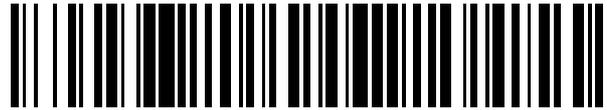


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 198**

51 Int. Cl.:

C07K 14/59 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2006 E 06851498 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 1976872**

54 Título: **Mutantes de FSH**

30 Prioridad:

22.12.2005 US 753637 P

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

17.08.2015

73 Titular/es:

**MERCK SERONO SA (100.0%)
CENTRE INDUSTRIEL
1267 COINSINS, VAUD, CH**

72 Inventor/es:

**MUDA, MARCO;
JIANG, XULIANG y
MCKENNA, SEAN D.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 543 198 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

Mutantes de FSH

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la Invención

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

2. Descripción de la Técnica Relacionada

a. Gonadotropinas

- 10 La hormona estimulante del folículo (FSH) es un miembro de la familia de las gonadotropinas que desempeñan funciones clave en la fertilidad humana. Las gonadotropinas, que también incluyen la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (CG), son heterodímeros, que constan todas de una subunidad α común (92 aminoácidos) y una subunidad β única (111 aminoácidos en la FSH). Las secuencias de aminoácido de las formas maduras de las subunidades α y β de FSH se muestran en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente.

- 15 La FSH humana ha sido aislada a partir de las glándulas pituitarias y a partir de orina postmenopausal (EP 322.438) y se ha producido recombinantemente en células de mamífero (Patentes de EE.UU. n° 5.639.640, 5.156.957, 4.923.805, 4.840.896, 5.767.251, y documentos EP 211.894 y EP 521.586). Las últimas referencias también describen el gen de subunidad β de FSH humano. La Patente de EE.UU. n° 5.405.945 describe un gen de subunidad α humano modificado que comprende solo un intrón.

- 20 Liu et al., J. Biol. Chem. 1993, 15; 268 (2): 21613-7, Grossmann et al., Mol. Endocrinol 1996 10 (6): 769-79, Roth y Dias (Mol. Cell Endocrinol. 1995 1; 109 (2): 143-9, Valove et al., Endocrinology 1994; 135 (6): 2657-61, Yoo et al., J. Biol. Chem. 1993 25; 268 (18): 13034-42), Patente de EE.UU. n° 5.508.261 y Chappel et al., 1998, Human Reproduction, 13 (3): 1835 describen varios estudios de relación estructura-función e identifican residuos de aminoácido implicados en la unión y activación de receptor y en la dimerización de FSH.

b. Uso de gonadotropinas en técnicas de reproducción asistida

- 25 Las gonadotropinas desempeñan una función crucial en el ciclo reproductivo, y su uso en terapias exógenas es esencial para las técnicas de reproducción asistida (ART), tales como la fertilización *in vitro* (IVF), IVG en combinación con inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IVF/ICSI) y transferencia de embrión (ET), así como para la inducción de la ovulación (OI) en pacientes que se someten a fertilización *in vivo*, tanto natural como mediante inseminación intrauterina (IUI).

- 30 Las patentes de EE.UU. n° 4.589.402 y 4.845.077 describen FSH humana que está libre de LH y el uso de la misma para fertilización *in vitro*. El documento EP 322 438 describe una proteína que tiene al menos 6200 U/mg de actividad de FSH, que está sustancialmente libre de actividad de LH, y donde la subunidad α y la subunidad β de FSH, respectivamente, pueden ser naturales o formas truncadas especificadas de las mismas.

- 35 Las terapias prolongadas son necesarias para lograr un efecto terapéutico, típicamente durante 8-10 días consecutivos y a veces hasta 21 días, para estimular la foliculogénesis en mujeres, y durante hasta 18 meses en hombres hipogonadotróficos para inducir la espermatogénesis. La hFSH recombinante se administra típicamente como una inyección i.m. ó s.c. diaria, con las consiguientes molestias y las potenciales reacciones locales en la zona de inyección. Una disminución de la frecuencia de administración facilitaría la terapia y haría que la administración de la gonadotropina fuera más cómoda, más tolerable y aceptada por el paciente.

40 c. Glicosilación de FSH

- 45 Las gonadotropinas son glicoproteínas, cuyas subunidades tienen cadenas laterales de oligosacáridos ligadas a asparagina (N-ligadas) que son importantes para la actividad y la función *in vivo*. La adición de carbohidratos (glicosilación) a polipéptidos es un proceso post-traducciona que da como resultado la adición de cadenas de azúcares a aminoácidos específicos de asparagina (N-ligados) o serina/treonina (O-ligados). Al contrario que la secuencia de aminoácidos invariante de la porción proteica de las glicoproteínas, las estructuras de carbohidratos son variables, una característica definida como microheterogeneidad. Por ejemplo, los sitios de N-glicosilación de la misma proteína pueden contener estructuras de carbohidratos diferentes. Además, incluso en el mismo sitio de glicosilación de una glicoproteína dada, se pueden observar diferentes estructuras de carbohidratos. Esta heterogeneidad es consecuencia de la síntesis de carbohidratos no dirigida por plantilla.

- 50 La N-glicosilación de proteínas se produce específicamente en la estructura de consenso Asn-Xaa-Ser/Thr, y en menor medida en la estructura de consenso Asn-Xaa-Cys, donde Xaa puede ser cualquier residuo de aminoácido. Sin embargo, la presencia de un tripéptido de consenso no es suficiente para asegurar que un residuo de

asparagina sea glicosilado. Por ejemplo, la N-glicosilación de la secuencia Asn-Pro-Ser/Thr se produce a una velocidad 50 veces menor que la de otras estructuras de consenso Asn-Xaa-Ser/Thr.

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

Galway et al., *Endocrinology* 1990; 127 (1): 93-100, demuestran que las variantes de FSH producidas en un línea celular CHO de N-acetilglucosamina transferasa-I o una línea celular CHO deficiente en transporte de ácido siálico son tan activas como la FSH secretada por células naturales o por FSH pituitaria purificada *in vitro*, pero carecen de actividad *in vivo*, presumiblemente debido a una rápida eliminación de las variantes glicosiladas inadecuadamente a través del suero. D'Antonio et al., *Human Reprod* 1999; 14 (5): 1160-7, describen varias isoformas de FSH que circulan en el torrente sanguíneo. Las isoformas tienen secuencias de aminoácido idénticas, pero difieren en la extensión de la modificación post-traducciona. Se observó que el grupo de isoformas menos ácidas presentaba una eliminación *in vivo* más rápida en comparación con el grupo de isoformas ácidas, posiblemente debido a diferencias en el contenido de ácido siálico entre las isoformas. Además, Bishop et al. *Endocrinology* 1995; 136 (6): 2635-40, concluyen que la vida media en circulación parecer ser el determinante fundamental de la actividad *in vivo*. Estas observaciones conducen a la hipótesis de que la vida media de la FSH podría aumentarse introduciendo sitios de glicosilación adicionales para aumentar el contenido de ácido siálico del polipéptido.

d. Variantes de FSH

Se han desarrollado agonistas de FSH con vidas medias incrementadas fusionando el péptido carboxiterminal de hCG (CTP) con FSH humana recombinante nativa (rhFSH). El resto CTP consta de los aminoácidos 112-118 a 145 con cuatro sitios de glicosilación O-ligados localizados en las posiciones 121, 127, 132 y 138. Las Patentes de EE.UU. 5.338.835 y 5.585.345 describen una subunidad β de FSH modificada extendida en la Glu C-terminal con el resto CTP de hCG. Se establece que el análogo modificado resultante tiene la actividad biológica de la FSH nativa, pero una vida media en circulación prolongada. La Patente de EE.UU. n° 5.405.945 describe que la porción carboxiterminal de la subunidad β de hCG o de una variante de la misma presenta efectos significativos sobre la eliminación de CG, FSH y LH.

La Patente de EE.UU. n° 5.883.073 describe proteínas de cadena sencilla que constan de dos subunidades α con actividad de agonista o antagonista para CG, TSH, LH y FSH. La Patente de EE.UU. n° 5.508.261 describe polipéptidos heterodiméricos que tienen afinidad de unión por receptores LH y FSH que comprenden una subunidad α de hormona de glicoproteína y un polipéptido de subunidad β que no es natural, donde el polipéptido de subunidad β es una cadena de aminoácidos que comprende cuatro subsecuencias unidas, cada una de las cuales se selecciona de una lista de secuencias específicas. Klein et al. (2003) describe un único análogo de cadena sencilla de FSH con una vida media incrementada, donde las subunidades α y β están ligadas a un oligopéptido que contiene dos sitios de glicosilación N-ligados.

El documento WO 01/58493 describe 77 mutaciones que pueden realizarse en la subunidad α de la FSH y 51 mutaciones que pueden realizarse en la subunidad β de la FSH en un intento de mejorar la vida media *in vivo* de la FSH. Adicionalmente, el documento WO 01/58493 describe que se pueden añadir uno o más sitios de glicosilación al extremo N de la FSH para mejorar su vida media o se pueden insertar en diversos sitios dentro del polipéptido de FSH. El documento WO 01/58493, aunque describe que los sitios de glicosilación pueden ser insertados en el polipéptido de FSH, no proporciona ninguna guía sobre sitio(s) específico(s) donde se podría insertar un sitio de glicosilación y mantener la actividad de FSH. El documento WO 01/58493 describe además que las subunidades α y β mutantes pueden usarse individualmente (1 sitio de glicosilación adicional) o en combinación (2 sitios de glicosilación adicionales). Los 128 mutantes candidatos fueron identificados usando 50 modelos de estructura 3D de FSH que fueron generados exclusivamente en base a la estructura de hCG y un alineamiento de secuencia de FSH y hCG a pesar de que solo hay un 32% de identidad entre las subunidades β de hCG y FSH. El documento WO 01/58493 no describe la producción o la evaluación de ninguna subunidad α o β de FSH en las que se introduzca un sitio de glicosilación mediante mutagénesis sitodirigida.

El documento WO 05/020934 describe GM1, con mutaciones en las subunidades α y β de la FSH, que incluyen una doble mutación en β E55N/V57T, es decir, el residuo E de la posición de aminoácido 55 mutado a N, y el residuo V de la posición de aminoácido 57 mutado a T. La secuencia de aminoácidos de β E55N/V57T se muestra en la SEQ ID NO: 3.

Existe una necesidad clínica para obtener un producto que proporcione parte o la totalidad de los efectos terapéuticamente relevantes de la FSH, y que pueda administrarse a intervalos menos frecuentes en comparación con los productos de FSH disponibles actualmente, y que preferiblemente proporcione un nivel más estable de actividad de FSH en circulación en comparación con el obtenido mediante el tratamiento actual.

La presente invención está dirigida a dichos productos, así como a los medios para fabricar dichos productos.

SUMARIO

- La presente invención se refiere a moléculas de FSH mutantes, donde la subunidad α de la FSH comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 4-5 y donde la subunidad β comprende la SEQ ID NO 3. La FSH puede estar N-glicosilada en los residuos de asparagina 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de dicha FSH mutante.
- 5 En una realización, la N5 de la subunidad α mutante de la SEQ ID NO: 4 puede estar glicosilada. En otra realización, la N5 de la subunidad α de la SEQ ID NO: 5 puede estar glicosilada. En una realización, la N55 de la subunidad β mutante de la SEQ ID NO: 3 puede estar glicosilada.
- La presente invención también referirse a moléculas de ADN aisladas que codifican mutantes de subunidad α de FSH seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 4-5. La presente invención también se refiere a un ADN aislado que codifica una subunidad β de FSH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3.
- 10 La presente invención también se refiere a un vector que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad α de FSH seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 4-5. El vector puede ser un vector de expresión.
- La presente invención también se refiere a un vector que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad β de FSH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3. El vector puede ser un vector de expresión.
- 15 La presente invención también se refiere a un vector que comprende un primer ADN y un segundo ADN, donde el primer ADN codifica un mutante de subunidad α de FSH seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 4-5 y donde el segundo ADN codifica un mutante de subunidad β de FSH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3. El vector puede ser un vector de expresión.
- La presente invención también se refiere a una célula que comprende un vector que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad α de FSH seleccionado a partir del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 4-5. El vector puede ser un vector de expresión. La célula puede ser una célula de mamífero, p.ej., una célula CHO.
- 20 La presente invención también se refiere a una célula que comprende un vector que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad β de FSH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3. El vector puede ser un vector de expresión. La célula puede ser una célula de mamífero, p.ej., una célula CHO.
- 25 La presente invención también se refiere a una célula que comprende un vector que comprende un primer ADN y un segundo ADN, donde el primer ADN codifica un mutante de subunidad α de FSH seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 4-5 y donde el segundo ADN codifica un mutante de subunidad β de FSH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3. El vector puede ser un vector de expresión. La célula puede ser una célula de mamífero, p.ej., una célula CHO.
- 30 La presente invención también se refiere a una célula que comprende un primer y un segundo vector, donde el primer vector comprende ADN que codifica un mutante de subunidad α de FSH seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 4-5 y el segundo vector comprende ADN que codifica un mutante de subunidad β de FSH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3. El(los) vector(es) puede(n) ser un vector de expresión. La célula puede ser una célula de mamífero, p.ej., una célula CHO.
- 35 La presente invención también se refiere a un método para producir un mutante de FSH que comprende cultivar células de mamífero capaces de glicosilar proteínas, donde dichas células comprenden un primer vector de expresión que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad α de FSH seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 4-5 y un segundo vector de expresión que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad β de FSH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3. En otra realización de la presente invención,
- 40 dichas células comprenden un único vector que comprende ADN que codifica un mutante de subunidad α de FSH seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 4-5 y que además comprende ADN que codifica un mutante de subunidad β que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.
- La presente invención también se refiere a una composición que comprende un mutante de FSH y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la subunidad α de FSH comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 4-5 y donde la subunidad β de FSH comprende la SEQ ID NO: 3.
- 45 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un mamífero no fértil, donde la composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de una FSH mutante, donde la subunidad α de la FSH comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 4-5 y donde la subunidad β de FSH comprende la SEQ ID NO: 3.
- 50 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para uso en la estimulación de la foliculogénesis en un mamífero, donde la composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de una FSH mutante, donde la subunidad α comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 4-5 y donde la subunidad β de FSH comprende la SEQ ID NO: 3. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para uso en la inducción de la hiperestimulación de ovarios en un mamífero, donde la
- 55 composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de una FSH mutante, donde la subunidad α de FSH

comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 4-5 y donde la subunidad β de la FSH comprende la SEQ ID NO: 3.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1:** muestra un alineamiento de los mutantes de subunidad α GNFT (SEQ ID NO: 4) y GNRT (SEQ ID NO: 5) de la subunidad α de la FSH humana (SEQ ID NO: 1), siendo el 1 el primer aminoácido del polipéptido maduro.

Figura 2: muestra una curva dosis-respuesta correspondiente a las subunidades α de FSH mutante, en comparación con la FSH natural. Clon 10c- α GNRT/GM1 β . Clon 11c- α GNFT/GM1 β .

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 Aunque se ha demostrado que un aumento del contenido de carbohidratos en la FSH puede conducir a un aumento de la vida media *in vivo*, mejorar la vida media de la FSH es más complicado que simplemente añadir sitios de glicosilación adicionales. Aunque se necesita una secuencia de consenso de glicosilación para la adición de carbohidratos, no es suficiente para asegurar que un sitio de adición de carbohidratos será utilizado. Otros factores, tales como el plegamiento y la conformación locales de la proteína durante la biosíntesis, determinan si un oligosacárido se une a un sitio de secuencia de consenso dado. Además, para que la glicosilación adicional conduzca a un aumento de la vida media *in vivo*, la secuencia de consenso debe estar en una posición tal que la glicosilación del sitio no interfiera con la unión a receptor, o comprometa el plegamiento, la conformación o la estabilidad de la glicoproteína. Hasta el momento, los análogos de FSH con vidas medias incrementadas se han limitado básicamente a proteínas de fusión, donde la porción fusionada del polipéptido incluía sitios de glicosilación adicionales.

20 1. FSH mutante

Se proporciona un mutante de FSH que ha sido modificada para crear sitios adicionales de reconocimiento de glicosilación. La subunidad α del mutante de FSH puede presentar una de las siguientes mutaciones, en comparación con la subunidad α natural: una inserción de la secuencia de aminoácidos GNFT entre los residuos de aminoácido 3 y 4 de la subunidad α natural, o una inserción de la secuencia de aminoácidos GNRT entre los residuos de aminoácido 3 y 4 de la subunidad α natural. Una FSH mutante puede comprender cualquiera de las anteriores subunidades α mutantes en combinación con una subunidad β mutante, p.ej. β GM1 que contiene la siguiente mutación: E55N/V57T. Se puede glicosilar uno o más de los sitios adicionales de glicosilación de la FSH recombinante. El uno o más sitios adicionales de glicosilación de la FSH mutante pueden ser glicosilados *in vitro* o *in vivo*. Tal como se usa en la presente memoria, el término "mutante GNFT" se refiere a una FSH mutante que comprende una subunidad α tal como se establece en la SEQ ID NO: 5 y una subunidad β tal y como se establece en la SEQ ID NO: 3.

El mutante de FSH puede ser producido mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Dichos métodos incluyen la construcción de secuencias de nucleótidos que codifican los respectivos mutantes de FSH y que expresan la secuencia de aminoácidos en un hospedante transfectado adecuado. El mutante de FSH también puede ser producido mediante síntesis química o por una combinación de síntesis química y tecnología de ADN recombinante.

El mutante de FSH puede comprender las subunidades α y β de FSH en la forma de dos cadenas de polipéptido separadas, donde las dos cadenas se dimerizan *in vivo* para formar un polipéptido dimérico, o puede comprender una construcción de cadena sencilla que comprenda las dos subunidades ligadas covalentemente mediante un enlace peptídico o un ligando de péptido. Los residuos de aminoácido del ligando de péptido pueden exhibir propiedades que no interfieran significativamente con la actividad del mutante de FSH.

El mutante de FSH puede tener una vida media incrementada en comparación con la FSH natural. El mutante de FSH también puede tener una estabilidad incrementada en comparación con la FSH natural. El mutante de FSH puede comprender oligosacáridos en 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de glicosilación N-ligados. También se proporciona una población de mutantes de FSH, que puede comprender una o más isoformas de mutante de FSH, donde cada isoforma comprende oligosacáridos en 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de los sitios de glicosilación N-ligados.

La secuencia de nucleótidos que codifica las subunidades α ó β del mutante de FSH puede construirse aislando o sintetizando una secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad de FSH original, tal como la hFSH-alfa o la hFSH-beta con las secuencias de aminoácido mostradas en las SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente. Entonces la secuencia de nucleótidos se puede cambiar para efectuar la sustitución o la reinserción de los residuos de aminoácido relevantes. La secuencia de nucleótidos puede modificarse mediante mutagénesis sitodirigida. Como alternativa, la secuencia de aminoácidos puede prepararse mediante síntesis química, donde los oligonucleótidos se diseñan en base a la secuencia de aminoácidos específica del mutante de FSH.

La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se puede insertar en un vector recombinante y ligarse operativamente a una secuencia de control necesaria para la expresión del polipéptido en la célula hospedante transfectada deseada. Las secuencias de control pueden ser cualquier componente que sea necesario o ventajoso

para la expresión de un polipéptido. Los ejemplos de secuencias de control adecuadas para dirigir la transcripción en células de mamífero incluyen los promotores temprano y tardío de SV40 y adenovirus, p.ej. el promotor tardío principal de adenovirus 2, el promotor MT-1 (gen de metalotrioneína) y el promotor de gen temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV).

5 El especialista en la técnica puede realizar una selección entre dichos vectores, secuencias de control de expresión y hospedantes sin una experimentación innecesaria. El vector recombinante puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que exista como entidad extracromosomal, cuya replicación sea independiente de la replicación cromosomal, p.ej. un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando es introducido en una célula hospedante, se integra en el genoma de la célula hospedante y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado.

10 El vector puede ser un vector de expresión en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención está ligada operativamente a segmentos adicionales requeridos para la transcripción de la secuencia de nucleótidos. El vector puede derivarse de ADN de plásmido o vírico. Una serie de vectores de expresión adecuados para expresión en las células hospedantes mencionados en la presente memoria se encuentran disponibles comercialmente, o están descritos en la bibliografía.

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

20 El vector también puede comprender un gen amplificable, tal como DHFR, de tal modo que se pueden seleccionar las células que tienen copias múltiples del gen amplificable y secuencias flanqueantes, que incluyen el ADN de FSH mutante, en un medio apropiado.

25 También se proporciona un ADN que codifica una subunidad α del mutante de FSH. La secuencia de nucleótidos que codifica las subunidades alfa y beta del mutante de FSH, tanto preparadas mediante mutagénesis sitodirigida, síntesis, PCR u otros métodos, también puede incluir opcionalmente una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal. El péptido señal puede estar presente cuando el polipéptido va a ser secretado de las células en las que se expresa. Dicho péptido señal, si está presente, puede ser uno reconocido por la célula seleccionada para la expresión del polipéptido. El péptido señal puede ser homólogo (p.ej., ser el asociado normalmente a una subunidad hFSH) o heterólogo (es decir, que se origina a partir de otra fuente distinta de la hFSH) respecto al polipéptido o puede ser homólogo o heterólogo respecto a la célula hospedante, es decir ser un péptido señal expresado normalmente a partir de la célula hospedante, o uno que normalmente no se expresa en la célula hospedante.

30 Se puede usar cualquier hospedante para producir los polipéptidos, incluyendo bacterias, hongos (que incluyen levaduras), plantas, insectos, mamíferos u otras células o líneas celulares animales apropiadas, así como animales o plantas transgénicos. Los ejemplos de células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), (p.ej., CHO-KL; ATCC CCL-61), líneas de células de Mono Verde (COS) (p.ej., COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); células de ratón (p.ej., NSIO), líneas celulares de riñón de hámster bebé (BI-EK) (p.ej., ATCC CRL-1632 ó ATCC CCL-10), y células humanas (p.ej., BEK 293 (ATCC CRL-1573)), así como células vegetales en cultivos de tejido. En la técnica se conocen líneas celulares adecuadas adicionales y están disponibles en repositorios públicos tales como el *American Type Culture Collection*, EE.UU. Los métodos para introducir ADN exógeno en células hospedantes de mamífero incluyen la transfección mediada por fosfato de calcio, la electroporación, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la transfección mediada por liposomas y vectores víricos.

35 Las células pueden cultivarse en un medio nutriente adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula puede cultivarse mediante cultivo en matraz agitado, fermentación a pequeña escala o a escala grande (que incluye fermentaciones en continuo, por cargas, en semicontinuo o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales, llevada a cabo en un medio adecuado y en las condiciones que permitan que se exprese y/o aísle el polipéptido. El cultivo tiene lugar en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados se encuentran disponibles en suministradores comerciales o pueden prepararse según composiciones publicadas (p.ej., en catálogos de la *American Type Culture Collection*). Si el polipéptido se secreta al medio nutriente, se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no es secretado, se puede recuperar de los lisatos celulares. Un método de producción de alto rendimiento de los mutantes de FSH de la invención es a través del uso de amplificación de dihidrofolato reductasa (DHFR) en células CHO deficientes de DHFR, mediante el uso de niveles sucesivamente crecientes de metotrexato tal como se describe en la Patente de EE.UU. nº 4.889.803.

45 El polipéptido de FSH mutante resultante puede recuperarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede recuperarse a partir del medio de nutrientes mediante procedimientos convencionales que incluyen,

aunque sin limitación, la centrifugación, la filtración, la extracción, el secado por pulverización, la evaporación o la precipitación. Los polipéptidos de FSH mutante pueden purificarse mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, aunque sin limitación, cromatografía (p.ej., de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, cromatoenfoco, y de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (p.ej., enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (p.ej., precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende el mutante de FSH. Dicha composición farmacéutica puede usarse para estimular la foliculogénesis, por ejemplo en combinación con la inducción de la ovulación o con técnicas de reproducción asistida (ART). Puesto que el mutante de FSH de la presente invención puede ser eficaz para inducir a folículos múltiples para que se desarrollen y maduren, puede ser particularmente adecuado para su uso en ART, donde se desea recolectar ovocitos múltiples.

El mutante de FSH puede usarse para inducir la mono-foliculogénesis para OI, o la paucifoliculogénesis (hasta aproximadamente tres folículos) para IUI, para la fertilización *in vivo*. La mono-foliculogénesis también puede lograrse con una dosis reducida del mutante de FSH, o con una dosis menos frecuente en comparación con las preparaciones de FSH convencionales. Por ejemplo, en OI se puede administrar una preparación de FSH de la invención a 225-400 IU cada tres días, o dosis inferiores, dependiendo de la respuesta del paciente. La respuesta del paciente puede ir seguida de una sonografía.

El mutante de FSH de la invención se puede usar en un régimen de hiperestimulación de ovario controlada (COH). Los regímenes estándar para COH incluyen una fase de regulación a la baja en la que la hormona luteinizante (LH) endógena es regulada a la baja mediante la administración de un agonista de hormona de liberación de gonadotropina (GnRH) seguida de una fase estimuladora en la que se induce el desarrollo folicular (foliculogénesis) mediante la administración diaria de hormona estimulante de folículo (FSH), normalmente a aproximadamente 150-225 IU/día. Alternativamente, la estimulación puede iniciarse con FSH tras una menstruación espontánea o inducida, seguida de la administración de antagonista de GnRH (comenzando típicamente alrededor del día seis de la fase estimuladora). Cuando hay al menos 3 folículos >16 mm (uno de 18 mm), se puede administrar un único bolo de hCG (5-10.000 IU) para imitar la producción natural de LH e inducir la ovulación. La recuperación de ovocitos se puede programar a las 36-38 horas tras la inyección de hCG.

El mutante de FSH también se puede usar para OI e IUI. Por ejemplo, la estimulación de FSH puede iniciarse tras una menstruación espontánea o inducida, con una dosis diaria de 75-150 IU. Cuando de 1 a 3 folículos hayan alcanzado un diámetro de al menos 16 mm, se puede administrar un único bolo de hCG para inducir la ovulación. La inseminación se puede llevar a cabo *in vivo*, mediante acto sexual normal o IUI.

Puesto que el mutante de FSH puede presentar una vida media incrementada con respecto a las preparaciones de FSH natural, regímenes como los descritos anteriormente pueden emplear dosis de IU de FSH inferiores, y/o pueden modificarse disminuyendo el periodo de estimulación de FSH, alcanzando una respuesta similar o mejor, en términos de número y viabilidad de folículos. Por ejemplo, se puede lograr una foliculogénesis adecuada con dosis diarias de aproximadamente 50-150, 50-100 ó 50-75 IU de FSH. Las dosis de FSH pueden darse en una base diaria o semidiaria. El periodo de dosis puede ser inferior a, o aproximadamente, 14, 12, 11 ó 10 días. Para OI, la preparación de mutante de FSH puede administrarse en dosis de 25-150 ó 50-125 IU de FSH/día. Para el tratamiento de la infertilidad masculina, se puede administrar una preparación de mutante de FSH a 3 X 150 a 300 IU/semana hasta que la espermatogénesis alcance niveles adecuados para la inseminación, tanto mediante acto sexual normal como por técnicas ART.

Debido a la mayor vida media de la FSH mutante, se puede administrar como preparación de acción prolongada, que puede administrarse con una frecuencia menor a cada dos días. La FSH convencional se puede administrar a aproximadamente 300 IU cada dos días, alcanzando resultados similares a la administración cada día con aproximadamente 150 IU. La FSH mutante se puede administrar cada 3, 4, 5, 6 ó 7 días, alcanzando resultados similares o mejores que la administración diaria de FSH convencional.

El mutante de FSH puede usarse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones. En otro aspecto, el polipéptido o la composición farmacéutica según la invención se usa en un método de tratamiento de un mamífero, en particular un humano, que comprende la administración al mamífero que lo necesite de dicho polipéptido o composición farmacéutica.

Será evidente para los especialistas en la técnica que una cantidad efectiva de un polipéptido, preparación o composición depende de, entre otros, la enfermedad, la dosis, el calendario de administración, si el polipéptido o preparación o composición se administran solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, la vida media en suero de las composiciones, y la salud general del paciente. Típicamente, una dosis efectiva de la preparación o composición es suficiente para asegurar un efecto terapéutico.

El mutante de FSH puede administrarse en una composición que incluye uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. "Farmacéuticamente aceptable" significa un vehículo o excipiente que no produce ningún efecto indebido en pacientes a los que se administre. Dichos vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica, y el polipéptido puede formularse en composiciones farmacéuticas

mediante métodos bien conocidos (véase, p.ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990); *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis (2000); y *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)). Los excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en composiciones que comprenden el polipéptido incluyen, por ejemplo, agentes tamponantes, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicantes, tensioactivos o detergentes no iónicos "agentes humectantes", antioxidantes, agentes de relleno, agentes quelantes y codisolventes.

La composición farmacéutica que comprende el mutante de FSH puede formularse en una variedad de formas, incluyendo líquidos, p.ej., disoluciones o suspensiones listas para su uso, geles, liofilizados o cualquier otra forma adecuada, p.ej., polvos o cristales adecuados para preparar una disolución. La forma de la composición puede depender de la indicación particular tratada y será evidente para el especialista en la técnica.

La composición farmacéutica que comprende el mutante de FSH puede administrarse intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intradérmicamente, subcutáneamente, sublingualmente, bucalmente, intranasalmente, transdérmicamente, por inhalación, o en cualquier otro modo aceptable, p.ej. usando tecnología PowderJect o ProLease o un sistema de bolígrafo de inyección. El modo de administración puede depender de la indicación particular tratada y será evidente para el especialista en la técnica. La composición puede administrarse subcutáneamente, lo que puede permitir que el paciente realice una auto-administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos. Estos agentes pueden incorporarse como parte de la misma composición farmacéutica o pueden administrarse de forma separada de los polipéptidos, tanto simultáneamente como de acuerdo a cualquier calendario de tratamiento aceptable. Adicionalmente, el polipéptido, la preparación o la composición farmacéutica pueden usarse como adjunto a otras terapias.

La presente invención tiene aspectos múltiples, ilustrados a través de los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

Mutantes de FSH

La estructura cristalina 3D de la FSH humana se usó para identificar regiones de la molécula de FSH en las que se podría insertar un sitio candidato de glicosilación. En cada unidad asimétrica de la estructura cristalina hay presentes dos moléculas de FSH (cuatro subunidades). Las dos moléculas de FSH fueron sobreimpuestas y comparadas, siendo inspeccionado visualmente cada residuo para identificar sitios potenciales en los que podría insertarse un sitio de N-glicosilación que no altere el plegamiento adecuado del polipéptido de FSH o reduzca la actividad de FSH. La estructura cristalográfica de la FSH se combinó con el conocimiento de la interacción FSH/receptor FSHR para colaborar en la selección de sitios potenciales de N-glicosilación. Los principales criterios de diseño fueron una alteración mínima de la estructura 3D, una alteración mínima de los sitios predichos para la unión y activación, y una estructura 3D predecible compatible con la glicosilación. En base a los anteriores criterios, se prepararon los siguientes dos mutantes de inserción de la subunidad α de FSH:

Nº	Mutaciones	SEQ ID NO
1	Injerto GNFT	4
2	Injerto GNRT	5

Ejemplo 2

Análisis morfológico de mutantes de FSH

Se analizaron alícuotas de sobrenadantes de cultivos concentrados procedentes de expresión transitoria de mutantes de subunidad α de FSH 1-2 mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras que permiten la resolución de heterodímeros de FSH intactos procedentes de subunidades α y β libres. Comparando los pesos moleculares aparentes de cada heterodímero mutante con el de la FSH natural, uno es capaz de determinar si la FSH mutante está hiperglicosilada respecto a la FSH natural. Resumidamente, tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a PVDF y se visualizaron usando anticuerpo Serono 9-14 dirigido contra la subunidad α de la FSH. Como controles, también se analizó FSH humana natural, GM1 mutante, FSH-CTP y Gonal F. La Tabla 1 muestra el peso molecular aparente del heterodímero formado por los mutantes de subunidad α y subunidad β natural, calculado en base a patrones de peso molecular.

Tabla 1

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

Tal y como se muestra en la Tabla 1, los dos mutantes de FSH expresados, es decir, los injertos de GNFT y GNRT, mostraron un aumento de glicosilación, como se evidencia por un desplazamiento de la distribución del peso molecular aparente del heterodímero en comparación con la FSH humana natural.

Ejemplo 3

Función *in vitro* de los mutantes de FSH

A fin de determinar la actividad de los mutantes de FSH, se evaluó cada mutante para determinar su capacidad de estimular la producción de cAMP en una línea de células CHO que expresa de forma recombinante el receptor de FSH humana. Las células CHO-FSHR se mantuvieron en medio de crecimiento de FSHR [MEM α (-) (Gibco, n° cat. 12561-056) + 10% de FBS dializado (Gibco, n° cat. 26300-020) + 600 μ g/mL de Geneticina (Gibco, n° cat. 10131-035) + MTX 0,02 μ M]. Se sembraron células CHO-FSHR a 2×10^4 células/pocillo en 100 μ L/pocillo (2×10^5 células/10 mL = 1 placa) y se incubaron a 37°C durante 24 horas antes del ensayo. Las células se usaron para el ensayo si eran confluentes en al menos un 70%.

Se realizó una dilución en serie 1:3 de 12 puntos comenzando a 67,5 nM para todas las muestras y patrón interno (como patrón interno se usó Gonal F). Todas las diluciones se realizaron en medio de ensayo [DMEM/F12 (libre de fenol, Gibco, n° cat. 11039-021) + 1 mg/mL de BSA (Sigma, A-6003) + IBMX 0,1 mM (inhibidor de 3-isobutil-1-metilxantona fosfodiesterasa, Sigma, n° cat. I-7018)]. Se eliminó el medio de crecimiento de la placa de ensayo, se añadieron 25 μ L de medio de ensayo (suministrado con MA6000 cAMP MSD Lit- Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD), las placas se recuperaron y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. A continuación los pocillos se dosificaron con 25 μ L/pocillo de la muestra de ensayo, se mezclaron, las placas se recuperaron y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de 1 hora de incubación, la muestra y el medio se retiraron de los pocillos. A continuación se añadieron 25 μ L de tampón de lisis estándar (suministrado con MA 6000 Meso Scale Discovery kit) a cada pocillo, las placas se cubrieron con un sellador de placas (Packard, n° cat. 6005185) y se agitaron durante 5 minutos. Tras la incubación de lisis durante 5 minutos, se transfirieron 25 μ L de material celular lisado a la placa cAMP Meso Scale Discovery (suministrada con MA6000 MSD kit) y se incubó con agitación suave a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 25 μ L de conjugado cAMP-AP a cada pocillo y se mezcló. A continuación se añadieron a cada pocillo 25 μ L de anticuerpo anti-cAMP, las placas se cubrieron con un sellador de placa y se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación las placas fueron leídas a un segundo por pocillo, mostrando los niveles bajos de cAMP una señal elevada y los niveles altos de cAMP una señal baja. Las curvas de dosis-respuesta de los mutantes de FSH se muestran en la Figura 2. Se calcularon los valores de EC₅₀ y se muestran en la Tabla 2.

Tal como se muestra en la Figura 2 y en la Tabla 2, todos los mutantes de FSH presentan actividad *in vitro* comparable a la de la FSH natural.

Tabla 2

Muestra	Conc. relativa
FSH natural	2,16E-10
Clon 10C- α GNRT/ β GM1	2,58E-10
Clon 11C- α GNFT/ β GM1	2,78E-10
GM1	40x
FSH natural	36x

Ejemplo 4**Vida media *in vivo* de mutantes de FSH**

Se analizaron dos lotes diferentes de mutante GNFT y mutante GNRT en estudios farmacocinéticos (PK) separados. Los dos estudios tuvieron el mismo diseño: 33 ratas SD hembras inmaduras de 21 días de edad (aprox. 40 g de peso corporal; Charles River Laboratories, Wilmington, MA) fueron divididas aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento (n=6) y un grupo de línea base (n=3). La elección de ratas hembras inmaduras se basó en el uso de esta edad y sexo para las determinaciones biológicas *in vivo* de actividad de FSH. Los animales de los grupos de tratamiento recibieron inyecciones subcutáneas (s.c.) de 4 µg de GM1 (control), mutante GNFT, mutante GNRT u 8 µg de rhFSH Gonal- F (control). Se tomaron muestras de sangre del seno retro-orbital a las 9 h en el grupo de línea base y a las 1, 2, 4, 6, 10, 24, 48 y 72 h de los animales de los grupos de tratamiento (n=3/cada tiempo; las ratas fueron alternadas de tal modo que no se tomaran muestras de sangre de las ratas en 2 puntos de muestreo consecutivos). Se tomó aproximadamente 0,1 mL de sangre de cada rata en cada toma de muestra, y se recolectó el plasma y se almacenó a -80°C hasta que se analizó mediante ELISA. El ensayo usado para medir las proteínas de FSH en suero en ambos estudios fue el DSL FSH Coated Well ELISA (Diagnostics Systems Laboratories, Webster, TX). Las muestras de sangre fueron analizadas por triplicado.

La vida media del mutante GNFT y del mutante GNRT es de aproximadamente 17 horas, mientras que la de los controles GM1 y Gonal-F es de aproximadamente 12 h y 8 h, respectivamente.

Ejemplo 5**Actividad biológica *in vivo***

El modelo *in vivo* usado para determinar la actividad biológica de los mutantes GNRT y GNFT es el ensayo de ganancia de peso de ovario de rata. El tratamiento de ratas hembras inmaduras de 21 años de edad con FSH o moléculas con actividad de tipo FSH, p.ej. los mutantes GNRT y GNFT, activa el crecimiento de los folículos de ovario y la producción de ovocitos. Este crecimiento se detecta fácilmente a través de la medida del peso de ovario al final del periodo de tratamiento. En el modelo, la sustancia que va a ser evaluada se administra mediante inyección durante tres días y los ovarios son recolectados y pesados tras la última dosis. Este ensayo se ha usado durante varias décadas como base para asignar potencia de FSH a productos clínicos con fines de etiquetado. Mide la acción fisiológica relevante de la FSH y presenta una clara correlación con la acción de los productos clínicos.

La actividad *in vivo* de los mutantes de GNRT y GNFT se comparó con la de la FSH natural. Todas las dosis fueron definidas en base a la equivalencia predicha de la FSH, teniendo en consideración la potencia *in vitro* y la vida media en ratas. Se observó que los mutantes de GNRT y GNFT poseen una potente actividad de FSH, en una magnitud similar a la de la FSH natural.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Applied Research Systems AR5 Holding N.V.
- <120> Mutantes de FSH
- <130> 1115 WO
- 5 <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 92
- <212> PRT
- 10 <213> Homo sapiens
- <400> 1

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

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

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

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

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

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

- <210> 2
- <211> 111
- 15 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 3
- <211> 111
- <212> PRT
- 5 <213> Artificial

- <220>
- <223> mutante de subunidad beta E55N/V57T
- <400> 3

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

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

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

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

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

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

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

- 10 <210> 4
- <211> 96
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 15 <223> mutante de inserción de subunidad alfa GNFT
- <400> 4

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

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

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

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

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

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

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

5

- <220>
- <223> mutante de inserción de subunidad alfa GNRT
- <400> 5

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

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

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

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

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

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

10

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que codifica una subunidad α mutante de FSH, donde la subunidad α comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 4-5.
2. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1.
- 5 3. El vector de la reivindicación 2, donde el vector es un vector de expresión.
4. El vector de la reivindicación 2, donde el vector comprende además un ácido nucleico que codifica la secuencia de SEQ ID NO: 3.
5. Una célula hospedante que comprende el vector de la reivindicación 2.
6. La célula hospedante de la reivindicación 5, donde la célula es una célula de mamífero.
- 10 7. Una FSH mutante, donde la subunidad β comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3 y donde la subunidad α comprende una secuencia codificada por el ácido nucleico de la reivindicación 1.
8. La FSH mutante de la reivindicación 7, donde uno cualquiera de los residuos de asparagina 0 a 6 están glicosilados.
- 15 9. La FSH mutante de la reivindicación 7, donde la subunidad α comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 y donde N5 está glicosilado.
10. La FSH mutante de la reivindicación 7, donde la subunidad α comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 y donde N5 está glicosilado.
11. Un método para producir un mutante de FSH que comprende:
- 20 (a) proporcionar una célula que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1 y un segundo ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 3;
- (b) cultivar la célula en condiciones que permitan la expresión del primer y del segundo ácidos nucleicos.
12. El método de la reivindicación 11, donde la célula es capaz de glicosilar una proteína.
13. El método de la reivindicación 11, donde la célula comprende un único vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1 y un ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 3.
- 25 14. El método de la reivindicación 11, donde la célula comprende un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1, y que comprende además un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 3.
15. Una composición farmacéutica que comprende la FSH mutante de la reivindicación 7, y opcionalmente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 para uso en el tratamiento de un mamífero no fértil.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 para uso en la estimulación de la foliculogénesis en un mamífero.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 para uso en la inducción de la hiperestimulación de ovarios en un mamífero.

35

FIGURA 1

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

Figura 2

