depuración metabólica de rFSH

Para determinar el índice de depuración metabólica (MCR) de muestras de Per.C6 FSH se inyectaron ratas hembras conscientes (3 animales por clon) en la vena de la cola en el tiempo cero con una inyección intravenosa rápida de rFSH (1-10 μ g/rata, basado en la cuantificación por ELISA de las muestras, DRG EIA 1288). Se sacaron muestras de sangre (400 μ l) de la punta de la cola 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 32 horas después de la inyección de la muestra de prueba. El suero se recogió por centrifugación y se evaluó el contenido de FSH por ELISA (DRG EIA 1288).

El receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R) reconoce glicoproteínas desialiladas (terminadas en galactosa) tal como asialofetuina (ASF) (Pricer y Ashwell, 1971, Van Lenten y Ashwell, 1972). El receptor de ASGP y la glicoproteína desialilada unida se internalizan en la célula donde el receptor se recicla y el ligando se degrada (Regoeczi et al, 1978, Steer y Ashwell, 1980).

Para investigar si el material de Per.C6 FSH se depuraba a través de este mecanismo, el ASGP-R se saturó con asialofetuina. El índice de depuración metabólica de material parental o manipulado con α 2,6 o α 2,3-sialiltransferasa se determinó como se ha descrito con la coadministración de un mínimo de exceso molar de 7500 veces de asialofetuina para saturar el ASGP-R durante 1-2 horas.

El material producido por los clones parentales de Per.C6 FSH contenía parte de material de MCR más prolongado pero un alto porcentaje se depuró rápidamente (figura 7). El clon cabeza de serie 005 que contenía el material más sialilado se manipuló usando α 2,6 o α 2,3-sialiltransferasa (ejemplo 5). Aunque los clones manipulados con α 2,6-sialiltransferasa demostraron sialilación aumentada (figura 5) no había mejora en el MCR (figura 7). El bloqueo de ASGR restableció el MCR del material α 2,6 al del estándar lo que demuestra que incluso con enlaces α 2,6 aumentados el material se depura rápidamente (figura 8). La manipulación con α 2,3-sialiltransferasa produjo clones con MCR comparable al estándar (figura 9) y el contenido siálico variable era consistente con lo que se sabe para las isoformas de FSH (figura 10).

Ejemplo 10. Ensayo *in vivo* de Steelman-Pohley

Para demostrar que el contenido creciente en ácido siálico en FSH produce un efecto biológico aumentado, se examinó el aumento en los pesos ováricos en ratas por FSH altamente sialilada tal como la producida en el ejemplo 5.

El aumento en los pesos ováricos debido a los clones de Per.C6 rFSH se analizó según el método de Steelman y Pohley (1953). Se cuantificó rFSH de Per.C6 de muestras de medio celular filtrado por ELISA (DRG, EIA-1288). Las muestras (rFSH de Per.C6) y estándares (rFSH de Gonad-f) se probaron a cinco dosis diferentes (3 animales/dosis). Gonad-f se administró a 50, 100, 200, 400 y 800 ng/rata. Las dosis de las muestras se calcularon usando sus valores de AUC relativos a Gonad-f, típicamente 0,005-10 µg/rata.

En conclusión, el material subsialilado producido por los clones Per.C6 FSH parentales (figura 11) no era tan potente en el ensayo de aumento del peso ovárico como la rFSH comercialmente disponible. La manipulación con sialiltransferasa para añadir enlaces α 2,6 adicionales aumentó el contenido de ácido siálico pero no mejoró la potencia en el ensayo *in vivo* (figura 12).

Sin embargo, enlaces α 2,3 adicionales mejoraron significativamente la potencia (figura 13) y las dos preparaciones de FSH recombinante (derivadas de Per.C6 y CHO) muestran perfiles muy similares en este ensayo.

15 Ejemplo 11. Visión de conjunto de la producción y purificación

Se desarrolló un procedimiento para producir FSH en células PER.C6 que se cultivaron en suspensión en medio sin suero. El procedimiento se describe a continuación y se aplicó a varias líneas celulares PER.C6 productoras de FSH.

Se preparó FSH del clon parental 005, del clon de α 2,3 007, y del clon de α 2,6 059 usando una modificación del método descrito por Lowry *et al.* (1976).

Para la producción de PER.C6-FSH, las líneas celulares se adaptaron a un medio sin suero, es decir, Excell 525 (JRH, Biosciences). Las células se cultivaron primero para formar una monocapa confluyente al 70%-90% en una botella de cultivo T80. Al pasarlas las células se resuspendieron en el medio sin suero, Excell 525 + L-glutamina 4 mM, a una densidad celular de $0,3 \times 10^6$ células/ml. Se puso una suspensión celular de 25 ml en una botella agitadora de 250 ml y se agitó a 100 rpm a 37°C en CO₂ al 5%. Después de alcanzar una densidad celular de $> 1 \times 10^6$ células/ml, las células se subcultivaron a una densidad celular de 0,2 o $0,3 \times 10^6$ células/ml y se cultivaron adicionalmente en botellas agitadoras a 37°C, CO₂ al 5% y 100 rpm.

Para la producción de FSH, las células se transfirieron a un medio de producción sin suero, es decir, VPRO (JRH, Biosciences), que soporta el crecimiento de células PER.C6 a densidades celulares muy altas (habitualmente $> 10^7$ células/ml en un cultivo por lotes). Las células primero se cultivaron a $> 1 \times 10^6$ células/ml en Excell 525, después se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm y posteriormente se resuspendieron en medio VPRO + L-glutamina 6 mM a una densidad de 1×10^6 células/ml. Las células se cultivaron después en una botella agitadora durante 7-10 días a 37°C, CO₂ al 5% y 100 rpm. Durante este periodo, las células crecieron a una densidad $> 10^7$ células/ml. El medio de cultivo se recogió después de que la viabilidad celular empezara a decaer. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 100 rpm y el sobrenadante se usó para la cuantificación y purificación de FSH. La concentración de FSH se determinó usando ELISA (DRG EIA 1288).

Después de ello, la purificación de FSH se llevó a cabo usando una modificación del método descrito por Lowry *et al.* (1976). Esto se logró por cromatografía en DEAE celulosa, filtración en gel en Sephadex G100, cromatografía de adsorción en hidroxapatita, y electroforesis en poliacrilamida preparativa.

Durante todos los procedimientos cromatográficos, la presencia de FSH inmunorreactiva se confirmó por RIA (DRG EIA 1288) e IEF (ejemplo 6).

50 Referencias

Andersen CY, Westergaard LG, y van Wely M. (2004). FSH isoform composition of commercial gonadotrophin preparations: a neglected aspect? *Reprod Biomed Online*. **9(2)**, 231-236.

Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A, y Lopez FJ. (1997) Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol*. **11(5)**, 517-526.

Baenziger JU y Green ED. (1988). Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta*. **947(2)**, 287-306.

Bassett RM, y Dribergen R. (2005). Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. *Reprod Biomed Online*. **10(2)**, 169-177.

- Damián-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sánchez-Hernández C, Timossi C, y Ulloa-Aguirre A. (1999). Oestrogens regulate pituitary alpha2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol.* **23(2)**, 153-165.
- 5 D'Antonio M., Borrelli F. , Datola A., Bucci R. , Mascia M. , Polletta P., Piscitelli D., y Papoian R. (1999) Biological characterization of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms. *Human Reproduction* **14**, 1160-1167
- Dalpathado DS, Irungu J, Go EP, Butnev VY, Norton K, Bousfield GR, y Desaire H. (2006). Comparative glycomics of the glycoprotein folliclestimulating hormone: glycopeptide analysis of isolates from two mammalian species. *Biochemistry.* **45(28)**, 8665-8673. Sin copia
- 10
- Dias JA, Van Roey P. (2001). Structural biology of human follitropin and its receptor. *Arch Med Res.* **32(6)**, 510-519
- Fiddes, J. C. y Goodman, H. M. (1979) Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 281, 351-356.
- 15
- Flack, M.R., Bennet, A.P., Froehlich, J. Anasti, JN y Nisula, B. (1994). Increased biological activity due to basic isoforms in recombinant human follicle-stimulating hormone produced in a human cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 756-760
- 20
- Fox KM, Dias JA, y Van Roey P. (2001). Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol.* **15(3)**, 378-89
- Grabenhorst E, Hoffmann A, Nimtz M, Zettlmeissl G, y Conradt HS. (1995). Construction of stable BHK-21 cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal(beta 1-4)GlcNAc-R alpha 2,6- sialyltransferase alpha 2,6-linked NeuAc is preferentially attached to the Gal(beta 1-4)GlcNAc(beta 1-2)Man(alpha 1-3)-branch of diantennary oligosaccharides from secreted recombinant beta-trace protein. *Eur J Biochem.* **232(3)**, 718-25.
- 25
- Green ED y Baenziger JU. (1988). Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem.* **263(1)**, 36-44.
- 30
- Grundmann,U., Nerlich,C., Rein,T. y Zettlmeissl, G. (1990). Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6- sialyltransferase. *G Nucleic Acids Res.* **18 (3)**, 667
- 35
- Howles, C.M. (1996). Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Hum Reprod. Update*, **2**,172-191.
- Kagawa Y, Takasaki S, Utsumi J, Hosoi K, Shimizu H, Kochibe N, y Kobata A. (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human interferon-beta 1 and recombinant human interferon-beta 1 produced by three different mammalian cells. *J Biol Chem.* **263(33)**, 17508-17515.
- 40
- Keene, J.L., Matzuk, M.M., Otani, T., Fauser, B,C,J,M., Galway, A.B., Hsueh, A.J.W. y Boime, I. (1989). Expression of Biologically active Human Follitropin in Chinese Hamster Ovary Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **264(9)**, 4769-4775.
- 45
- Kitagawa,H. y Paulson,J.C (1994) Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J. Biol. Chem.* **269(2)**, 1394-1401.
- Lee EU, Roth J, y Paulson JC (1989) Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem.* **264(23)**, 13848-13855.
- 50
- de Leeuw, R., Mulders, J., Voortman, G. Rombout, F. Damm, J. y Kloosterboer, L. (1996) Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Mol. Hum. Reprod.*, **2**, 361-369.
- 55
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193(1)**, 265-75.
- Lowry, PJ, McLean, C, Jones RL y Satgunasingam N. (1976) Purification of anterior pituitary and hypothalamic hormones *Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol).* **7**, 16-21.
- 60
- Pierce JG, y Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function *Annu Rev Biochem.* **50**, 465-495.
- Pricer WE Jr, y Ashwell G. (1971). The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem.* **246(15)**, 4825-33.
- 65

- Rathnam P, y Saxena BB. (1975). Primary amino acid sequence of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit. *J Biol Chem.*:**250(17)**:6735-6746.
- 5 Regoeczi E, Debanne MT, Hatton MC, y Koj A. (1978) Elimination of asialofetuin and asialoorosomucoid by the intact rat. Quantitative aspects of the hepatic clearance mechanism. *Biochim Biophys Acta.* **541(3)**, 37284.
- Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA y Rudd PM (2006) *Methods in Molecular Biology*, ed I Brockhausen-Schutzbach (Humana Press), 347: Glycobiology protocols, 125-144.
- 10 Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Calvo FO y Vutyavanich T. (1987). Structure-function relationships of gonadotropins. *Recent Prog Horm Res.*:**43**.:383-429.
- Saxena BB y Rathnam P. (1976) Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. *J Biol Chem.* **251(4)**, 993-1005
- 15 Steelman SL, y Pohley FM. (1953) Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* **53(6)**, 604-616.
- Steer CJ, y Ashwell G. (1980) Studies on a mammalian hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins. Evidence for receptor recycling in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* **255(7)**, 3008-13.
- 20 Svensson EC, Soreghan B, y Paulson JC. (1990) Organization of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation. *J Biol Chem.* 265(34):20863-20868.
- 25 Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N, y Kobata A (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* **263(8)**, 3657-3663.
- Timossi CM, Barrios de Tomasi J, Zambrano E, González R, Ulloa-Aguirre A. (1998). A naturally occurring basically charged human follicle-stimulating hormone (FSH) variant inhibits FSH-induced androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator enzyme activity in vitro. *Neuroendocrinology.* **67(3)**, 153-163.
- 30 Timossi CM, Barrios-de-Tomasi J, González-Suárez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM, y Ulloa-Aguirre A. (2000). Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol.* **165(2)**, 193-205.
- 35 Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damian-Matsumura, P. y Chappel, S.C. (1988) Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum. Reprod.* **3**, 491-501.
- 40 Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damián-Matsumura, P. Jimenez, M, Zambrano, E y Diaz-Sanchez, V. (1992) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.* **7**, 23-30.
- Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr, Beitins IZ, y Padmanabhan V. (1995). Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev.***16(6)**, 765-787.
- 45 Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P, y Timossi C (2001). Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res.* **32(6)**, 520-532.
- 50 Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A, y Nayudu P. (2003). Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *Biol Reprod.* **69(2)**, 379-389.
- Van Lenten L, y Ashwell G. (1972) The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. Development of a quantitative inhibition assay. *J Biol Chem.* **247(14)**, 4633-40.
- 55 Wide, L. y Albertsson-Wikland, K. (1990) Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 271-276.
- 60 Wide, L. y Bakos, O. (1993). More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 885-889.
- Wide L, Naessén T, Sundström-Poromaa I, Eriksson K. (2007) Sulfonation and sialylation of gonadotropins in women during the menstrual cycle, after menopause, and with polycystic ovarian syndrome and in men. *J Clin Endocrinol Metab.*:**92(11)**, 4410-4417.
- 65

Zambrano E, Zariñán T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J, y Ulloa-Aguirre A. (1999). Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants. *Endocrine*. **10(2)**, 113-121.

- 5 Zhang X, Lok SH, y Kon OL (1998) Stable expression of human alpha2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. *Biochim Biophys Acta*. **1425(3)**, 441-452.

Listado de secuencias

10 **SEQ ID 1**

Polipéptido alfa de la hormona foliculoestimulante

Número de acceso AH007338

15 Secuencia de nucleótidos de FSH alfa

```

1  ATGGATTACT  ACAGAAAATA  TGCAGCTATC  TTTCTGGTCA  CATTGTCGGT
GTTTCTGTCAT
61  GTTCTCCATT  CCGCTCCTGA  TGTGCAGGAT  TGCCCAGAAT  GCACGCTACA
GGAAAACCCA
121  TTCTTCTCCC  AGCCGGGTGC  CCCAATACTT  CAGTGCATGG  GCTGCTGCTT
CTCTAGAGCA
181  TATCCCACTC  CACTAAGGTC  CAAGAAGACG  ATGTTGGTCC  AAAAGAACGT
CACCTCAGAG
241  TCCACTTGCT  GTGTAGCTAA  ATCATATAAC  AGGGTCACAG  TAATGGGGGG
TTTCAAAGTG
301  GAGAACCA  CGGCGTGCCA  CTGCAGTACT  TGTTATTATC  ACAAATCTTA  A
    
```

20 Secuencia de proteína de FSH alfa

```

1  MKTLQFFFLF  CCWKAICNS  CELTNITIAI  EKEECRFCS  INTTWCAGYC
YTRDLVYKDP
61  ARPKIQTCT  FKELVYETVR  VPGCAHHADS  LYTPVATQC  HCGKCDSDST
DCTVRGLGPS
121  YCSFGEMKE
    
```

SEQ ID 2

25 Polipéptido beta de la hormona foliculoestimulante

Número de acceso NM_000510

30 Secuencia de nucleótidos de FSH beta

```

1  ATGAAGACAC  TCCAGTTTTT  CTCCTTTTC  TGTGCTGGA  AAGCAATCTG
CTGCAATAGC
61  TGTGAGCTGA  CCAACATCAC  CATTGCAATA  GAGAAAGAAG  AATGTCGTTT
CTGCATAAGC
    
```

ES 2 468 318 T3

121 ATCAACACCA CTTGGTGTGC TGGCTACTGC TACACCAGGG ATCTGGTGTA
 TAAGGACCCA
 181 GCCAGGCCCA AAATCCAGAA AACATGTACC TTCAAGGAAC TGGTATATGA
 AACAGTGAGA
 241 GTGCCCGGCT GTGCTCACCA TGCAGATTCC TTGTATACAT ACCCAGTGGC
 CACCCAGTGT
 301 CACTGTGGCA AGTGTGACAG CGACAGCACT GATTGTACTG TCGGAGGCCT
 GGGGCCAGC
 361 TACTGCTCCT TTGGTGAAAT GAAAGAATAA

Secuencia de proteína de FSH beta

1 MKTLQFFFLF CCWKAICNS CELTNITIAI EKEECRFCIS INTTWCAGYC
 YTRDLVYKDP
 61 ARPKIQTCT FKELVYETVR VPGCAHHADS LYTPVATQC HCGKCDSDST
 DCTVRGLGPS
 121 YCSFGEMKE

5

SEQ ID 3

Beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4

10

Número de acceso L23767

Secuencia de nucleótidos de ST3GAL4

1 ATGTGTCCTG CAGGCTGGAA GCTCCTGGCC ATGTTGGCTC TGGTCCTGGT
 CGTCATGGTG
 61 TGGTATTCCA TCTCCCGGGA AGACAGGTAC ATCGAGCTTT TTTATTTTCC
 CATCCCAGAG
 121 AAGAAGGAGC CGTGCCTCCA GGGTGAGGCA GAGAGCAAGG CCTCTAAGCT
 CTTTGGCAAC
 181 TACTCCCGGG ATCAGCCCAT CTTCTGCGG CTTGAGGATT ATTTCTGGGT
 CAAGACGCCA
 241 TCTGCTTACG AGCTGCCCTA TGGGACCAAG GGGAGTGAGG ATCTGCTCCT
 CCGGGTGCTA
 301 GCCATCACCA GCTCCTCCAT CCCCAAGAAC ATCCAGAGCC TCAGGTGCCG
 CCGCTGTGTG
 361 GTCGTGGGGA ACGGGCACCG GCTGCGGAAC AGCTCACTGG GAGATGCCAT
 CAACAAGTAC

15

ES 2 468 318 T3

421 GATGTGGTCA TCAGATTGAA CAATGCCCCA GTGGCTGGCT ATGAGGGTGA
CGTGGGCTCC
481 AAGACCACCA TGGCTCTCTT CTACCCTGAA TCTGCCCACT TCGACCCCAA
AGTAGAAAAC
541 AACCCAGACA CACTCCTCGT CCTGGTAGCT TTCAAGGCAA TGGACTTCCA
CTGGATTGAG
601 ACCATCCTGA GTGATAAGAA GCGGGTGCGA AAGGGTTTCT GGAAACAGCC
TCCCCTCATC
661 TGGGATGTCA ATCCTAAACA GATTCCGATT CTCAACCCTT TCTTCATGGA
GATTGCAGCT
721 GACAAACTGC TGAGCCTGCC AATGCAACAG CCACGGAAGA TTAAGCAGAA
GCCACCACG
781 GGCCTGTTGG CCATCACGCT GGCCCTCCAC CTCTGTGACT TGGTGCACAT
TGCCGGCTTT
841 GGCTACCCAG ACGCCTACAA CAAGAAGCAG ACCATTCACT ACTATGAGCA
GATCACGCTC
901 AAGTCCATGG CGGGGTCAGG CCATAATGTC TCCAAGAGG CCCTGGCCAT
TAAGCGGATG
961 CTGGAGATGG GAGCTATCAA GAACCTCACG TCCTTCTGA

Secuencia de proteína de ST3GAL4

1 MCPAGWKLLA MLALVLVVMV WYSISREDRY IELFYFPIPE KKEPCLQGEA
ESKASKLFGN
61 YSRDQPIFLR LEDYFWVKTP SAYELPYGTK GSEDLRLRVL AITSSSIPKN
IQSLRCRRCV
121 VVGNGHRLRN SSLGDAINKY DVVIRLNNAP VAGYEGDVGS KTTMRLFYPE
SAHFDPKVEN
181 NPDTLVLVA FKAMDFHWIE TILSDKKRVR KGFWKQPPLI WDVNPKQIRI
LNPFMEIAA
241 DKLLSLPMQQ PRKIKQKPTT GLLAITLALH LCDLVHIAGF GYPDAYNKKQ
TIHYEQITL
301 KSMAGSGHNV SQEALAIKRM LEMGAIKNLT SF

5

SEQ ID 4

Beta-galactósido alfa-2,6-sialiltransferasa 1

10

Número de acceso NM_003032

Secuencia de nucleótidos de ST6GAL1

ES 2 468 318 T3

1 ATGATTCACA CCAACCTGAA GAAAAAGTTC AGCTGCTGCG TCCTGGTCTT
 TCTTCTGTTT
 61 GCAGTCATCT GTGTGTGGAA GGAAAAGAAG AAAGGGAGTT ACTATGATTC
 CTTTAAATTG
 121 CAAACCAAGG AATCCAGGT GTTAAAGAGT CTGGGGAAAT TGGCCATGGG
 GTCTGATTCC
 181 CAGTCTGTAT CCTCAAGCAG CACCCAGGAC CCCACAGGG GCCGCCAGAC
 CCTCGGCAGT
 241 CTCAGAGGCC TAGCCAAGGC CAAACCAGAG GCCTCCTTCC AGGTGTGGAA
 CAAGGACAGC
 301 TCTTCCAAAA ACCTTATCCC TAGGCTGCAA AAGATCTGGA AGAATTACCT
 AAGCATGAAC
 361 AAGTACAAAG TGTCTACAA GGGGCCAGGA CCAGGCATCA AGTTCAGTGC
 AGAGGCCCTG
 421 CGCTGCCACC TCCGGGACCA TGTGAATGTA TCCATGGTAG AGGTCACAGA
 TTTCCCTTC
 481 AATACCTCTG AATGGGAGGG TTATCTGCCC AAGGAGAGCA TTAGGACCAA
 GGCTGGGCCT
 541 TGGGGCAGGT GTGCTGTGT GTCGTCAGCG GGATCTCTGA AGTCCTCCCA
 ACTAGGCAGA
 601 GAAATCGATG ATCATGACGC AGTCCTGAGG TTTAATGGGG CACCCACAGC
 CAACTTCCAA
 661 CAAGATGTGG GCACAAAAAC TACCATTGCG CTGATGAACT CTCAGTTGGT
 TACCACAGAG
 721 AAGCGCTTCC TCAAAGACAG TTTGTACAAT GAAGGAATCC TAATTGTATG
 GGACCCATCT
 781 GTATACCACT CAGATATCCC AAAGTGGTAC CAGAATCCGG ATTATAATTT
 CTTTAACAAC
 841 TACAAGACTT ATCGTAAGCT GCACCCCAAT CAGCCCTTTT ACATCCTCAA
 GCCCCAGATG
 901 CCTGGGAGC TATGGGACAT TCTTCAAGAA ATCTCCCAG AAGAGATTCA
 GCCAAACCCC
 961 CCATCCTCTG GGATGCTTGG TATCATCATC ATGATGACGC TGTGTGACCA
 GGTGGATATT
 1021 TATGAGTTCC TCCCATCCAA GCGCAAGACT GACGTGTGCT ACTACTACCA
 GAAGTTCTTC
 1081 GATAGTGCCT GCACGATGGG TGCCTACCAC CCGCTGCTCT ATGAGAAGAA
 TTTGGTGAAG
 1141 CATCTCAACC AGGGCACAGA TGAGGACATC TACCTGCTTG GAAAAGCCAC
 ACTGCCTGGC
 1201 TTCCGGACCA TTCACTGCTA A

Op-

5

Secuencia de proteína de ST6GAL1

ES 2 468 318 T3

1 MIHTNLKKKF SCCVLVFLLF AVICVWKEKK KGSYYDSFKL QTKEFQVLKS
LGKLAMGSDS
61 QSVSSSSTQD PHRGRQTLGS LRGLAKAKPE ASFQVWNKDS SSKNLIPRLQ
KIWKNYLSMN
121 KYKVSYKPG PGIKFSAEAL RCHLRDHVNV SMVEVTDFPF NTSEWEGYLP
KESIRTKAGP
181 WGRCAVSSA GSLKSSQLGR EIDDHDAVLR FNGAPTANFQ QDVGTKTTIR
LMNSQLVTTE
241 KRFLKDSLYN EGILIVWDPS VYHSDIPKWY QNPDYNFNN YKTYRKLHPN
QPFYILKPQM
301 PWELWDILQE ISPEEQPNP PSSGMLGIII MMTLCDQVDI YEFLPSKRKT
DVCYYYQKFF
361 DSACTMGAYH PLYEKNLVK HLNQGTDEDI YLLGKATLPG FRTIHC

REIVINDICACIONES

- 5 1. FSH recombinante (rFSH) que incluye sialilación en $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ en donde el 60% o más de la sialilación total es sialilación en $\alpha 2,3$ y desde el 5 al 40% de la sialilación total es sialilación en $\alpha 2,6$; en donde la FSH recombinante tiene un contenido en ácido siálico [expresado en términos de una proporción de moles de ácido siálico respecto a moles de proteína] de 10 mol/mol a 15 mol/mol.
2. FSH recombinante según la reivindicación 1 que incluye además sialilación en $\alpha 2,8$.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende rFSH que incluye sialilación en $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ en donde el 60% o más de la sialilación total es sialilación en $\alpha 2,3$ y desde el 5 al 40% de la sialilación total es sialilación en $\alpha 2,6$; y que tiene un contenido en ácido siálico [expresado en términos de una proporción de moles de ácido siálico respecto a moles de proteína] de 10 mol/mol a 15 mol/mol.
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende rFSH según la reivindicación 2.
5. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3 o 4 que comprende además hCG y/o LH.
- 20 6. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 para su uso en el tratamiento de la infertilidad.
7. Un método de producción de rFSH según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende el paso de producir o expresar la rFSH en una línea celular humana.

Figuras 1, 2 y 3: Mapas plasmídicos de los vectores de expresión pFSHalfa/beta, pST3 y pST6. CMV = promotor del citomegalovirus, BGHp(A) = secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, f1 ori = origen de replicación f1, SV40 = promotor del virus simio 40, Neo = marcador de resistencia a neomicina, Hyg = marcador de resistencia a higomicina, SV40 p(A) = secuencia de poliadenilación del virus simio 40, FSH A = polipéptido alfa de la hormona foliculoestimulante, FSH B = polipéptido beta de la hormona foliculoestimulante, ST3GAL4 = α 2,3-sialiltransferasa, ST6GAL1 = α 2,6-sialiltransferasa, ColE1 = origen de replicación ColE1, Amp = marcador de resistencia a ampicilina.

Figura 1. Vector de expresión de FSH

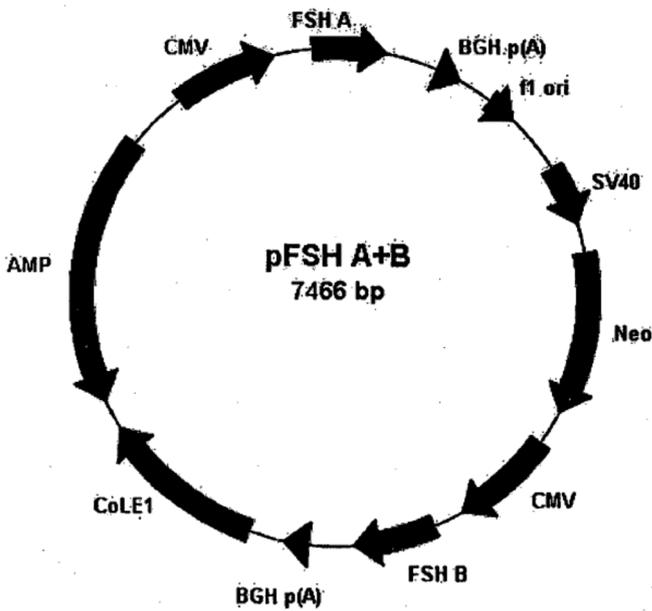


Figura 2. Vector de expresión de α 2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4)

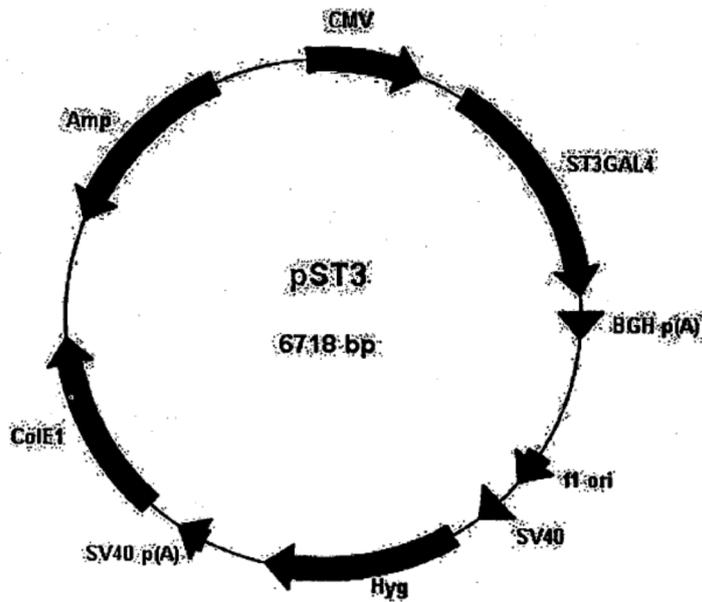


Figura 3. Vector de expresión de α 2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1)

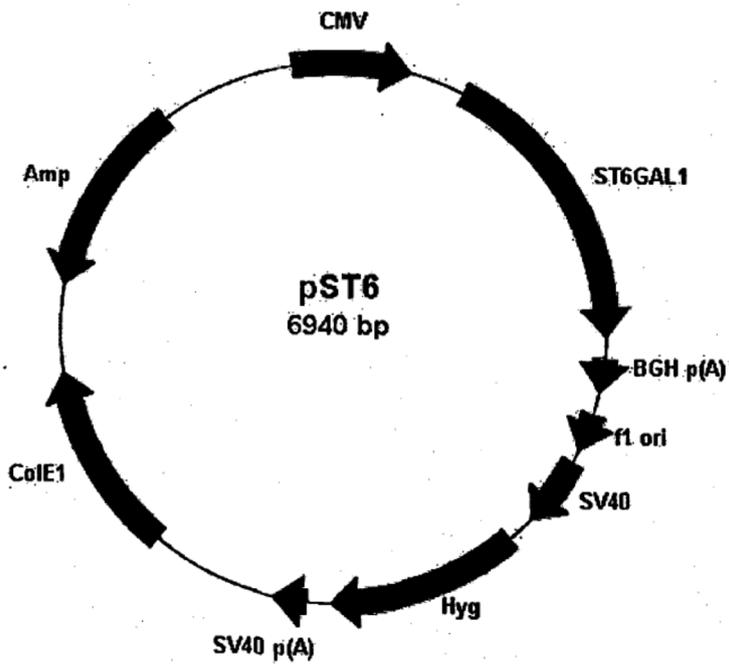


Figura 4. Isoelectroenfoque de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan establemente FSH. Sobrenadantes de cultivos celulares separados en condiciones nativas en un gradiente de pH de 3,0-7,0. El clon 005 es representativo de los cinco clones con los que se avanza para la manipulación de sialiltransferasa. Los clones que contienen formas menos ácidas se desecharon.

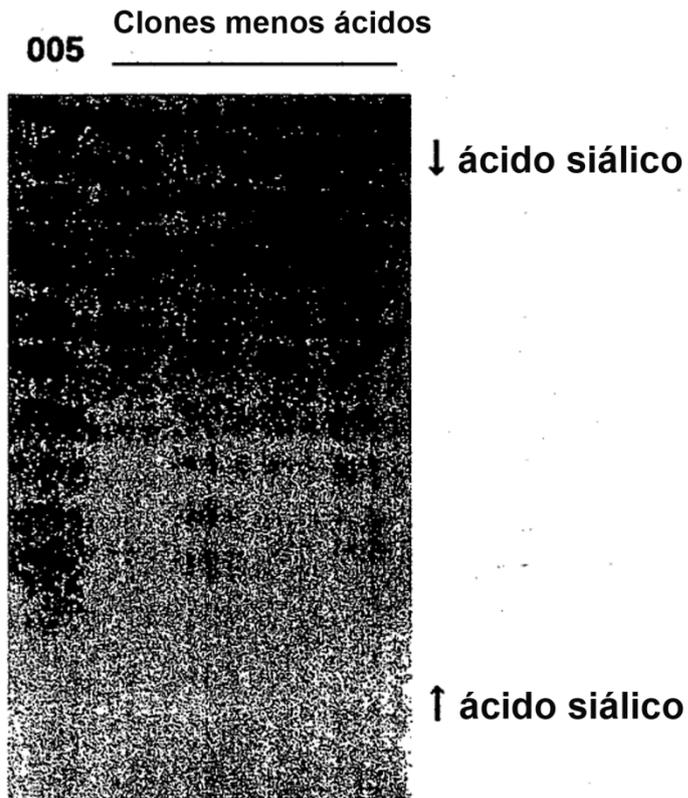


Figura 5. Ejemplo de clones analizados por isoelectroenfoque de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan establemente FSH después de manipularlas con α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa. Sobrenadantes de cultivos celulares separados en condiciones nativas en un gradiente de pH de 3,0-7,0. El clon 005 es la línea Per.C6 FSH parental. Los clones que muestran perfiles básicos o mezcla se abandonaron (*). Los clones restantes demostraron manipulación exitosa con una sialiltransferasa para aumentar el número de moléculas de ácido siálico en FSH.

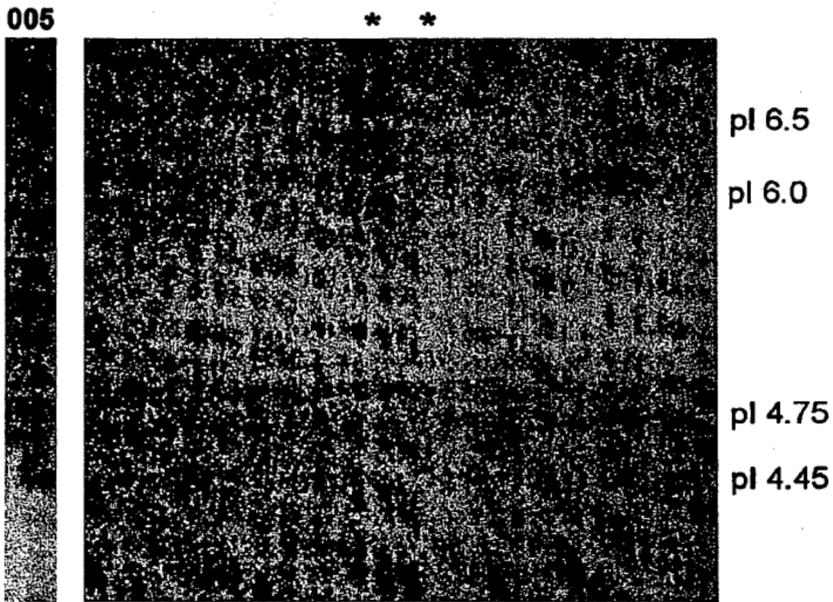
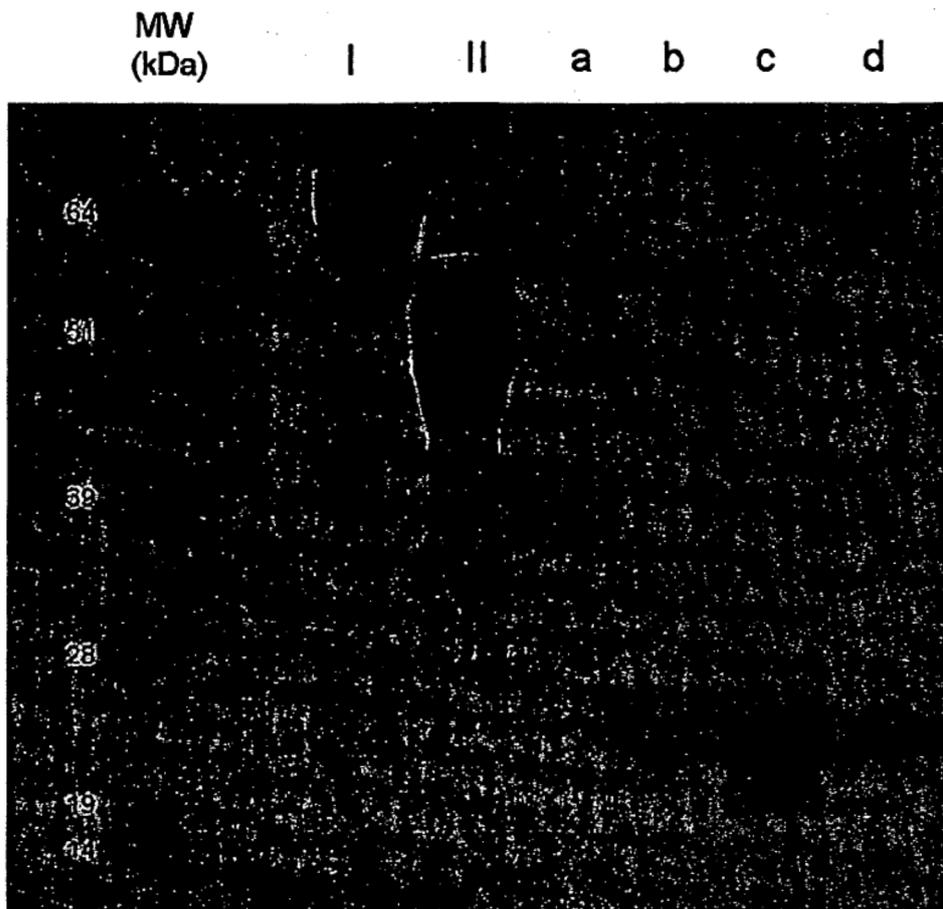


Figura 6. Análisis de los enlaces de ácido siálico de FSH de Per.C6. FSH de Per.C6 se separó por SDS PAGE en geles duplicados, se transfirió a nitrocelulosa y se visualizó usando el kit DIG Glycan Differentiation (No. de catálogo 11 210 238 001, Roche) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones positivas con aglutinina de Sambucus nigra (SNA) indicaban ácido siálico unido en (2-6) terminalmente (**A**). Las reacciones positivas con aglutinina de Maackia amurensis (MAA): indicaban ácido siálico unido en (2-3) terminalmente (**B**). Carril I control del fabricante que contiene enlaces α 2,6 solo. Carril II control del fabricante que contiene enlaces α 2,6 y α 2,3. Muestra a, FSH recombinante derivada de CHO comercial (GonaHf, Serono). Muestra b, Per.C6 rFSH parental, sin manipulación de sialiltransferasa. Muestra c, Per.C6 rFSH con manipulación de α 2,6-sialiltransferasa. Muestra d, Per.C6 rFSH con manipulación de α 2,3-sialiltransferasa

A



B

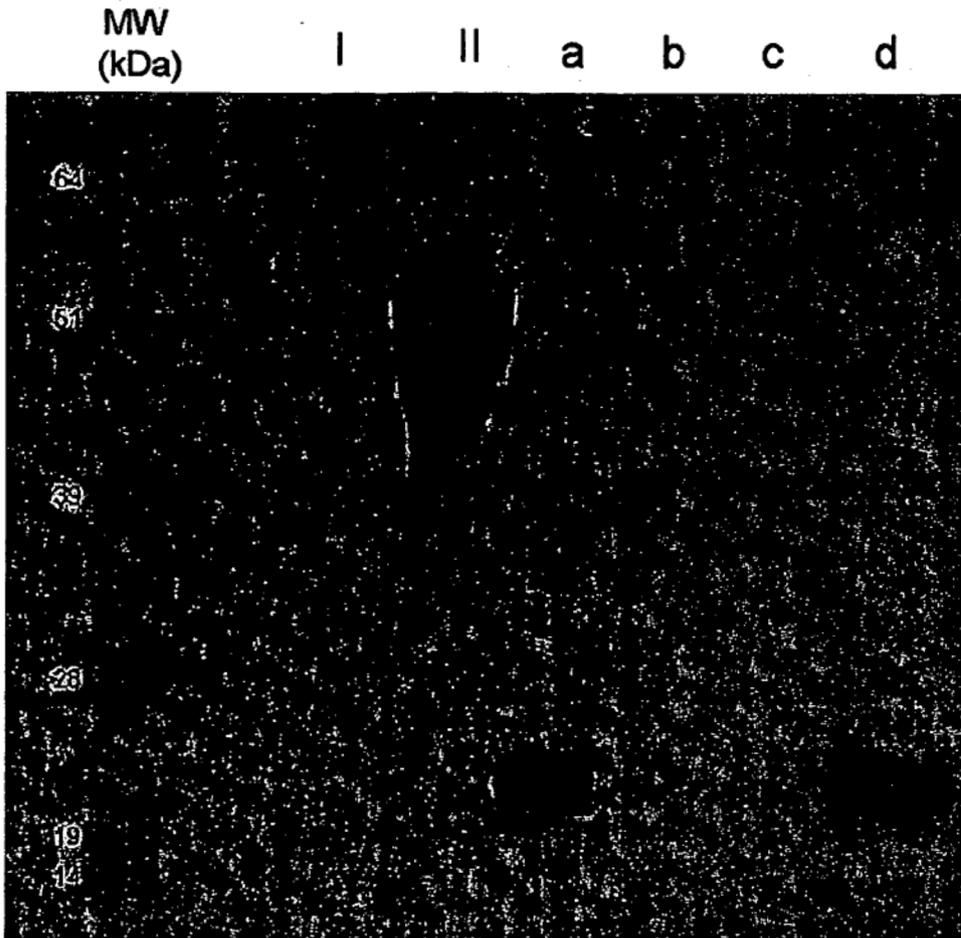


Figura 7. Índices de depuración metabólica de muestras de Per.C6 FSH. Se inyectaron ratas hembra (3 animales por clon) en la vena de la cola en el tiempo cero con una inyección intravenosa rápida de rFSH (1-10 µg/rata). Se ensayó el contenido de FSH en las muestras de sangre recogidas a lo largo del tiempo mediante ELISA.

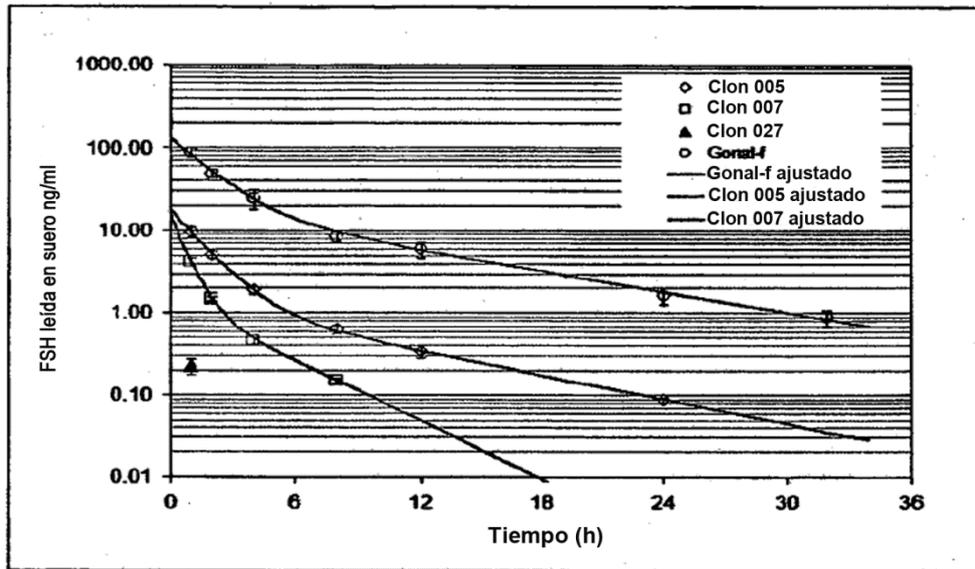


Figura 8. Índices de depuración metabólica de muestras de Per.C6 FSH manipuladas con α 2,6-sialiltransferasa. Se inyectaron ratas hembra (3 animales por clon) en la vena de la cola en el tiempo cero con una inyección intravenosa rápida de rFSH (1-10 μ g/rata). Se ensayó el contenido de FSH en las muestras de sangre recogidas a lo largo del tiempo mediante ELISA.

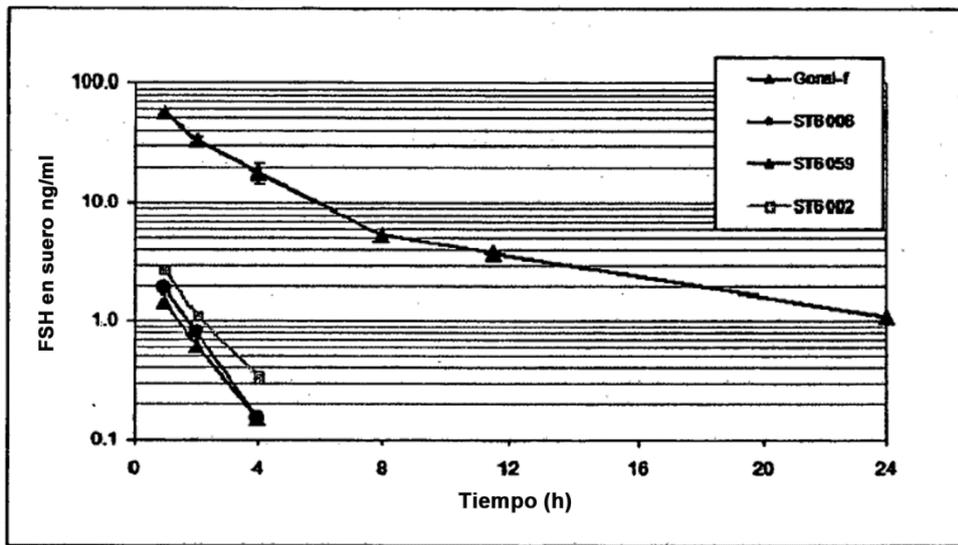


Figura 9. Índices de depuración metabólica de muestras de Per.C6 FSH manipuladas con α 2,6-sialiltransferasa con coadministración de un exceso molar de 7500 veces de asialofetuína para saturar el ASGP-R durante 1-2 horas.

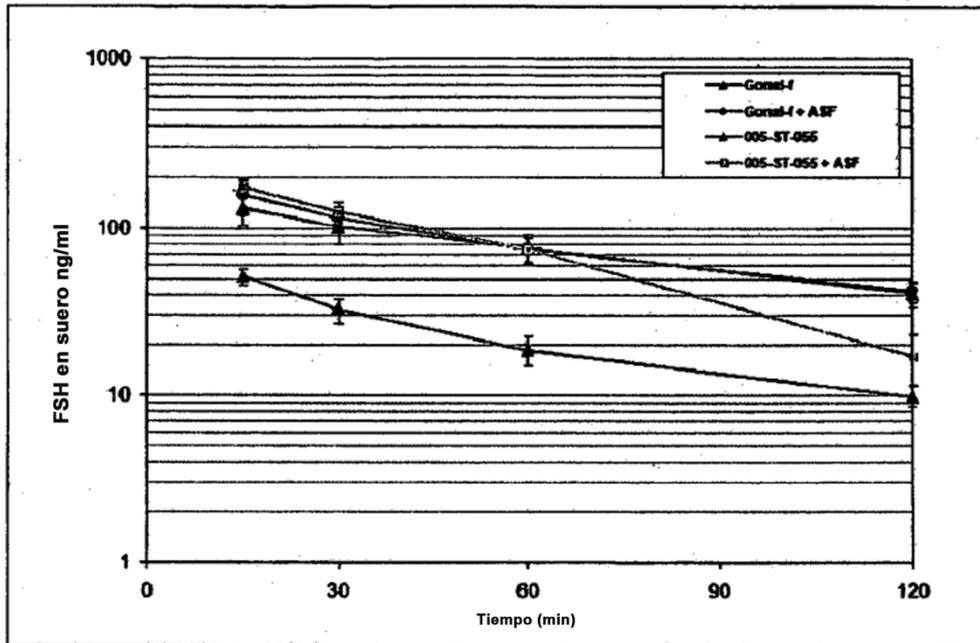


Figura 10. Índices de depuración metabólica de muestras de Per.C6 FSH manipuladas con α 2,3-sialiltransferasa. Las muestras se eligieron por su contenido en ácido siálico basado en su perfil IEF.

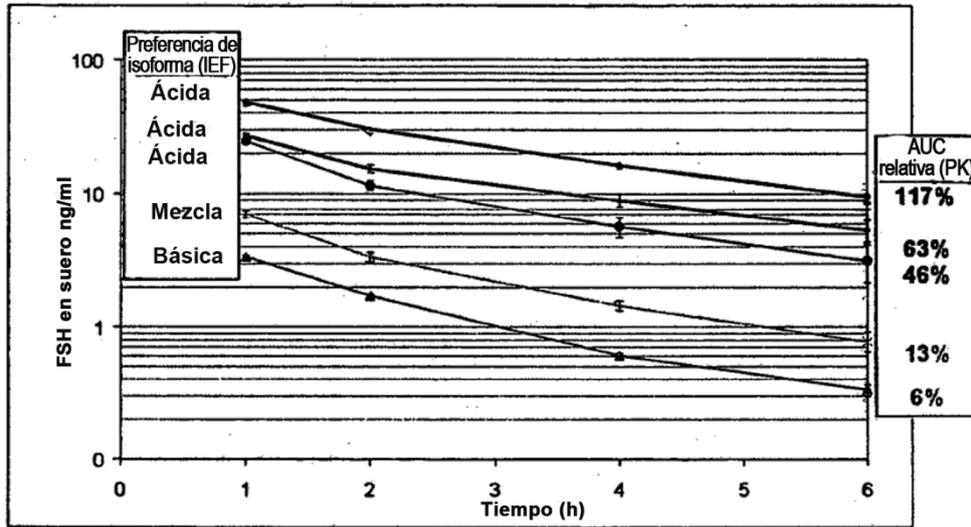


Figura 11. Aumento de peso ovárico según el método de Steelman y Pohley (1953). Se probaron Per.C6 rFSH y estándares (rFSH Gonad-f) a diferentes dosis (3 ratas/dosis).

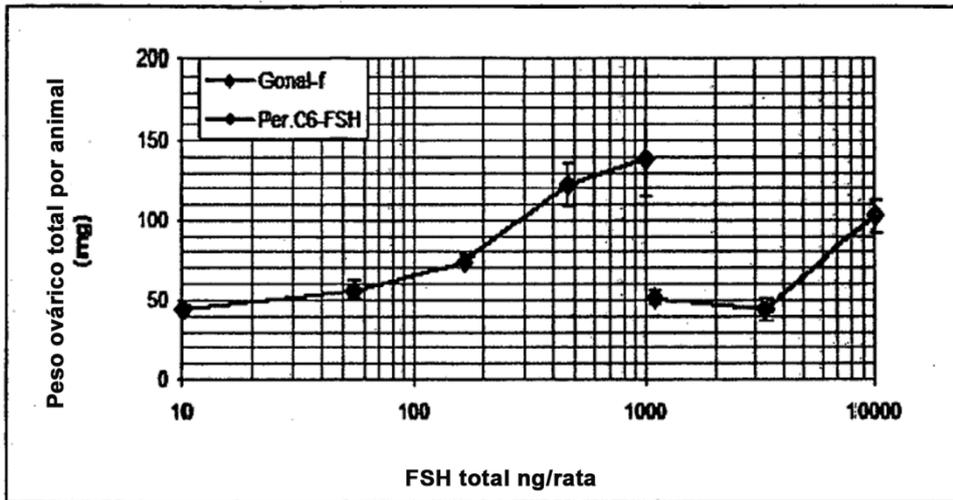


Figura 12. Aumento de peso ovárico según el método de Steelman y Pohley (1953). Se probaron Per.C6 rFSH manipulada con α 2,6-sialiltransferasa y estándares (rFSH Gonal-f) a diferentes dosis (3 ratas/dosis).

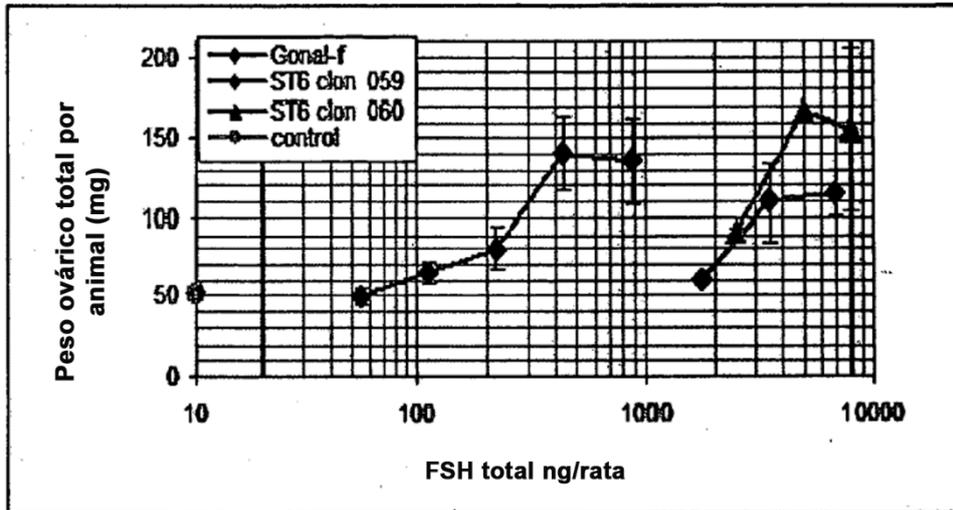


Figura 13. Aumento de peso ovárico según el método de Steelman y Pohley (1953). Se probaron Per.C6 rFSH parental, Per.C6 rFSH manipulada con α 2,3-sialiltransferasa y estándares (rFSH Gonal-f) a cinco diferentes dosis (3 ratas/dosis).

