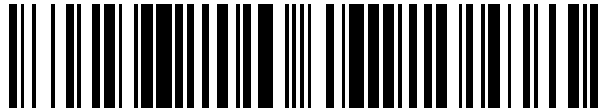


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 648**

51 Int. Cl.:

A61K 38/24 (2006.01)

A61P 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2012 E 12753675 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2741763**

54 Título: **Composición para estimulación ovárica controlada**

30 Prioridad:

08.08.2011 EP 11176803

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

07.03.2016

73 Titular/es:

**FERRING BV (100.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL**

72 Inventor/es:

ARCE, JOAN-CARLES

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 562 648 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

Composición para estimulación ovárica controlada

La presente invención se refiere a composiciones y a productos farmacéuticos para el tratamiento de la esterilidad.

5 Se conocen ampliamente técnicas de tecnología de reproducción asistida (ART) tales como la fecundación *in vitro* (IVF). Estas técnicas de ART requieren generalmente una etapa de estimulación ovárica controlada (COS), en la que se estimula una cohorte de folículos hasta su completa madurez. Los regímenes de COS convencionales incluyen la administración de gonadotropinas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH) sola o en combinación con actividad de hormona luteinizante (LH) para estimular el desarrollo folicular, normalmente con la administración de un análogo de GnRH antes de y/o durante la estimulación para prevenir un aumento de LH prematuro. Las composiciones farmacéuticas generalmente usadas para COS incluyen hormona estimulante del folículo recombinante (rFSH), FSH derivada de orina, preparaciones de LH + FSH recombinante, menotropina derivada de orina [gonadotropina menopáusica humana (hMG)] y gonadotropina menopáusica humana altamente purificada (HP-hMG). La IVF puede asociarse con un riesgo de desarrollar el síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS), que puede ser potencialmente mortal en casos graves.

15 La capacidad para predecir el potencial de respuesta de las mujeres a la estimulación ovárica controlada (COS) puede permitir el desarrollo de protocolos de COS individualizados. Esto podría, por ejemplo, reducir el riesgo de desarrollar OHSS en mujeres a las que se predijo que tendrían una respuesta excesiva a la estimulación, y/o mejorar los desenlaces de embarazo en mujeres que se clasificaron como de escaso potencial de respuesta. La concentración en suero de la hormona antimülleriana (AMH) se establece ahora como marcador fiable de la reserva ovárica. Niveles decrecientes de AMH se correlacionan con una respuesta ovárica reducida a gonadotropinas durante COS. Además, altos niveles de AMH son un buen factor pronóstico de una respuesta ovárica excesiva, y un indicador de riesgo de desarrollar OHSS.

25 En un estudio preliminar de mujeres con menos de 35 años de edad que se sometían a ART, se usó el algoritmo de dosificación CONSORT (que incorpora FSH basal, IMC, edad y AFC) para predecir la dosis inicial óptima de FSH para COS en mujeres que corren el riesgo de desarrollar OHSS (Olivennes *et al.*, 2009). La individualización de la dosis condujo a un rendimiento de ovocitos adecuado y una buena tasa de embarazos. Sin embargo, hubo altas tasas de cancelaciones en el grupo de dosis baja (75 UI de FSH) debido a una respuesta inadecuada, y se produjo OHSS en una proporción significativa de las pacientes.

30 Por tanto, existe la necesidad de una composición para su uso en protocolos de COS individualizados que proporcione una respuesta adecuada a la estimulación, y/o una disminución del riesgo de desarrollar OHSS.

35 Tal como se indicó anteriormente, los protocolos de COS convencionales pueden incluir la administración de FSH. FSH se secreta de manera natural por la hipófisis anterior y funciona soportando el desarrollo folicular y la ovulación. FSH comprende una subunidad alfa de 92 aminoácidos, también común para las demás hormonas de glicoproteína LH y CG, y una subunidad beta de 111 aminoácidos única para FSH que confiere la especificidad biológica de la hormona (Pierce y Parsons, 1981). Cada subunidad se modifica de manera postraducciona mediante la adición de residuos de hidratos de carbono complejos. Ambas subunidades portan 2 sitios para la unión a glicano unido a N, la subunidad alfa en los aminoácidos 52 y 78 y la subunidad beta en los residuos de aminoácido 7 y 24 (Rathnam y Saxena, 1975, Saxena y Rathnam, 1976). Por tanto, FSH se glicosila hasta aproximadamente el 30% en masa (Dias y Van Roey, 2001. Fox *et al.* 2001).

40 Se ha usado FSH purificada a partir de orina humana posmenopáusica durante muchos años en el tratamiento de la esterilidad; tanto para fomentar la ovulación en la reproducción natural como para proporcionar ovocitos para tecnologías de reproducción asistida. Los productos de FSH recombinante (rFSH) aprobados actualmente para estimulación ovárica, tales como folitropina alfa (GONAL-F, Merck Serono / EMD Serono) y folitropina beta (PUREGON / FOLLISTIM, MSD / Schering-Plough), se derivan de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO). Actualmente, no está disponible comercialmente ningún producto de rFSH procedente de una línea celular humana.

45 Existe una heterogeneidad considerable asociada con las preparaciones FSH que está relacionada con diferencias en las cantidades de las diversas isoformas presentes. Las isoformas de FSH individuales presentan secuencias de aminoácidos idénticas pero difieren en el grado en que se modifican de manera postraducciona; isoformas particulares se caracterizan por heterogeneidad de las estructuras de ramificación de hidrato de carbono y las distintas cantidades de incorporación de ácido siálico (un azúcar terminal), que parecen influir ambas en la actividad biológica de la isoforma específica.

50 La glicosilación de FSH natural es sumamente compleja. Los glicanos en FSH hipofisaria derivada de manera natural pueden contener una amplia variedad de estructuras que pueden incluir combinaciones de glicanos mono-, bi-, tri- y tetra-antennarios (Pierce y Parsons, 1981. Ryan *et al.*, 1987. Baenziger y Green, 1988). Los glicanos pueden portar modificaciones adicionales: fucosilación central, glucosamina bisectriz, cadenas extendidas con acetil-lactosamina, sialilación parcial o completa, sialilación con uniones α 2,3 y α 2,6, y galactosamina sulfatada sustituida por galactosa (Dalpathado *et al.*, 2006). Además, existen diferencias entre las distribuciones de 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 las mujeres posmenopáusicas (Wide *et al.*, 2007).

5 La glicosilación de productos de FSH recombinante refleja la gama de glicosil-transferasas presentes en la línea celular del huésped. Los productos de rFSH disponibles comercialmente se derivan de células de ovario de hámster chino (células CHO) modificadas por ingeniería genética. La variedad de modificaciones de glicano en rFSH derivada de células CHO son más limitadas que las encontradas en los productos naturales. Los ejemplos de la heterogeneidad de glicano reducida en rFSH derivada de células CHO incluyen una ausencia de glucosamina bisectriz y un contenido reducido de fucosilación central y extensiones de acetil-lactosamina (Hard *et al.*, 1990). Además, las células CHO sólo pueden añadir ácido siálico usando la unión α 2,3 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990); rFSH derivada de células CHO sólo incluye ácido siálico con uniones α 2,3 y no incluye ácido siálico con uniones α 2,6.

Por tanto, FSH derivada de células CHO es diferente de la FSH producida de manera natural (por ejemplo, FSH hipofisaria / de suero / de orina humana) que contiene glicanos con una mezcla de ácido siálico con uniones α 2,3 y α 2,6, con una predominancia del primero.

15 Además, se ha demostrado que la preparación de FSH recombinante disponible comercialmente difiere en las cantidades de FSH con un punto isoeléctrico (pI) inferior a 4 (consideradas las isoformas ácidas) en comparación con FSH hipofisaria, de suero o de orina posmenopáusica (Ulloa-Aguirre *et al.* 1995). La cantidad de isoformas ácidas en las preparaciones de orina fue mucho mayor en comparación con los productos recombinantes derivados de células CHO, Gonal-f (Merck Serono) y Puregon (Schering Plough) (Andersen *et al.* 2004). Esto debe reflejar un menor contenido molar de ácido siálico en la FSH recombinante puesto que el contenido de glicano cargado negativamente modificado con sulfato es bajo en FSH recombinante. El menor contenido de ácido siálico, en comparación con FSH natural, es una característica de ambos productos de FSH recombinante disponibles comercialmente y puede reflejar una limitación en el proceso de fabricación.

25 Se ha documentado la semivida circulatoria de FSH para materiales procedentes de una variedad de fuentes. Algunos de estos materiales se han fraccionado basándose en la carga molecular global, tal como se caracteriza por su pI, en el que más ácido es igual a una mayor carga negativa. Tal como se estableció previamente, el principal factor contribuyente a la carga molecular global es el contenido de ácido siálico total 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 mayor contenido de ácido siálico (de Leeuw *et al.* 1996). Las tasas de aclaramiento plasmático correspondientes en la rata son de 0,34 y 0,14 ml/min (Ulloa-Aguirre *et al.* 2003). En otro ejemplo en el que se dividió una muestra de FSH recombinante en fracciones de alto y bajo pI, disminuyó la potencia *in vivo* de la fracción de alto pI (menor contenido de ácido siálico) y tuvo una semivida plasmática más corta (D'Antonio *et al.* 1999). También se ha notificado que la FSH más básica circulante durante las etapas posteriores del ciclo de ovulación se debe a la regulación por disminución de α 2,3 sialil-transferasa en la hipófisis anterior que está provocada por niveles crecientes de estradiol (Damian-Matsumara *et al.* 1999. Ulloa-Aguirre *et al.* 2001). No se han notificado resultados para la α 2,6 sialil-transferasa.

Por tanto, tal como se expuso anteriormente, proteínas recombinantes expresadas usando el sistema CHO diferirán de sus homólogos naturales en su tipo de uniones de ácido siálico terminales. Esto es una consideración importante en la producción de productos biológicos para uso farmacéutico puesto que los restos de hidrato de carbono pueden contribuir a los atributos farmacológicos de la molécula.

Los presentes solicitantes han desarrollado una FSH recombinante derivada de ser humano que es el objeto de la solicitud de patente internacional n.º PCT/GB2009/000978, publicada como documento WO2009/127826A. Se preparó FSH recombinante con una mezcla de ácido siálico con uniones tanto α 2,3 como α 2,6 mediante modificación por ingeniería genética de una línea celular humana para expresar tanto rFSH como α 2,3-sialiltransferasa. El producto expresado es altamente ácido y porta una mezcla de ácidos siálicos con uniones tanto α 2,3 como α 2,6; este último proporcionado mediante la actividad sialil transferasa endógena. Se encontró que el tipo de unión del ácido siálico, α 2,3- o α 2,6-, puede tener una influencia drástica sobre el aclaramiento biológico de FSH. La FSH recombinante con una mezcla de ácido siálico con uniones tanto α 2,3 como α 2,6 tiene dos ventajas con respecto a rFSH expresada en células CHO convencionales: en primer lugar, el material está más altamente sialilado debido a las actividades combinadas de las dos sialiltransferasas; y en segundo lugar, el material se asemeja más estrechamente a la FSH natural. Probablemente, esto es más apropiado a nivel biológico en comparación con productos recombinantes derivados de células CHO que han producido sólo ácido siálico con uniones α 2,3 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990) y tienen un contenido de ácido siálico disminuido (Ulloa-Aguirre *et al.* 1995., Andersen *et al.* 2004).

55 El producto de rFSH dado a conocer en la solicitud de patente internacional n.º PCT/GB2009/000978 contiene restos de glicano ramificado. La FSH comprende glicanos (unidos a las glicoproteínas de FSH) y estos glicanos pueden contener una amplia variedad de estructuras. Tal como se conoce bien en la técnica, la ramificación (de un glicano) puede producirse con el resultado de que el glicano puede tener 1, 2, 3, 4 o más residuos de azúcar terminales o "antenas"; los glicanos con 1, 2, 3 ó 4 residuos de azúcar terminales o "antenas" se denominan respectivamente

estructuras mono-antenarias, di-antenarias, tri-antenarias o tetra-antenarias. Los glicanos pueden tener la presencia de sialilación en estructuras mono-antenarias y/o di-antenarias y/o tri-antenarias y/o tetra-antenarias. Una rFSH a modo de ejemplo dada a conocer en la solicitud de patente internacional n.º PCT/GB2009/000978 incluía estructuras de glicano mono-sialiladas, di-sialiladas, tri-sialiladas y tetra-sialiladas con las siguientes cantidades relativas: el 9-15% de mono-sialiladas; el 27 - 30% de di-sialiladas; el 30 - 36% de tri-sialiladas y el 25 - 29% de tetrasialiladas. Tal como se conoce bien, una estructura de glicano mono-sialilada porta un residuo de ácido siálico; una estructura de glicano di-sialilada porta dos residuos de ácido siálico; una estructura de glicano tri-sialilada porta tres residuos de ácido siálico; y una estructura de glicano tetra-sialilada porta cuatro residuos de ácido siálico. En el presente documento, terminología tal como "X% de mono-sialiladas", "X% de di-sialiladas", "X% de tri-sialiladas" o "X% de tetra-sialiladas" se refiere al número de estructuras de glicano en FSH que están mono-, di, tri o tetra-sialiladas (respectivamente), expresadas como porcentaje (X%) del número total de estructuras de glicano en la FSH que están sialiladas de algún modo (portan ácido siálico). Por tanto, la expresión "el 30 - 36% de estructuras de glicano tri-sialiladas" significa que, del número total de estructuras de glicano en la FSH que portan residuos de ácido siálico (es decir, están sialiladas), del 30 al 36% de estas estructuras de glicano están tri-sialiladas (portan tres residuos de ácido siálico). Los solicitantes han encontrado sorprendentemente que FSH que tiene una cantidad específica de estructuras de glicano tetra-sialiladas (que es diferente a la del producto de rFSH a modo de ejemplo dado a conocer en el documento PCT/GB2009/000978 mencionado anteriormente) es notablemente más potente que productos de FSH recombinante que están actualmente en el mercado. La secuencia de aminoácidos de los productos del solicitante es la secuencia nativa y es idéntica a FSH humana natural y productos de rFSH derivados de células CHO existentes. Sin embargo, los presentes solicitantes han encontrado que productos de FSH recombinante derivada de ser humano (es decir, FSH recombinante producida o expresada en una línea celular humana por ejemplo preparada mediante modificación por ingeniería genética de una línea celular humana) que tienen una mezcla de ácido siálico con uniones tanto α 2,3 como α 2,6 y/o una cantidad específica de estructuras de glicano tetra-sialiladas pueden ser particularmente eficaces cuando se usan en protocolos de COS (por ejemplo, individualizados).

Según la invención, se proporciona un producto (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende hormona estimulante del folículo (FSH) para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de <15 pmol/l, en el que el producto va a administrarse a una dosis, o equivalente a, de 11 a 13 μ g de FSH recombinante derivada de ser humano al día, incluyendo la FSH recombinante α 2,3- y α 2,6-sialilación, en el que del 1% al 50% de la sialilación total es α 2,6-sialilación, y del 50% al 99% de la sialilación total es α 2,3-sialilación; y en el que el tratamiento de la esterilidad comprende una etapa de determinación del nivel de AMH en suero de la paciente, y una etapa de la administración de la dosis a una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de <15 pmol/l. Preferiblemente, la FSH es una FSH recombinante derivada de línea celular humana. La dosis proporciona una respuesta eficaz a la vez que se minimiza el riesgo de desarrollar OHSS.

Las dosis anteriores pueden ser para el tratamiento de la esterilidad en el primer protocolo de estimulación de la paciente (del sujeto). Se apreciará que para ciclos de estimulación adicionales, las dosis pueden ajustarse según la respuesta ovárica real en el primer ciclo.

Los solicitantes han encontrado que generalmente es necesario recuperar aproximadamente nueve ovocitos para permitir la selección de dos ovocitos de alta calidad para la transferencia.

Los solicitantes han encontrado que para sujetos que tienen bajo nivel de AMH (AMH < 15 pmol/l por litro) se requiere una dosis razonablemente alta de FSH recombinante (por ejemplo, de 12 μ g) para lograr esto. A esta dosis, se recuperarán de 8 a 14 ovocitos del 60% de los sujetos con bajo nivel de AMH. Esto es una mejora inesperada y significativa con respecto al tratamiento de sujetos con bajo nivel de AMH tratados con 150 UI de Gonal-f, en el que se recuperan de 8 a 14 ovocitos sólo del 33% de los sujetos. Los solicitantes han encontrado que no hay necesidad de ajustar esta dosis según el peso corporal de la paciente.

Sin embargo, el 60% de la población (y el 80% de las mujeres con menos de 30 años tratadas para esterilidad) tienen un alto nivel de AMH (es decir, AMH de \geq 15 pmol/l). Para estos sujetos, generalmente resulta bastante sencillo recuperar una media de 9 a 11 ovocitos; el problema con los protocolos de estimulación es el riesgo de desarrollar OHSS. Los solicitantes han encontrado que en pacientes a las que se les dosificó dosis bajas de FSH recombinante humana existe una relación entre ovocitos recuperados y peso corporal del sujeto. Esto significa que puede haber un riesgo asociado con el tratamiento con una dosis fija de FSH (lo que es habitual en la técnica). Los presentes solicitantes han establecido una relación entre dosis de FSH y nivel de AMH y peso del sujeto que proporciona un perfil de seguridad mejorado (riesgo reducido de desarrollar OHSS) con una recuperación de ovocitos aceptable o mejorada en comparación con los protocolos de tratamiento conocidos (véase el ejemplo 10).

Según la invención, en un aspecto adicional, se proporciona un producto (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende hormona estimulante del folículo (FSH) para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de \geq 15 pmol/l, en el que el producto va a administrarse a una dosis, o equivalente a, de 0,09 a 0,19 μ g de FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente al día, incluyendo la FSH recombinante α 2,3- y α 2,6-sialilación, en el que del 1% al 50% de la sialilación total es α 2,6-sialilación, y del 50% al 99% de la sialilación total es α 2,3-sialilación; y en el que el tratamiento de la

- esterilidad comprende una etapa de determinación del nivel de AMH en suero de la paciente, y una etapa de administración de la dosis a una paciente que tiene el nivel de AMH en suero definido. En una realización, el producto es para su uso en el tratamiento de una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 15 a 24,9 pmol/l, y el producto va a administrarse a una dosis, o equivalente a, de 0,14 a 0,19 μg de FSH recombinante por kg de peso corporal de la paciente al día. En esta realización, el tratamiento de la esterilidad puede comprender una etapa de determinación (por ejemplo, medición) del nivel de AMH en suero de la paciente, y administración de la dosis a una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 15 a 24,9 pmol/l. En una realización, el producto es para su uso en el tratamiento de una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 25 a 34,9 pmol/l, y el producto va a administrarse a una dosis, o equivalente a, de 0,11 a 0,14 μg de FSH recombinante por kg de peso corporal de la paciente al día. En esta realización, el tratamiento de la esterilidad puede comprender una etapa de determinación (por ejemplo, medición) del nivel de AMH en suero de la paciente, y administración de la dosis a una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 25 a 34,9 pmol/l. En una realización, el producto es para su uso en el tratamiento de una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de ≥ 35 pmol/l, y el producto va a administrarse a una dosis, o dosis equivalente a, de 0,10 a 0,11 μg de FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente al día. En esta realización, el tratamiento de la esterilidad puede comprender una etapa de determinación (por ejemplo, medición) del nivel de AMH en suero de la paciente, y administración de la dosis a una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de ≥ 35 pmol/l. Preferiblemente, la FSH es una FSH recombinante derivada de línea celular humana. Las dosis proporcionan una respuesta eficaz a la vez que se minimiza el riesgo de desarrollar OHSS.
- Las dosis anteriores pueden ser para el tratamiento de la esterilidad en el primer protocolo de estimulación de la paciente (del sujeto). Se apreciará que para ciclos de estimulación adicionales, las dosis pueden ajustarse según la respuesta ovárica real en el primer ciclo.
- Se apreciará que estas dosis pueden convertirse fácilmente para tratar pacientes con una dosificación según su IMC, usando conversiones bien conocidas en la técnica.
- Preferiblemente, la rFSH (por ejemplo, FSH recombinante derivada de línea celular humana) incluye $\alpha 2,3$ - y $\alpha 2,6$ -sialilación. La FSH (rFSH) para su uso según la invención puede tener del 50% al 99% de la sialilación total que es $\alpha 2,3$ -sialilación. La FSH (rFSH) según la invención puede tener del 1% al 50% de la sialilación total que es $\alpha 2,6$ -sialilación. Preferiblemente, del 50 al 70%, por ejemplo del 60 al 69%, por ejemplo aproximadamente el 65%, de la sialilación total es $\alpha 2,3$ -sialilación. Preferiblemente, del 25 al 50%, por ejemplo del 30 al 50%, por ejemplo del 31 al 38%, por ejemplo aproximadamente el 35%, de la sialilación total es $\alpha 2,6$ -sialilación.
- Preferiblemente, la rFSH (por ejemplo, FSH recombinante derivada de línea celular humana) incluye estructuras de glicano mono-, di-, tri- y tetra-sialiladas, en las que el 15-24%, por ejemplo el 17-23% de las estructuras de glicano sialiladas son estructuras de glicano tetrasialiladas (por ejemplo, tal como se muestra mediante análisis por WAX de glicanos cargados, tal como se expone en los ejemplos a continuación). La FSH comprende glicanos (unidos a las glicoproteínas de FSH). Se conoce bien que los glicanos en FSH pueden contener una amplia variedad de estructuras. Estas pueden incluir combinaciones de glicanos mono, bi, tri y tetra-antenarios. En el presente documento, terminología tal como "X% de las estructuras de glicano sialiladas son estructuras de glicano tetrasialiladas" se refiere al número de estructuras de glicano en la FSH que están tetra-sialiladas, es decir portan cuatro residuos de ácido siálico, expresadas como porcentaje (X%) del número total de estructuras de glicano en la FSH que están sialiladas de algún modo (portan ácido siálico). Por tanto, la expresión "el 15-24% de las estructuras de glicano sialiladas son estructuras de glicano tetrasialiladas" significa que, del número total de estructuras de glicano en FSH que portan residuos de ácido siálico (es decir, están sialiladas), del 15 al 24% de estas estructuras de glicano están tetra-sialiladas (portan cuatro residuos de ácido siálico).
- La rFSH puede estar presente como una única isoforma o como una mezcla de isoformas.
- Los solicitantes han concebido protocolos de COS "individualizados" en los que se usan dosis específicas de FSH recombinante que tienen características específicas para tratar pacientes basándose en sus niveles de AMH específicos, aumentando de ese modo la probabilidad de una respuesta adecuada a la estimulación (por ejemplo, en pacientes que tienen un bajo potencial de respuesta), y/o un riesgo disminuido de desarrollar OHSS (por ejemplo, en pacientes que se clasificaron como de potencial de respuesta alto o excesivo).
- El nivel de AMH en suero puede determinarse (por ejemplo, medirse) mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente, el nivel de AMH en suero se mide usando el kit del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas AMH Gen-II (Beckman Coulter, Inc., Webster, Texas). Este ensayo puede detectar concentraciones de AMH mayores de 0,57 pmol/l con un límite de cuantificación mínimo de 1,1 pmol/l. Pueden usarse otros ensayos.
- En el presente documento, los valores de AMH en suero se citan generalmente en cuanto a pmol/l. Esto puede convertirse a ng/ml usando la ecuación de conversión: 1 ng/ml de AMH = 7,1 pmol/l de AMH.
- En el presente documento, los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente.
- El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) comprende preferiblemente una dosis diaria de, o una dosis

diaria equivalente a, las cantidades de rFSH derivada de ser humano definidas anteriormente, en el presente documento, y en las reivindicaciones. La dosis (diaria) puede ser una dosis inicial (es decir, puede reducirse, aumentarse o mantenerse durante el tratamiento).

5 El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) puede ser para la administración (diaria) de FSH empezando en el día uno de tratamiento y continuando durante de siete a trece días, por ejemplo de nueve a trece días, por ejemplo de 10 a 13 días, por ejemplo de 10 a 11 días. El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) puede ser para la administración de 12 a 16, por ejemplo de 13 a 15, por ejemplo 14 días tras la administración de (por ejemplo, tras el inicio de la administración de, por ejemplo tras el inicio de la administración diaria de) un agonista de GnRH (por ejemplo, Synarel, Lupron, Decapeptyl). El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) puede ser para la administración con un agonista de GnRH. El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) puede ser para la administración antes de la administración de un antagonista de GnRH (por ejemplo, ganirelix, cetrorelix), por ejemplo para la administración cinco o seis días antes de la administración de un antagonista de GnRH. El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) puede ser para la administración con un antagonista de GnRH. Preferiblemente, el producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) es para la administración antes de la administración de una dosis alta (ovulatoria) de hCG (por ejemplo, de 4.000 a 11.000 UI de hCG, por ejemplo 5.000 UI de hCG, 10.000 UI de hCG etc.; o de 150 a 350 microgramos de hCG recombinante, por ejemplo 250 microgramos de hCG recombinante) para inducir la maduración folicular final.

Se apreciará que el producto puede ser para una dosificación a frecuencias más frecuentes (o menos) que diaria, en cuyo caso las dosis relevantes serán equivalentes a las dosis (diarias) especificadas en el presente documento.

20 En el presente documento, el término "tratamiento de la esterilidad" incluye tratamiento de la esterilidad mediante estimulación ovárica controlada (COS) o métodos que incluyen una etapa o fase de estimulación ovárica controlada (COS), por ejemplo inseminación intrauterina (IUI), fecundación *in vitro* (IVF) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). El término "tratamiento de la esterilidad" incluye tratamiento de la esterilidad mediante inducción de la ovulación (OI) o mediante métodos que incluyen una etapa o fase de inducción de la ovulación (OI).
25 El término "tratamiento de la esterilidad" incluye tratamiento de la esterilidad en un sujeto que tiene esterilidad tubárica o idiopática, incluyendo tratamiento de la esterilidad en un sujeto que tiene endometriosis, por ejemplo endometriosis de estadio I o estadio II, y/o en un sujeto que tiene esterilidad anovulatoria, por ejemplo esterilidad anovulatoria de tipo II de la OMS, y/o en un sujeto con una pareja con esterilidad por factor masculino. El producto (o la composición) puede ser para (su uso en) el tratamiento de la esterilidad (y/o para la estimulación ovárica controlada) en un sujeto que tiene endometriosis, por ejemplo en un sujeto que tiene endometriosis de estadio I o estadio II, tal como se define por el sistema de clasificación de The American Society for Reproductive Medicine (ASRM) para los diversos estadios de endometriosis, (estadio IV el más intenso; estadio I el menos intenso) [American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril 1997; 67:817-821].

35 El producto (la composición) puede ser para (su uso en) el tratamiento de la esterilidad (y/o para la estimulación ovárica controlada) en un sujeto que tiene un nivel de FSH en suero normal de 1 a 16 UI/l, por ejemplo de 1 a 12 UI/l en la fase folicular temprana.

El producto (la composición) puede ser para (su uso en) el tratamiento de la esterilidad (y/o para la estimulación ovárica controlada) en un sujeto de 18 a 42 años de edad, por ejemplo de 25 a 37 años de edad. El producto puede ser para (su uso en) el tratamiento de la esterilidad (y/o para la estimulación ovárica controlada) en un sujeto que tiene un IMC >1 e IMC < 35 kg/m², por ejemplo un sujeto que tiene un IMC >18 e IMC < 25 kg/m², por ejemplo un sujeto que tiene un IMC >20 e IMC < 25 kg/m².

45 La rFSH puede incluir preferiblemente el 27 - 33%, por ejemplo el 30 - 32%, de estructuras de glicano tri-sialiladas. La rFSH puede incluir preferiblemente el 24 - 33%, por ejemplo el 26 - 30%, de estructuras de glicano di-sialiladas. La rFSH puede incluir preferiblemente el 12 - 21%, por ejemplo el 15 - 17%, de estructuras de glicano mono-sialiladas. La rFSH incluye preferiblemente estructuras de glicano mono-sialiladas, di-sialiladas, tri-sialiladas y tetra-sialiladas con las siguientes cantidades relativas: del 15 al 17% de mono-sialiladas; el 26 - 30% de di-sialiladas; el 27 - 33% (por ejemplo, del 29 al 32%, por ejemplo el 30-32%, por ejemplo del 30 al 31%) de tri-sialiladas y el 17 - 23% de tetra-sialiladas (por ejemplo, tal como se muestra mediante análisis por WAX de glicanos cargados, tal como se expone en los ejemplos). La rFSH puede incluir desde el 0 hasta el 7%, por ejemplo del 0,1 al 7%, por ejemplo del 3 al 6%, por ejemplo del 5 al 6%, de estructuras sialiladas neutras. La FSH comprende glicanos (unidos a las glicoproteínas de la FSH). En el presente documento, terminología tal como "X% de mono-sialiladas", "X% de di-sialiladas", "X% de tri-sialiladas" o "X% de tetra-sialiladas" se refiere al número de estructuras de glicano en FSH que están mono-, di, tri o tetra-sialiladas (respectivamente), expresadas como porcentaje (X%) del número total de estructuras de glicano en la FSH que están sialiladas de algún modo (portan ácido siálico). Por tanto, la expresión "el 27 - 33% de estructuras de glicano tri-sialiladas" significa que, del número total de estructuras de glicano en FSH que portan residuos de ácido siálico (es decir, están sialiladas), del 27 al 33% de estas estructuras de glicano están tri-sialiladas (portan tres residuos de ácido siálico).

60 La rFSH puede tener un contenido de ácido siálico [expresado en cuanto a la razón de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína] de 6 mol/mol o mayor, por ejemplo entre 6 mol/mol y 15 mol/mol, por ejemplo entre

8 mol/mol y 14 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 puede producirse o expresarse en una línea celular humana.

5 La FSH (rFSH) para su uso según la invención puede tener del 50% al 99% de la sialilación total que es α 2,3-sialilación. La rFSH puede tener el 50% o más de la sialilación total que es α 2,3-sialilación. Por ejemplo, el 50, el 60, el 70, el 80 o el 90% o más de la sialilación total puede ser α 2,3-sialilación. La rFSH puede incluir preferiblemente α 2,3-sialilación en una cantidad que es de desde el 50 hasta el 70% de la sialilación total, por ejemplo desde el 60 hasta el 69% de la sialilación total, por ejemplo desde el 63 hasta el 67%, por ejemplo aproximadamente el 65% de la sialilación total. La FSH (rFSH) para su uso según la invención puede tener del 1% al 50% de la sialilación total que es α 2,6-sialilación. La rFSH (o preparación de rFSH) de la invención puede tener el 5% o más, por ejemplo del 5% al 50%, de la sialilación total que es α 2,6-sialilación. La rFSH puede tener el 50% o menos de la sialilación total que es α 2,6-sialilación. La rFSH puede incluir preferiblemente α 2,6-sialilación en una cantidad que es de desde el 25 hasta el 50% de la sialilación total, por ejemplo desde el 30 hasta el 50% de la sialilación total, por ejemplo desde el 31 hasta el 38%, por ejemplo aproximadamente el 35% de la sialilación total. Por sialilación, quiere decirse la cantidad de residuos de ácido siálico presentes en las estructuras de hidrato de carbono de la FSH. α 2,3-Sialilación significa sialilación en la posición 2,3 (tal como se conoce bien en la técnica) y α 2,6-sialilación en la posición 2,6 (también se conoce bien en la técnica). Por tanto “% de la sialilación total puede ser α 2,3 sialilación” 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 la sialilación total que es α 2,6-sialilación” se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,6.

La rFSH puede tener un contenido de ácido siálico (cantidad de sialilación por molécula de FSH) de (basándose en la masa de proteína, en vez de la masa de proteína más hidrato de carbono) del 6% o mayor (por ejemplo, entre el 6% y el 15%, por ejemplo entre el 7% y el 13%, por ejemplo entre el 8% y el 12%, por ejemplo entre el 11% y el 15%, por ejemplo entre el 12% y el 14%) en masa.

25 La rFSH puede ser rFSH o una preparación de rFSH en la que el 16% o menos (por ejemplo, del 0,1 al 16%) de los glicanos comprenden (por ejemplo, portan) N-acetilglucosamina bisectriz (GlcNAc bisectriz o bisGlcNAc). Preferiblemente, la rFSH (o preparación de rFSH) es una rFSH o preparación de rFSH en la que del 8 al 14,5% de los glicanos comprenden (por ejemplo, portan) una N-acetilglucosamina bisectriz (GlcNAc bisectriz o bisGlcNAc).

30 Se entenderá que FSH comprende glicanos unidos a las glicoproteínas de la FSH. También se entenderá que el 100% de los glicanos se refiere a o significa todos los glicanos unidos a las glicoproteínas de la FSH. Por tanto, en el presente documento, la terminología “del 8 al 14,5% de los glicanos comprenden (portan) N-acetilglucosamina bisectriz” significa que del 8 al 14,5% del número total de glicanos unidos a las glicoproteínas de la FSH incluyen/portan N-acetilglucosamina bisectriz; “el 16% o menos de los glicanos comprenden (portan) N-acetilglucosamina bisectriz” significa que el 16% o menos del número total de glicanos unidos a las glicoproteínas de la FSH incluyen/portan N-acetilglucosamina bisectriz, etcétera.

35 Los solicitantes han encontrado que FSH recombinante (preparaciones de rFSH; composiciones de rFSH) en la que el 16% o menos (por ejemplo, del 8 al 14,5%) de los glicanos comprendidos en las glicoproteínas de la FSH portan GlcNAc bisectriz puede tener propiedades farmacocinéticas ventajosas. Se cree que las propiedades ventajosas pueden surgir debido a que la cantidad de glicanos que portan GlcNAc bisectriz es similar a la que existe en el producto derivado de orina humana Bravelle, que es bastante menor que la de otras preparaciones de FSH recombinante tales como las dadas a conocer en el documento WO2012/017058.

40 La rFSH (o preparación de rFSH) puede ser una rFSH o preparación de rFSH en la que el 20% o más de los glicanos comprenden (por ejemplo, portan) N-acetilgalactosamina (GalNAc), por ejemplo en la que el 20% o más de los glicanos comprenden (por ejemplo, portan) una GalNAc terminal. Preferiblemente, la rFSH (o preparación de rFSH) es una FSH o preparación de FSH en la que del 40 al 55%, por ejemplo del 42 al 52%, de los glicanos comprenden (por ejemplo, portan) GalNAc. Preferiblemente, la rFSH (o preparación de rFSH) es una FSH o preparación de FSH en la que del 40 al 55%, por ejemplo del 42 al 52%, de los glicanos comprenden (por ejemplo, portan) GalNAc terminal.

45 Se entenderá que FSH comprende glicanos unidos a las glicoproteínas de la FSH. También se entenderá que el 100% de los glicanos se refiere a o significa todos los glicanos unidos a las glicoproteínas de la FSH. Por tanto, en el presente documento, la terminología “en la que el 20% o más de los glicanos comprenden (por ejemplo, portan) GalNAc” significa que el 20% o más del número total de glicanos unidos a las glicoproteínas de la FSH incluyen/portan N-acetilgalactosamina (GalNAc); “del 40 al 55%, por ejemplo del 42 al 52%, de los glicanos comprenden (por ejemplo, portan) GalNAc terminal” significa que del 40 al 55%, por ejemplo del 42 al 52%, del número total de glicanos unidos a las glicoproteínas de la FSH incluyen/portan GalNAc terminal, etcétera.

50 Parece que la disponibilidad de la unión α 2,6 aumenta el número de estructuras tetra-sialiladas, en comparación con productos derivados de células CHO que tienen sólo la unión α 2,3 disponible. Los solicitantes también han encontrado que su rFSH se distingue con respecto a otros productos aprobados debido a la composición de

azúcares: incluye, o puede incluir, una cantidad específica de GalNac. Esto puede vincularse con la tetrasialilación y potencia porque la 2,6-sialilación está asociada con GalNac. En otras palabras, los presentes solicitantes han desarrollado un producto de rFSH que incluye características específicas (sitios de grupo de unión 2,6, GalNac) que proporcionan rFSH con un alto grado de sialilación, lo que parece conducir a una potencia mejorada *in vivo*.

- 5 La rFSH (o preparación de rFSH) puede tener del 16 al 24% de los glicanos que comprenden 1-fucosa-Lewis (por ejemplo, terminal), por ejemplo del 16,5 al 18% de los glicanos que comprenden 1-fucosa-Lewis (por ejemplo, terminal). La rFSH (o preparación de rFSH) puede tener del 1,5 al 4,5%, por ejemplo del 2 al 4%, por ejemplo el 3,7%, de los glicanos que comprenden 2-fucosa-Lewis (por ejemplo, terminal). El contenido de fucosa-Lewis puede tener un efecto sobre la potencia.
- 10 La rFSH puede producirse o expresarse en una línea celular humana, por ejemplo una línea celular Per.C6, una línea celular HT1080, etc. Esto puede simplificar (y hacer más eficaz) el método de producción porque la manipulación y el control de, por ejemplo, el medio de crecimiento celular para conservar la sialilación pueden ser menos críticos que con procedimientos conocidos. El método también puede ser más eficaz porque se produce poca cantidad de rFSH básica en comparación con la producción de productos de rFSH conocidos; se produce más rFSH
- 15 ácida y la separación/retirada de FSH básica es menos problemática. La rFSH puede producirse o expresarse en una línea celular PER.C6®, una línea celular derivada de PER.C6® o una línea celular PER.C6® modificada. rFSH que se produce o se expresa en una línea celular humana (por ejemplo, línea celular PER.C6®, línea celular HT1080, etc.) incluirá cierta cantidad de ácidos siálicos con uniones $\alpha 2,6$ ($\alpha 2,6$ -sialilación) proporcionados por actividad sialil transferasa endógena [de la línea celular] e incluirá cierta cantidad de ácidos siálicos con uniones
- 20 $\alpha 2,3$ ($\alpha 2,3$ -sialilación) proporcionados por actividad sialil transferasa endógena. La línea celular puede modificarse usando $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa. La línea celular puede modificarse usando $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa. Alternativa o adicionalmente, la rFSH puede incluir ácidos siálicos con uniones $\alpha 2,6$ ($\alpha 2,6$ -sialilación) proporcionados por actividad sialil transferasa endógena [de la línea celular]. En el presente documento, el término "FSH recombinante derivada de ser humano" significa FSH recombinante que se produce o se expresa en una línea celular humana (por
- 25 ejemplo, FSH recombinante preparada mediante modificación por ingeniería genética de una línea celular humana).

La rFSH puede producirse usando $\alpha 2,3$ - y/o $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa. En una ejemplo, rFSH se produce usando $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa. La rFSH puede incluir ácidos siálicos con uniones $\alpha 2,6$ ($\alpha 2,6$ -sialilación) proporcionados por actividad sialil transferasa endógena.

- 30 El producto puede ser una composición farmacéutica. La composición farmacéutica es para el tratamiento de la esterilidad. El tratamiento de la esterilidad puede comprender tecnologías de reproducción asistida (ART), inducción de la ovulación o inseminación intrauterina (IUI). La composición farmacéutica puede usarse, por ejemplo, en indicaciones médicas en las que se usan las preparaciones de FSH conocidas.

- El producto o la composición puede formularse en composiciones bien conocidas por cualquier vía de administración de fármacos, por ejemplo oral, rectal, parenteral, transdérmica (por ejemplo, tecnología de parche), intravenosa,
- 35 intramuscular, subcutánea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, pomadas o gotas) o como pulverización bucal o nasal. Una composición típica comprende un portador farmacéuticamente aceptable, tal como disolución acuosa, excipientes no tóxicos, incluyendo sales y conservantes, tampones y similares, tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, decimoquinta edición (Matt Publishing Company, 1975), en las páginas 1405 a 1412 y 1461 - 87, y el Formulario Nacional XIV decimoquarta edición (American Pharmaceutical
- 40 Association, 1975), entre otros.

- Los ejemplos de portadores farmacéuticos, diluyentes, disolventes o vehículos 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 (tales como aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables
- 45 tales como oleato de etilo. Las composiciones de la presente invención también pueden contener aditivos tales como pero sin limitarse a conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, tensioactivos y agentes dispersantes. Pueden incluirse agentes antibacterianos y antifúngicos para impedir el crecimiento de microbios e incluyen, por ejemplo, m-cresol, alcohol bencílico, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Si se incluye un conservante, se prefieren alcohol bencílico, fenol y/o m-cresol; sin embargo, el conservante no se limita en absoluto a estos ejemplos. Además, puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro
- 50 de sodio, y similares. El producto o la composición puede comprender además una sal que comprende un catión de metal alcalino farmacéuticamente aceptable seleccionada del grupo que consiste en sales de Na^+ o K^+ , o una combinación de las mismas. Preferiblemente, la sal es una sal de Na^+ , por ejemplo NaCl o Na_2SO_4 .

Preferiblemente, el producto o la composición comprende FSH recombinante y uno o más de polisorbato 20, L-metionina, fenol, sulfato de disodio y tampón fosfato de sodio.

- 55 En algunos casos, para realizar una acción prolongada, es deseable ralentizar la absorción de FSH (y otros principios activos, si están presentes) a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con escasa 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 cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de combinación de

FSH administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo la combinación de FSH en un vehículo aceitoso. Pueden prepararse formas de depósito inyectables formando matrices de microencapsulación de la FSH (y otros agentes, si están presentes) en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la razón de FSH con respecto a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación de FSH. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen polivinilpirrolidona, poliortoésteres, polianhídridos, etc. También se preparan formulaciones inyectables de depósito atrapando la FSH en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso. Pueden suministrarse formulaciones inyectables en cualquier recipiente adecuado, por ejemplo vial, jeringa precargada, cartuchos para inyección, y similares.

El producto o la composición puede formularse para un único uso o para múltiples usos (múltiples dosis). Si el producto o la composición se formula para múltiples usos, se prefiere que se incluya un conservante. Si se incluye un conservante, se prefieren alcohol bencílico, fenol y/o m-cresol; sin embargo, el conservante no se limita en absoluto a estos ejemplos. El producto o la composición formulado para un único uso o múltiples usos puede comprender además una sal que comprende un catión de metal alcalino farmacéuticamente aceptable seleccionada del grupo que consiste en sales de Na^+ o K^+ , o una combinación de las mismas. Preferiblemente, la sal es una sal de Na^+ , por ejemplo NaCl o Na_2SO_4 .

El producto o la composición puede incluirse en un recipiente tal como un vial, cartucho precargado (por ejemplo, para una única administración o múltiples usos) o un dispositivo de inyección tal como una "pluma" por ejemplo para la administración de múltiples dosis.

El producto o la composición puede ser una formulación (por ejemplo, formulación inyectable) que incluye FSH (opcionalmente con hCG, LH, actividad LH etc.) La actividad LH, si está presente, puede originarse a partir de LH o gonadotropina coriónica humana, hCG. 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 conjuntamente. Si se administran por separado, la administración puede ser secuencial. El producto puede suministrarse en cualquier envase apropiado. Por ejemplo, un producto puede incluir varios recipientes (por ejemplo, jeringas precargadas o viales) que contienen o bien FSH o bien hCG, o una combinación (o combinación) tanto de FSH como de hCG. La hCG puede ser hCG recombinante o hCG de orina. Si el producto incluye varios recipientes (por ejemplo, jeringas precargadas o viales) que contienen FSH, por ejemplo FSH recombinante, cada recipiente puede incluir la misma cantidad de FSH. Uno o más recipientes pueden incluir diferentes cantidades de FSH. Las jeringas o los viales pueden envasarse en un envase de tipo blíster u otros medios para mantener la esterilidad. Cualquier producto puede contener opcionalmente instrucciones para el uso de las formulaciones de FSH (y por ejemplo hCG si está presente).

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

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

la figura 1 muestra un mapa de plásmido 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 % de abundancia de la distribución de ácido siálico de ejemplos de FSH recombinante producida por células PER.C6® que expresan de manera estable FSH tras la modificación por ingeniería genética con α 2,3-sialiltransferasa;

la figura 5 muestra el % de abundancia de la distribución de carga de glicanos de ejemplos de FSH recombinante producida por células PER.C6® que expresan de manera estable FSH tras la modificación por ingeniería genética con α 2,3-sialiltransferasa;

la figura 6 muestra una comparación de la concentración de inhibina-B tras la administración de 225 UI de Gonal f

(línea inferior, línea discontinua) y 225 UI del ejemplo (línea superior, línea continua) de la invención;

la figura 7 muestra el efecto del peso corporal sobre los ovocitos recuperados en el grupo de tratamiento con bajo nivel de AMH (ejemplos 10, 10A); y

5 la figura 8 muestra el efecto del peso corporal sobre los ovocitos recuperados en el grupo de tratamiento con alto nivel de AMH.

Selección de secuencias

FSH humana

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

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

Sialiltransferasa

15 α 2,3-Sialiltransferasa - Se usó la región codificante del gen para beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 (α 2,3-sialiltransferasa, ST3GAL4) según Kitagawa y Paulson (1994). La secuencia se registra en el banco como L23767 y se denomina en el presente documento SEQ ID NO: 3.

20 α 2,6-Sialiltransferasa - Se usó la región codificante del gen para beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (α 2,6-sialiltransferasa, ST6GAL1) según Grundmann *et al*. (1990). La secuencia se registra en el banco como NM_003032 y se denomina en el presente documento SEQ ID NO: 4.

Ejemplos

Ejemplo 1 Construcción del vector de expresión de FSH

25 Se amplificaron la secuencia codificante del polipéptido de FSH alfa (AH007338, SEQ ID NO: 1) y el polipéptido de FSH beta (NM_003032, SEQ ID NO: 2) mediante PCR usando las combinaciones de cebadores FSHa-fw y FSHa-rev y FSHb-fw y FSHb-rec respectivamente.

FSHa-fw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGGATTACTACAGAAAAATATGC-3' (SEQ ID NO:9)

FSHa-rev 5'-GGATGGCTAGCTTAAGATTTGTGATAATAAC-3' (SEQ ID NO:10)

FSHb-fw 5'-CCAGGCGCGCCACCATGAAGACACTCCAGTTTTTC-3' (SEQ ID NO: 11)

FSHb-rev 5'-CCGGGTTAATTATTATTCTTTCATTTACCAAAGG-3' (SEQ ID NO: 12)

30 Se digirió el ADN de FSH beta amplificado resultante 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 porta un marcador de selección de neomicina. De manera similar, se digirió el ADN de FSH alfa con *Bam*HI y *Nhe*I y se insertó en los sitios *Bam*HI y *Nhe*I en el vector de expresión que ya contiene el ADN del polipéptido de FSH beta.

Se usó el ADN de vector para transformar la cepa DH5 α de *E. coli*. Se escogieron colonias para amplificación. Se seleccionaron las colonias que contenían el vector que contenía tanto FSH alfa como beta para la secuenciación y todas contenían las secuencias correctas según SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Se seleccionó el plásmido pFSH A+B#17 para la transfección (figura 1).

35 Ejemplo 2 Construcción del vector de expresión de ST3

Se amplificó la secuencia codificante de beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 (ST3, L23767, SEQ ID NO: 3) mediante PCR usando la combinación de cebadores 2,3STfw y 2,3STrev.

2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCTCCTGCAGGCTGGAAGC-3' (SEQ ID NO: 13)

2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3' (SEQ ID NO: 14)

40 Se dirigió el ADN de ST3 amplificado resultante con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Afl*II y se insertó en los sitios *Bam*HI y *Afl*II en el vector de expresión de mamíferos dirigido por CMV que porta un marcador de resistencia a higromicina. Se amplificó el vector tal como se describió anteriormente y se secuenció. El clon pST3#1 (figura 2) contenía la secuencia correcta según SEQ ID NO: 3 y se seleccionó para la transfección.

Ejemplo 3 Construcción del vector de expresión de ST6

Se amplificó la secuencia codificante de beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (ST6, NM_003032, SEQ ID NO: 4) mediante PCR usando la combinación de cebadores 2,6STfw y 2,6STrev.

2,6STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGATTCACACCAACCTGAAG-3' (SEQ ID NO: 15)

2,6STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTTAGCAGTGAATGGTCCGG-3' (SEQ ID NO: 16)

- 5 Se digirió el ADN de ST6 amplificado resultante con las enzimas de restricción *Bam*HI y *A*flI y se insertó en los sitios *Bam*HI y *A*flI en el vector de expresión de mamíferos dirigido por CMV que porta un marcador de resistencia a higromicina. Se amplificó el vector tal como se describió anteriormente y se secuenció. El clon pST6#11 (figura 3) contenía la secuencia correcta según SEQ ID NO: 4 y se seleccionó para la transfección.

Ejemplo 4 Expresión estable de pFSH α + β en células PER.C6®. Transfección, aislamiento y examen de clones.

- 10 Se generaron clones de PER.C6® que producían FSH expresando ambas cadenas de polipéptido de FSH a partir de un único plásmido (véase el ejemplo 1).

15 Para obtener clones estables, un agente de transfección basado en liposomas con el constructo pFSH α + β . Se seleccionaron clones estables en VPRO complementado con FCS al 10% y que contenía G418. Tres semanas tras la transfección, crecieron clones resistentes a G418. Se seleccionaron clones para aislamiento. Se cultivaron los clones aislados en medio de selección hasta que fueron confluentes al 70-80%. Se sometieron a ensayo los sobrenadantes para determinar el contenido de proteína FSH usando un ELISA selectivo para FSH y la actividad farmacológica en el receptor de FSH en la línea celular clonada, usando un ensayo de acumulación de AMPc. Se avanzó con clones que expresaban la proteína funcional para la expansión del cultivo en placas de 24 pocillos, 6 pocillos y frascos T80.

- 20 Se iniciaron estudios para determinar la productividad y calidad del material de siete clones en frascos T80 para generar suficiente material. Se cultivaron las células en medios complementados tal como se describió anteriormente durante 7 días y se recogió el sobrenadante. Se determinó la productividad usando el ELISA selectivo para FSH. Se determinó el perfil isoeléctrico del material mediante isoelectroenfoque (IEF), mediante métodos conocidos en la técnica. Se seleccionaron clones con suficiente productividad y calidad para la modificación por ingeniería genética de sialiltransferasa.
- 25

Ejemplo 5 El nivel de sialilación aumenta en células que sobreexpresan α 2,3-sialiltransferasa. Expresión estable de pST3 en células PER.C6® que expresan FSH; transfección, aislamiento y examen de clones.

- 30 Se generaron clones de PER.C6® que producían FSH altamente sialilada expresando α 2,3-sialiltransferasa a partir de plásmidos independientes (ejemplo 2) en células PER.C6® que ya expresan ambas cadenas de polipéptido de FSH (del ejemplo 4). Se seleccionaron clones producidos a partir de las células PER.C6® tal como se expone en el ejemplo 4 por sus características incluyendo productividad, buen perfil de crecimiento, producción de proteína funcional, y produjeron FSH que incluía cierta sialilación. Se generaron clones estables tal como se describió anteriormente en el ejemplo 4. Se aislaron los clones, se expandieron y se sometieron a ensayo. Se adaptaron los clones de α 2,3-sialiltransferasa a medios libres de suero y las condiciones de suspensión.

- 35 Igual que antes, se sometieron a ensayo los clones usando un ELISA selectivo para FSH, la respuesta funcional en una línea celular de receptor de FSH, IEF, tasa de aclaramiento metabólico y análisis de Steelman Pohley. Se compararon los resultados con una FSH recombinante disponible comercialmente (Gonal-f, Serono) y las líneas celulares PER.C6® de FSH parentales. La FSH producida por la mayor parte de los clones tiene una sialilación significativamente mejorada (es decir, en promedio más isoformas de FSH con altos números de ácidos siálicos) en comparación con FSH expresada sin α 2,3-sialiltransferasa. En conclusión, la expresión de FSH junto con sialiltransferasa en células PER.C6® dio como resultado un aumento de los niveles de FSH sialilada en comparación con células que expresan FSH únicamente.
- 40

Ejemplo 6 Visión general de la producción y purificación

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

Se preparó FSH a partir del clon α 2,3 (ejemplo 5) usando una modificación del método descrito por Lowry *et al.* (1976).

- 50 Para la producción de PER.C6®FSH, se adaptaron las líneas celulares a un medio libre de suero, es decir, Excell 525 (JRH Biosciences). En primer lugar, se cultivaron las células para formar una monocapa confluyente al 70%-90% en un frasco de cultivo T80. En el pase, se resuspendieron las células en el medio libre de suero, Excell 525 + L-glutamina 4 mM, hasta una densidad celular de $0,3 \times 10^6$ células/ml. Se puso una suspensión celular de 25 ml en un

frasco con agitación de 250 ml y se agitó a 100 rpm a 37°C al 5% de CO₂. Tras alcanzar una densidad celular de > 1x10⁶ células/ml, se subcultivaron las células hasta una densidad celular de 0,2 ó 0,3x10⁶ células/ml y se cultivaron adicionalmente en frascos con agitación a 37°C, el 5% de CO₂ y 100 rpm.

5 Para la producción de FSH, se transfirieron las células a un medio de producción libre de suero, es decir, VPRO (JRH Biosciences), que soporta el crecimiento de células PER.C6® hasta densidades celulares muy altas (habitualmente > 10⁷ células/ml en un cultivo discontinuo). En primer lugar, se cultivaron las células hasta > 1x10⁶ células/ml en Excell 525, luego se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm y posteriormente se suspendieron en medio VPRO + L-glutamina 6 mM hasta una densidad de 1x10⁶ células/ml. Entonces se cultivaron las células en un frasco con agitación durante 7-10 días a 37°C, el 5% de CO₂ y 100 rpm. Durante este periodo, las células crecieron hasta una densidad de > 10⁷ células/ml. Se recogió el medio de cultivo tras empezar a disminuir la viabilidad celular. Se centrifugaron las células durante 5 min a 1000 rpm y se usó el sobrenadante para la cuantificación y purificación de FSH. Se determinó la concentración de FSH usando ELISA (DRG EIA 1288).

15 Después de eso, se llevó a cabo la purificación de FSH usando una modificación del método descrito por Lowry *et al.* (1976). Se llevó a cabo la purificación usando cromatografía de carga selectiva para enriquecer las formas altamente sialiladas mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Durante todos los procedimientos cromatográficos, se confirmó el enriquecimiento de las formas sialiladas de FSH, según se reivindica en el presente documento, mediante RIA (DRG EIA 1288) y/o IEF.

Ejemplo 7 Cuantificación de cantidades relativas de ácido α 2,3 y α 2,6-siálico

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

25 Se liberaron N-glicanos de las muestras usando PNGasa F en condiciones desnaturalizantes y luego se marcaron con 2-aminobenzamida. Entonces se separaron las formas de glicano liberadas y se analizaron mediante una columna de intercambio aniónico débil (WAX) para la determinación de la distribución de carga. Se analizaron adicionalmente mediante una columna para WAX los glicanos marcados tratados con 2,3,6,8-sialidasa para la determinación del ácido siálico total y 2,3-sialidasa para la determinación de ácido 2,3-siálico.

Se calcularon los porcentajes relativos de los glicanos cargados a partir de las estructuras presentes en las reservas de glicanos no digeridos y digeridos y se muestran en la figura 4 (para 8 muestras). Se encontró que estos estaban en los intervalos del 50% - 70% (por ejemplo, aproximadamente el 60% o el 65%) para α 2,3-sialilación y del 28 al 50%, generalmente del 30 al 35% (por ejemplo, aproximadamente el 31% o el 35%), para α 2,6-sialilación.

Ejemplo 8 Cuantificación de cantidades relativas de estructuras de glicano mono, di, tri y tetra-sialiladas

30 Se midieron las cantidades en porcentaje relativas de estructuras mono, di, tri y tetra-sialiladas en glicanos extraídos de rFSH purificada (ejemplo 6) usando técnicas conocidas.

35 Se liberaron N-glicanos de las muestras usando PNGasa F en condiciones desnaturalizantes y luego se marcaron con 2-aminobenzamida. Se liberaron glicanos de las muestras usando PNGasa F en condiciones desnaturalizantes y luego se marcaron con 2-aminobenzamida. Entonces se separaron las formas de glicano liberadas y se analizaron mediante una columna de intercambio aniónico débil (WAX) para la determinación de la distribución de sialilación. Las cantidades relativas de estructuras neutras, mono-sialiladas, di-sialiladas, tri-sialiladas y tetra-sialiladas se muestran en la figura 5 (para las 8 muestras mostradas en la figura 4).

40 La rFSH incluye estructuras de glicano neutras, mono-sialiladas, di-sialiladas, tri-sialiladas y tetra-sialiladas con las siguientes cantidades relativas: el 5-6% de neutras; el 15-17% de mono-sialiladas; el 26-30% de di-sialiladas; el 30-32% de tri-sialiladas y el 17-23% de tetra-sialiladas.

Ejemplo 8a

Se midieron las cantidades en porcentaje relativas de ácido α 2,6-siálico en rFSH purificada extraída de nueve muestras de rFSH purificada (producida mediante los métodos del ejemplo 6) usando técnicas conocidas.

45 Se liberaron N-glicanos de las muestras usando PNGasa F en condiciones desnaturalizantes y entonces se marcaron con 2-aminobenzamida. Entonces se separaron las formas de glicano liberadas y se analizaron mediante una columna de intercambio aniónico débil (WAX) para la determinación de la distribución de carga. Se analizaron adicionalmente mediante una columna para WAX glicanos marcados tratados con 2,3,6,8-sialidasa para la determinación de ácido siálico total y 2,3-sialidasa para la determinación de ácido 2,3-siálico (véase el ejemplo 8). El análisis permite el cálculo de ácido α 2,6-siálico.

50 Se calcularon los porcentajes relativos de los glicanos cargados a partir de las estructuras presentes en las reservas de glicanos no digeridos y digeridos y se muestran en la siguiente tabla. Se encontró que estos estaban en los intervalos del 25 al 50%, generalmente del 30 al 35% para α 2,6-sialilación.

5 Se midieron las cantidades en porcentaje relativas de GlcNAc bisectriz, GalNAc y 1-fucosa-Lewis en glicanos extraídos de las nueve muestras de rFSH purificada (producida mediante los métodos del ejemplo 6) usando técnicas conocidas. Se liberaron N-glicanos de la glicoproteína usando PNGasa F y se marcaron con 2-aminobenzamida (2AB). Se realizó el análisis mediante análisis de HPLC bidimensional (2D) en combinación con degradación enzimática de los glicanos. Para la verificación, se analizaron los glicanos mediante MALDI-EM. Las cantidades relativas de ácido alfa 2,6-sialílico y los residuos terminales se muestran en la siguiente tabla, junto con los mismos para Gonal F (FSH recombinante derivada de células CHO) y Bravelle (FSH de orina humana).

Muestra	Ref. O	Ref. N	I-1	I-2	I-3	II	II	III-1	III-2	Pro-medio	Gonal F	Bravelle
	abundancia % de	abundancia % de	abundancia % de	abundancia % de	abundancia % de	abundancia % de	abundancia % de	abundancia % de	abundancia % de	abundancia % de	abundancia % de	abundancia % de
ácido 2,6-sialílico	27,7	34,9	26,2	30,1	31,1	28,3	30,4	35	33	30,7	0	55,4
1GalNAc	51	44,6	50,7	44,7	49	47,6	45,3	46,4	44,9	47,1	0	11,3
GalNAc bisectriz	10	12,4	10,2	8,9	8,7	11,8	11,4	10,6	13,9	10,9	55	14,
1-Fucosa-Lewis	21,1	16,7	23,3	16,1	20,3	18,1	17,9	18,7	19,0	19,0	3,1 ¹	2,2
2-Fucosa-Lewis	4	4,1	4,3	1,9	3,1	4,2	3,8	3,9	4,4	3,7	-	n.d. ²

¹ El valor de 3,1 es el total de 1/2 de fucosa-Lewis. ² No determinado

10 Puede observarse que la cantidad de GalNAc en la FSH de la invención varía entre aproximadamente el 44,9 y el 51%, promediando aproximadamente el 47,1%.

Puede observarse que la cantidad de GlcNAc bisectriz en la FSH de la invención varía entre el 8,7 y el 13,9%, promediando aproximadamente el 10,9%.

Puede observarse que la cantidad de 1-fucosa-Lewis en la FSH de la invención varía entre el 16,1 y el 23,3%, promediando aproximadamente el 19%.

15 Puede observarse que la cantidad de 2-fucosa-Lewis en la FSH de la invención varía entre el 1,9 y el 4,4%, promediando aproximadamente el 3,7%.

Ejemplo 9 – Un estudio de múltiples dosis que investiga la seguridad, tolerancia, farmacocinética, farmacodinamia e inmunogenicidad de FE 999049 en comparación con GONAL-F.

Población de estudio

20 Un total de 48 (24 en cada fármaco) mujeres sanas recibieron dosis diarias de 14,6 µg de FE 999049 (una composición según la invención, producida según el ejemplo 6) o 16,5 µg de Gonal-F durante siete días.

Resultados de seguridad

25 La administración de múltiples dosis de FE 999049 y GONAL-F fue segura y generalmente se toleró bien tal como se evaluó mediante los acontecimientos adversos (AA), signos vitales, ECG, mediciones de laboratorio clínico y exploración física. No se produjo ningún acontecimiento adverso grave o muerte durante el estudio.

Resultados farmacocinéticos

30 Tras la administración de FE 999049 y GONAL-F a lo largo de 7 días, los valores de concentración de FSH tal como se evaluaron inmediatamente antes de la siguiente inyección aumentaron y parecieron alcanzar un nivel de estado estacionario tras 6-7 días. Sin embargo, la exposición (AUC y Cmax) de FE 999049 fue un 60% mayor en comparación con Gonal-F.

Resultados farmacodinámicos

35 Todas las concentraciones de inhibina-B (véase la figura 6), estradiol y progesterona aumentaron después de la administración de FE 999049 y GONAL-F, sin embargo en mayor grado tras la administración de FE 999049 en comparación con GONAL-F. Tanto el número como la distribución de tamaño de los folículos mostraron una mayor respuesta a FE 999049 en comparación con GONAL-F.

El ejemplo 9 demuestra que FSH que tiene una cantidad específica (el 17-23%) de estructuras de glicano tetra-sialiladas y, por ejemplo, cantidades específicas de α2,3-sialilación y α2,6-sialilación es notablemente más potente

que los productos de FSH recombinante que están actualmente en el mercado.

Ejemplo 10 – Un estudio de múltiples dosis que investiga FE 999049 en comparación con GONAL-F.

Lo siguiente describe un ensayo aleatorizado, controlado, ciego para el evaluador, de grupos paralelos, multinacional y multicéntrico que evalúa la relación dosis-respuesta de FE 999049 en pacientes que se someten a estimulación ovárica controlada para fecundación *in vitro* (IVF) / inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La población de pacientes eran 265 pacientes sometidas a IVF con edades comprendidas entre 18 y 37 años, con IMC de 18,5 a 32,0 kg/m². Se diseñó el ensayo como un ensayo de dosis-respuesta con el número de ovocitos recuperados como criterio de valoración principal. Los criterios de valoración secundarios explorarán el impacto cualitativo y cuantitativo de diferentes dosis de FE 999049 con respecto al perfil endocrino, el desarrollo folicular, la fecundación de ovocitos, la calidad de los embriones y la eficacia del tratamiento (es decir, consumo de gonadotropina total y duración de la estimulación). Se diseñó el ensayo para evaluar la eficacia de FE 999049 para establecer un embarazo cuando se usa en estimulación ovárica controlada para ciclos de IVF/ICSI.

Se evaluaron los sujetos en el plazo de 3 meses antes de la aleatorización para determinar el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión, incluyendo una evaluación del nivel de hormona antimülleriana (AMH) para aumentar la homogeneidad de la población de ensayo en relación con la respuesta ovárica y minimizar el número de posibles pacientes con potencial de respuesta escaso y superalto frente a las dosis de FE 999049 y la dosis de GONAL-F usadas en el ensayo. Se midió la valoración del nivel de AMH usando el kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas AMH Gen-II (Beckman Coulter, Inc., Webster, Texas). Este ensayo puede detectar concentraciones de AMH mayores de 0,57 pmol/l con un límite de cuantificación mínimo de 1,1 pmol/l.

En el día 2-3 de su ciclo menstrual, se aleatorizaron los sujetos en un modo 1:1:1:1:1 con respecto al tratamiento con o bien 90 UI, 120 UI, 150 UI, 180 UI o 210 UI de FE 999049 o bien 150 UI de GONAL-F, y se inició la estimulación ovárica. Se estratificó la aleatorización según el nivel de AMH en la selección [5,0-14,9 pmol/l (bajo nivel de AMH) y de 15,0 a 44,9 pmol/l (alto nivel de AMH)].

Gonal-F es del tipo llenado en masa (FbM) a petición de la FDA; por tanto, es apropiada la referencia a una dosis en µg. La etiqueta de Gonal-F indica 600 UI/44 µg, lo que indica que 150 UI son 11 µg. Sin embargo, existe cierta variación y el certificado de lote para este ensayo indicó que 11,3 µg de Gonal-F eran equivalentes a 150 UI. Las dosis de FE999049 se presentan mediante el contenido de proteína (µg) en vez de por la actividad biológica. Por tanto, las dosis de FE999049 fueron de 5,2 µg (90 UI), 6,9 µg (120 UI), 8,6 µg (150 UI), 10,3 µg (180 UI) o 12,1 µg (210 UI).

La distribución de sujetos y dosis se expone de la siguiente manera (los datos son número de sujetos):

Tabla 1

	FE 999049					GONAL-F	Total
	5,2 µg	6,9 µg	8,6 µg	10,3 µg	12,1 µg	11,3 µg	
Seleccionados							334
Aleatorizados y expuestos	42	45	44	45	46	43	265
Estratos con alto nivel de AMH (15,0 – 44,9 pmol/l)	23	26	24	24	26	25	148 (56%)
Estratos con bajo nivel de AMH (5,0 – 14,9 pmol/l)	19	19	20	20	21	18	117 (44%)
Por protocolo	40	42	42	44	44	43	255

Se fija el nivel de dosis diaria de FE 999049 o GONAL-F en la totalidad del periodo de estimulación. Durante la estimulación, se monitorizan los sujetos en el día de estimulación 1, 4 y 6 y de aquí en adelante al menos cada dos días. Cuando se observan 3 folículos de ≥ 15 mm, se realizan visitas diariamente. Se tratan los sujetos con FE 999049 o GONAL-F durante un máximo de 16 días.

Para prevenir un aumento de LH prematuro, puede iniciarse el tratamiento con un antagonista de GnRH (acetato de ganirelix, ORGALUTRAN, MSD / Schering-Plough) en el día de estimulación 6 a una dosis diaria de 0,25 mg y continuarse en la totalidad del periodo de estimulación. Se realiza la inducción de la maduración folicular final en el

día en el que se observan ≥ 3 folículos con un diámetro ≥ 17 mm. Si hay < 25 folículos con un diámetro ≥ 12 mm, se administran 250 μg de hCG recombinante (coriogonadotropina alfa, OVITRELLE, Merck Serono / EMD Serono). Si hay 25-35 folículos con un diámetro ≥ 12 mm, se administran 0,2 mg de agonista de GnRH (acetato de triptorelina, DECAPEPTYL / GONAPEPTYL, Ferring Pharmaceuticals). En caso de respuesta ovárica excesiva, definida como > 35 folículos con un diámetro ≥ 12 mm, se cancela el tratamiento. En caso de escasa respuesta ovárica, definida como < 3 folículos con un diámetro ≥ 10 mm observados en el día de estimulación 10, podría cancelarse el ciclo.

La recuperación de ovocitos tiene lugar 36 h (± 2 h) tras la inducción de la maduración folicular final y se inseminan los ovocitos mediante IVF y/o ICSI. Se evalúan la fecundación y el desarrollo de embriones desde la recuperación de ovocitos hasta el día de la transferencia. Para sujetos que se sometieron a inducción de la maduración folicular final con hCG, se transfirió un blastocisto de la mejor calidad disponible en el día 5 tras la recuperación de ovocitos mientras que se congelan los blastocistos restantes. Para sujetos que se someten a inducción de la maduración folicular final con agonista de GnRH, no tuvo lugar una transferencia de embriones en el nuevo ciclo y en su lugar se congelan los blastocistos en el día 5. Se proporcionan óvulos vaginales de progesterona (LUTINUS, Ferring Pharmaceuticals) 100 mg 3 veces al día para el soporte de la fase lútea desde el día tras la recuperación de ovocitos hasta el día de la visita de embarazo clínico. Se realiza una prueba de βhCG 13-15 días tras la transferencia de embriones y se confirmará el embarazo clínico mediante ecografía transvaginal (TVU) 5-6 semanas tras la transferencia de embriones.

Resultados

En la siguiente tabla, se muestra el número de ovocitos recuperados (criterio de valoración principal).

Tabla 2

	FE 999049				GONAL-F	
	5,2 μg	6,9 μg	8,6 μg	10,3 μg	12,1 μg	11,3 (11) μg
Ovocitos recuperados						
Todos	5,2 (3,3)	7,9 (5,9)	9,2 (4,6)	10,6 (7,0)	12,2 (5,9)	10,4 (5,2)
Alto nivel de AMH	5,9 (3,9)	9,1 (6,4)	10,6 (4,8)	13,6 (7,8)	14,4 (5,8)	12,4 (5,4)
Bajo nivel de AMH	4,5 (2,2)	6,3 (4,9)	7,4 (3,8)	6,9 (3,6)	9,4 (4,9)	7,8 (3,4)

Los datos son la media (D.E.)

Se cumplió el objetivo primario: se estableció una relación dosis-respuesta significativa para FE 999049 con respecto al número de ovocitos recuperados. Se observó este hallazgo no sólo para la población de ensayo global, sino también para cada uno de los dos estratos de AMH usados en la aleatorización. Se demostró una relación dosis-respuesta significativa para FE 999049 para todos los parámetros farmacodinámicos objetivo clave, por ejemplo estradiol, inhibina B e inhibina A. A un nivel de dosis de microgramos similar, las respuestas farmacodinámicas con FE 999049 fueron mayores que con GONAL-F (no se muestran estos resultados). Las concentraciones de FSH en suero tras la exposición a FE 999049 fueron significativamente mayores que para GONAL-F. Los resultados confirman que el perfil PK de FE 999049 difiere del de GONAL-F. Las tasas de fecundación, el desarrollo de blastocistos y las tasas de embarazos en pacientes sometidas a IVF/ICSI tratadas con FE 999049 estuvieron dentro de las expectativas. No hubo problemas de seguridad con el uso de FE 999049. Se documentó una buena tolerancia local.

Análisis adicional

Los solicitantes han analizado además los datos para identificar la(s) dosis de FE 999049 que cumple(n) con los siguientes criterios con respecto al número de ovocitos recuperados:

- Ovocitos recuperados en el intervalo de 8-14
- Minimizan la proporción de pacientes con < 8 ovocitos
- Minimizan la proporción de pacientes con ≥ 20 ovocitos

Los solicitantes también investigaron el impacto del peso corporal. Si es relevante, se convierte la dosis en $\mu\text{g}/\text{kg}$ para un sujeto medio. Se evalúan este valor de $\mu\text{g}/\text{kg}$ y $\pm 0,01 \mu\text{g}/\text{kg}$ en un modelo con respecto a la distribución de ovocitos recuperados así como al perfil de seguridad, y se identifica la dosis óptima.

Estratos con bajo nivel de AMH

Tal como se observa en la tabla 2, la dosis de FE999049 que cumplió con el primer criterio (ovocitos recuperados en el intervalo de 8-14) fue de 12,1 µg (media de 9,4 ovocitos recuperados). La distribución de ovocitos se muestra en la tabla 3 a continuación.

5 Tabla 3

	FE 999049				GONAL-F	
	5,2 µg	6,9 µg	8,6 µg	10,3 µg	12,1 µg	11,3 (11) µg
Ovocitos recuperados						
< 4	32%	24%	15%	10%	10%	6%
4-7	63%	42%	45%	60%	20%	56%
8-14	5%	24%	35%	30%	60% ↔ 33%	
15-19	0%	5%	5%	0%	5%	6%
≥ 20	0%	5%	0%	0%	5%	0%

Los datos son el % de sujetos

Tal como se muestra mediante el recuadro y la flecha, una dosis de 12,1 µg de FE999049 proporciona la recuperación del número de ovocitos más deseable en el 60% de los sujetos en el grupo con bajo nivel de AMH. Esto es una mejora notable con respecto a Gonal-F (el número de ovocitos más deseable sólo en el 33% de los sujetos).

10

La tabla 4 a continuación muestra el análisis de signos de respuesta excesiva en los estratos con bajo nivel de AMH (los datos son el número de sujetos). Puede observarse que no hubo indicaciones de OHSS temprano de naturaleza moderada o intensa y no hubo incidencias que requirieran acción preventiva; no hay problemas asociados con la dosis de 12,1 µg de FE999049 en una paciente que tiene bajo nivel de AMH.

15 Tabla 4

	FE 999049				GONAL-F	
	5,2 µg	6,9 µg	8,6 µg	10,3 µg	12,1 µg	11,3 (11) µg
Todos los sujetos	19	19	20	20	21	18
OHSS temprano, mod./int.	0	0	0	0	0	0
Inducción con agonista de GnRH	0	0	0	0	0	0
Acción preventiva	0	0	0	0	0	0
≥ 15 ovocitos	0	2	1	0	2	1
Cualquiera de las anteriores	0	2	1	0	2	1

La figura 7 muestra el efecto del peso corporal sobre los ovocitos recuperados (para los estratos con bajo nivel de AMH), para las diversas dosis. Las flechas indican el número de ovocitos recuperados de sujetos de peso corporal entre 45 kg y 90 kg tratados a la dosis de 12,1 µg. Tal como puede observarse (recuadro de texto) la variación entre pacientes de peso corporal de 45 kg y las de 90 kg es menor de aproximadamente 0,5 ovocitos; en otras palabras, no se requiere una dosificación según el peso corporal en pacientes con bajo nivel de AMH cuando la dosis de FE999049 es de al menos 12 µg, porque no existe una variación significativa en los ovocitos recuperados con el peso corporal, a esta dosis.

20

Por tanto, los solicitantes han encontrado que una dosis, o dosis equivalente a, de 11 a 13 µg, por ejemplo de 12 µg, de FSH recombinante derivada de ser humano es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero <15 pmol/l, por ejemplo de 0,05-14,9 pmol/l por ejemplo de 5,0-14,9 pmol/l. La dosis proporciona una respuesta eficaz a la vez que se minimiza el riesgo de desarrollar OHSS.

5 Estratos con alto nivel de AMH

Tal como se observa en la tabla 2, tres dosis de FE999049 cumplieron con el primer criterio (ovocitos recuperados en el intervalo de 8-14): 6,9 µg (media de 9,1 ovocitos recuperados), 8,6 µg (media de 10,6 ovocitos recuperados) y 10,3 µg (media de 13,6 ovocitos recuperados).

10 La figura 8 muestra el efecto del peso corporal sobre los ovocitos recuperados (para los estratos con alto nivel de AMH), para las diversas dosis. Las flechas indican el número de ovocitos recuperados de sujetos de peso corporal entre 45 kg y 90 kg tratados a las dosis de 6,9 µg, 8,6 µg y 10,3 µg. Tal como puede observarse (recuadros de texto) la variación es significativa: para la dosis de 6,9 µg, se recuperarán 6 ovocitos adicionales de una paciente de 45 kg en comparación con una paciente de 90 kg; para la dosis de 8,6 µg, se recuperarán 4 ovocitos adicionales de una paciente de 45 kg en comparación con una paciente de 90 kg; y para la dosis de 10,1 µg, se recuperarán 2,5 ovocitos adicionales de una paciente de 45 kg en comparación con una paciente de 90 kg. En otras palabras, una dosificación según el peso corporal tiene un impacto en pacientes con alto nivel de AMH cuando la dosis de FE999049 es menor de 12 µg, porque existe una variación significativa en los ovocitos recuperados con el peso corporal, a estas dosis.

20 La tabla 5a a continuación muestra un desglose adicional de los ovocitos recuperados (de la tabla 2) según el nivel de AMH. Esto muestra las dosis que cumplieron con el primer criterio (ovocitos recuperados en el intervalo de 8-14) para cada subestrato de nivel de AMH (recuadros).

Tabla 5a

	FE 999049				
	5,2 µg	6,9 µg	8,6 µg	10,3 µg	12,1 µg
<i>Ovocitos recuperados</i>					
15-24 pmol/l	4,9 (3,8)	7,3 (3,6)	10,6 (5,1)	11,5 (6,7)	12,3 (5,9)
25-34 pmol/l	7,0 (1,8)	9,1 (6,8)	9,7 (6,7)	15,5 (6,4)	16,7 (4,9)
35-45 pmol/l	8,5 (9,2)	21,0 (1,4)	11,3 (2,6)	18,0 (12,2)	15,7 (6,5)

25 La tabla 5b a continuación muestra el análisis de pacientes en las que se canceló tratamiento debido a o bien respuesta excesiva o bien inducción con agonista, para estos subgrupos. Por ejemplo, se canceló el tratamiento a una paciente en el estrato de nivel de AMH de 25-34 pmol/l debido a respuesta excesiva tras la dosis de 10,3 µg y se canceló el tratamiento a una paciente en el estrato de nivel de AMH de 25-34 pmol/l debido a respuesta excesiva tras la dosis de 12,1 µg; se canceló el tratamiento a una paciente en el estrato de nivel de AMH de 35-45 pmol/l tras inducción con agonista tras la dosis de 10,3 µg; y se canceló el tratamiento a una paciente en el estrato de nivel de AMH de 35-45 pmol/l tras inducción con agonista tras la dosis de 6,9 µg.

30 Tabla 5b

	FE 999049				
	5,2 µg	6,9 µg	8,6 µg	10,3 µg	12,1 µg
OHSS***, cancelación debida a respuesta excesiva o inducción con agonista****					
15-24 pmol/l	0	0	0	0	0
25-34 pmol/l	0	0	0	1***	1***

35-45 pmol/l 0 1*** 0 1*** 0

Puede observarse por tanto que sería útil el ajuste a medida de la dosis según el peso corporal (figura 8) y el nivel de AMH en los estratos con alto nivel de AMH, para minimizar las cancelaciones y maximizar la recuperación de ovocitos.

5 Los solicitantes han encontrado que las siguientes dosis proporcionan una respuesta eficaz a la vez que se minimiza el riesgo de desarrollar OHSS (kg es kg de peso corporal de paciente).

Nivel de AMH en suero	Dosis	(Dosis máxima)
< 15 pmol/l	12 µg	(12 µg)
15-24 pmol/l	0,14-0,19 µg/kg, por ejemplo 0,15-0,16 µg/kg, preferiblemente 0,15 µg/kg	(12 µg)
25-34 pmol/l	0,11-0,14 µg/kg, por ejemplo 0,12-0,13 µg/kg, preferiblemente 0,13 µg/kg	(12 µg)
≥ 35 pmol/l	0,10-0,11 µg/kg, preferiblemente 0,11 µg/kg	(12 µg)

Las siguientes son apropiadas si no se desea una dosificación según el peso corporal.

Nivel de AMH en suero	Dosis	(Dosis máxima)
< 15 pmol/l	12 µg	(12 µg)
15-24 pmol/l	9,3-10 µg	(12 µg)
25-34 pmol/l	7,3-8 µg	(12 µg)
≥ 35 pmol/l	6,3-7 µg	(12 µg)

Las siguientes son apropiadas si se requieren menos categorías de nivel de AMH.

4 categorías de nivel de AMH		3 categorías de nivel de AMH		2 categorías de nivel de AMH		Una dosis	
AMH	Dosis	AMH	Dosis	AMH	Dosis	AMH	Dosis
< 15	12 µg	< 15	12 µg	< 15	12 µg	-	0,16 µg/kg
15-24	0,15-0,16 µg/kg	15-24	0,15-0,16 µg/kg	≥ 15	0,14 µg/kg		
25-34	0,12-0,13 µg/kg	≥ 25	0,12 µg/kg				
≥ 35	0,10-0,11 µg/kg						

Las siguientes son apropiadas si no se desea una dosificación según el peso corporal.

4 categorías de nivel de AMH		3 categorías de nivel de AMH		2 categorías de nivel de AMH		Una dosis	
AMH	Dosis	AMH	Dosis	AMH	Dosis	AMH	Dosis
< 15	12 µg	< 15	12 µg	< 15	12 µg	-	9,3 µg ó 10 µg
15-24	9,3-10 µg	15-24	9,3-10 µg	≥ 15	8,7 µg		
25-34	7,3-8 µg	≥ 25	7,3 µg				
≥ 35	6,3-7 µg						

10 Por tanto, los solicitantes han encontrado que una dosis, o dosis equivalente a, de 11 a 13 µg, por ejemplo de 12 µg, de FSH recombinante derivada de ser humano es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero <15 pmol/l, por ejemplo de 0,05-14,9 pmol/l por ejemplo de 5,0-14,9 pmol/l. La dosis proporciona una respuesta eficaz a la vez que se minimiza el riesgo de desarrollar OHSS.

15 Los solicitantes han encontrado que una dosis, o dosis equivalente a, de 5 a 12,5 µg, por ejemplo de 6 a 10,5 µg, de FSH recombinante derivada de ser humano es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero ≥15 pmol/l. La dosis proporciona una respuesta eficaz a la vez que se minimiza el riesgo de desarrollar OHSS.

Los solicitantes han encontrado que una dosis (por ejemplo, diaria), o dosis equivalente a, de 0,09 a 0,19 µg de FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de ≥15 pmol/l. Los solicitantes han

5 encontrado que una dosis (por ejemplo, diaria), o dosis equivalente a, de 0,14 a 0,19 µg de FSH recombinante derivada de ser humano (preferiblemente de 0,15 a 0,16 µg de FSH recombinante derivada de ser humano) por kg de peso corporal de la paciente es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 15 a 24,9 pmol/l. Los solicitantes han encontrado que una dosis (por ejemplo, diaria), o dosis equivalente a, de 0,11 a 0,14 µg de FSH recombinante derivada de ser humano (preferiblemente de 0,12 a 0,13 µg de FSH recombinante derivada de ser humano) por kg de peso corporal de la paciente es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 25 a 34,9 pmol/l. Los solicitantes han encontrado que una dosis (por ejemplo, diaria), o dosis equivalente a, de 0,10 a 0,11 µg de FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de ≥ 35 pmol/l. Estas dosis proporcionan una respuesta eficaz a la vez que se minimiza el riesgo de desarrollar OHSS.

10 Los solicitantes han encontrado que una dosis (por ejemplo, diaria), o dosis equivalente a, de 0,15 a 0,21 µg (por ejemplo, 0,16 µg) de FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de < 15 pmol/l, por ejemplo para el primer ciclo de estimulación con FSH recombinante derivada de ser humano. Sin embargo, no se requiere que se dosifique a las pacientes según el peso corporal a este nivel de AMH.

Ejemplo 10 A - Protocolo de COS individualizado (bajo nivel de AMH)

20 Las pacientes seleccionadas están a punto de someterse a COS para fecundación *in vitro* (IVF) / inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) mediante métodos conocidos en la técnica. El protocolo previo al tratamiento incluye evaluación/examen del nivel de AMH en suero de la paciente usando el kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas AMH Gen-II (Beckman Coulter, Inc., Webster, Texas). Este ensayo puede detectar concentraciones de AMH mayores de 0,57 pmol/l con un límite de cuantificación mínimo de 1,1 pmol/l. Puede medirse el nivel de AMH usando otros kits de ensayo (por ejemplo, disponibles de Roche).

25 El protocolo de COS avanza de la manera habitual aparte de la administración de la dosis inicial de FE 999049 según el nivel de AMH en la selección. A una paciente con un nivel de AMH de <14,9 pmol/l se le administraría una dosis diaria inicial de aproximadamente 12 µg de FE 999049, un producto de FSH recombinante derivada de ser humano fabricado según el método del ejemplo 6. Una paciente con un nivel de AMH de 15 a 24,9 pmol/l recibiría una dosis diaria inicial de 0,15 a 0,19 µg de la FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente. Una paciente con un nivel de AMH de 25 a 34,9 pmol/l recibiría una dosis diaria inicial de 0,11 a 0,13 µg de la FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente. Una paciente con un nivel de AMH de ≥ 35 pmol/l recibiría una dosis diaria inicial de 0,10 a 0,11 µg de la FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente.

Ejemplo 11 - Protocolos de COS individualizados.

Las dosis en este protocolo se prefieren menos que las del ejemplo 10A.

35 Las pacientes seleccionadas están a punto de someterse a COS para fecundación *in vitro* (IVF) / inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) mediante métodos conocidos en la técnica. El protocolo previo al tratamiento incluye evaluación/examen del nivel de AMH en suero de la paciente usando el kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas AMH Gen-II (Beckman Coulter, Inc., Webster, Texas). Este ensayo puede detectar concentraciones de AMH mayores de 0,57 pmol/l con un límite de cuantificación mínimo de 1,1 pmol/l.

40 El protocolo de COS avanza de la manera habitual aparte de la administración de la dosis inicial de FE 999049 según el nivel de AMH en la selección en línea con la siguiente tabla. Por tanto, a una paciente con un nivel de AMH de 5-14,8 pmol/l se le administraría 180 UI de FSH en forma de aproximadamente 8-11 µg de FE 999049, un producto de FSH recombinante derivada de ser humano fabricado según el método del ejemplo 6. A una paciente con un nivel de AMH de 30-44,9 pmol/l se le administraría 120 UI de FSH en forma de aproximadamente 4-7 µg de FE 999049, un producto de FSH recombinante derivada de ser humano fabricado según el método del ejemplo 6. Si el nivel de AMH no está disponible, a la paciente recombinante se le administraría 120-180 UI de FSH en forma de aproximadamente 6-11 µg de FE 999049, un producto de FSH recombinante derivada de ser humano fabricado según el método del ejemplo 6.

Nivel de AMH	Dosis inicial, FSH	Equivalente aprox. en µg
< 5 pmol/l	210 UI	10-15 µg
5-14,9 pmol/l	180 UI	8-11 µg
> 15-29,9 pmol/l	150 UI	6-9 µg
> 30-44,9 pmol/l	120 UI	4-7 µg
> 45 pmol/l	90 UI	2-5 µg
No disponible	120-180 UI	6-11 µg

Bibliografía

- 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.
- 5 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.
- 10 Bassett RM y Driebergen 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 alpha 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol*. 23(2), 153-165.
- 15 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 follicle stimulating hormone: glycopeptide analysis of isolates from two mammalian species. *Biochemistry*. 45(28), 8665-8673. Sin copia
- 20 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.
- 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
- 25 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, Nimitz 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.
- 30 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.
- 35 Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T. y Zettlmeissl, G. (1990). Complete cDNA sequence encoding human betagalactoside alpha-2,6-sialyltransferase. *G Nucleic Acids Res*. 18(3), 667
- 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.
- 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.
- 45 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.
- 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.
- 50

- 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.
- 5 Olivennes F, Howles CM, Borini A, Germond M, Trew G, Wikland M, Zegers-Hochschild F, Saunders H (2009) Individualizing FSH dose for assisted reproduction using a novel algorithm: the CONSORT study. *Reprod Biomed Online.* Febrero de 2009; 18(2):195-204.
- Pierce JG y Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function *Annu Rev Biochem.* 50, 465-495.
- 10 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.
- 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.
- 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), 372-84.
- 15 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.
- 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.
- 20 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
- 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.
- 25 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.
- 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 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.
- Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P y Timossi C (2001). Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res.* 32(6), 520-532.
- 45 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.

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.

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.

5 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.

10 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.

Zhang X, Lok SH y Kon OL (1998) Stable expression of human alpha-2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. *Biochim Biophys Acta.* 1425(3), 441-452.

15 Figuras 1, 2 y 3: Mapas de plásmido de los vectores de expresión pFSHalpha/beta, pST3 y pST6. CMV = promotor de citomegalovirus, BGHp(A) = secuencia de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina, fl ori = origen de replicación de fl, SV40 = promotor del virus del simio 40, Neo = marcador de resistencia a neomicina, Hyg = marcador de resistencia a higromicina, SV40 p(A) = secuencia de poliadenilación del virus del simio 40, FSH A = polipéptido de hormona estimulante del folículo alfa, FSH B = polipéptido de hormona estimulante del folículo beta, ST3GAL4 = α 2,3-sialiltransferasa, ST6GAL1 = α 2,6-sialiltransferasa, ColEI = origen de replicación de ColEI, Amp =
20 marcador de resistencia a ampicilina.

SEQ ID NO: 1

Polipéptido de hormona estimulante del folículo alfa

Número de registro AH007338

Secuencia de nucleótidos de FSH alfa

1 ATGGATTACT ACAGAAAATA TGCAGCTATC TTTCTGGTCA CATTGTCGGT GTTTCTGCAT
61 GTTCTCCATT CCGCTCCTGA TGTGCAGGAT TGCCAGAAAT GCACGCTACA GGAAAACCCA
121 TTCTTCTCCC AGCCGGGTGC CCCAATACTT CAGTGCATGG GCTGCTGCTT CTCTAGAGCA
181 TATCCCACTC CACTAAGGTC CAAGAAGACG ATGTTGGTCC AAAAGAACGT CACCTCAGAG
241 TCCACTTGCT GTGTAGCTAA ATCATATAAC AGGGTCACAG TAATGGGGGG TTTCAAAGTG
25 301 GAGAACCACA CGGCGTGCCA CTGCAGTACT TGTTATTATC ACAAATCTTA A

Secuencia de proteína de FSH alfa (SEQ ID NO: 5)

1 MDYYRKYAAI FLVTLVSVFLH VLHSPDVQD CPECTLQENP FFSQPGAPIL QCMGCCFSRA
61 YPTPLRSKKT MLVQKNVTSE STCCVAKSYN RVTVMGGFKV ENHTACHCST CYYHKS

SEQ ID NO: 2

Polipéptido de hormona estimulante del folículo beta

30 Número de registro NM_000510

Secuencia de nucleótidos de FSH beta

1 ATGAAGACAC TCCAGTTTTT CTCCTTTTTC TGTTGCTGGA AAGCAATCTG CTGCAATAGC
61 TGTGAGCTGA CCAACATCAC CATTGCAATA GAGAAAGAAG AATGTCGTTT CTGCATAAGC
121 ATCAACACCA CTTGGTGTGC TGGCTACTGC TACACCAGGG ATCTGGTGTA TAAGGACCCA
181 GCCAGGCCCA AAATCCAGAA AACATGTACC TTCAAGGAAC TGGTATATGA AACAGTGAGA
241 GTGCCCCGCT GTGCTCACCA TGCAGATTCC TTGTATACAT ACCCAGTGGC CACCCAGTGT
301 CACTGTGGCA AGTGTGACAG CGACAGCACT GATTGTACTG TGCGAGGCCT GGGGCCAGC
361 TACTGCTCCT TTGGTGAAAT GAAAGAATAA

ES 2 562 648 T3

Secuencia de proteína de FSH beta (SEQ ID NO: 6)

1 MKTLQ^oFFFLF CCWKAICNS CELTNIITIAI EKEECRFCIS INTTWCAGYC YTRDLVYKDP
61 ARPKI^oKTCT FKELVYETVR VPGCAHHADS LYTPVATQC HCGKCDSDST DCTVRGLGPS
121 YCSFGEMKE

SEQ ID NO: 3

Beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4

5 Número de registro L23767

Secuencia de nucleótidos de ST3GAL4

1 ATGTGTCC^oTG CAGGCTGGAA GCTCCTGGCC ATGTTGGCTC TGGTCCTGGT CGTCATGGTG
61 TGGTATTCCA TCTCCCGGGA AGACAGGTAC ATCGAGCTTT TTTATTTTCC CATCCCAGAG
121 AAGAAGGAGC CGTGCCTCCA GGGTGAGGCA GAGAGCAAGG CCTCTAAGCT CTTTGGCAAC
181 TACTCCCGGG ATCAGCCCAT CTTCCTGCGG CTTGAGGATT ATTTCTGGGT CAAGACGCCA
241 TCTGCTTACG AGCTGCCCTA TGGGACCAAG GGGAGTGAGG ATCTGCTCCT CCGGGTGCTA
301 GCCATCACCA GCTCCTCCAT CCCCAGAAGC ATCCAGAGCC TCAGGTGCCG CCGCTGTGTG
361 GTCGTGGGGA ACGGGCACCG GCTGCGGAAC AGCTCACTGG GAGATGCCAT CAACAAGTAC
421 GATGTGGTCA TCAGATTGAA CAATGCCCCA GTGGCTGGCT ATGAGGGTGA CGTGGGCTCC
481 AAGACCACCA TGCCTCTCTT CTACCTGAA TCTGCCCACT TCGACCCAA AGTAGAAAAC
541 AACCCAGACA CACTCCTCGT CCTGGTAGCT TTCAAGGCAA TGGACTTCCA CTGGATTGAG
601 ACCATCCTGA GTGATAAGAA GCGGGTGCGA AAGGGTTTCT GGAAACAGCC TCCCCTCATC
661 TGGGATGTCA ATCCTAAACA GATTCCGATT CTCAACCCCT TCTTCATGGA GATTGCAGCT
721 GACAAACTGC TGAGCCTGCC AATGCAACAG CCACGGAAGA TTAAGCAGAA GCCCACCACG
781 GGCCTGTTGG CCATCACGCT GGCCCTCCAC CTCTGTGACT TGGTGCACAT TGCCGGCTTT
841 GGCTACCCAG ACGCCTACAA CAAGAAGCAG ACCATTCACT ACTATGAGCA GATCACGCTC
901 AAGTCCATGG CGGGGTCAGG CCATAATGTC TCCCAAGAGG CCCTGGCCAT TAAGCGGATG
961 CTGGAGATGG GAGCTATCAA GAACCTCACG TCCTTCTGA

Secuencia de proteína de ST3GAL4 (SEQ ID NO: 7)

1 MCPAGW^oKLLA MLALVLVVMV WYSISREDRY IELFYFPIPE KKEPCLQGEA ESKASKLFGN
61 YSRDQPIFLR LEDYFWVKTP SAYELPYGTK GSEDL^oLLRVL AITSSSIPKN IQSLRCRRCV
121 VVGNHRLRN SSLGD^oAINKY DVVIRLNNAP VAGYEGDVGS KTTMRLFYPE SAHFDPKVEN
181 NPDTLLVLVA FKAMDFHWIE TILSDK^oKRVR KGF^oWKQPPLI WDVNPKQIRI LNPFFMEIAA
241 DKLLSLPMQQ PRKIKQKPTT GLLAITLALH LCDLVHIAGF GYPDAYNKKQ TIHYEQITL
301 KSMAGSGHNV SQEALAIKRM LEMGAIKNLT SF

10 SEQ ID NO: 4

Beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1

Número de registro NM_003032

Secuencia de nucleótidos de ST6GAL1

ES 2 562 648 T3

1 ATGATTCACA CCAACCTGAA GAAAAAGTTC AGCTGCTGCG TCCTGGTCTT TCTTCTGTTT
61 GCAGTCATCT GTGTGTGGAA GGAAAAGAAG AAAGGGAGTT ACTATGATTC CTTTAAATTG
121 CAAACCAAGG AATTCAGGT GTTAAAGAGT CTGGGGAAAT TGGCCATGGG GTCTGATTCC
181 CAGTCTGTAT CCTCAAGCAG CACCCAGGAC CCCCACAGGG 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 AGGTACACAGA TTTTCCCTTC
481 AATACCTCTG AATGGGAGGG TTATCTGCCC AAGGAGAGCA TTAGGACCAA GGCTGGGCCT
541 TGGGGCAGGT GTGCTGTTGT GTCGTCAGCG GGATCTCTGA AGTCCCTCCA ACTAGGCAGA
601 GAAATCGATG ATCATGACGC AGTCCTGAGG TTTAATGGGG CACCCACAGC CAACTTCCAA
661 CAAGATGTGG GCACAAAAAC TACCATTTCG CTGATGAACT CTCAGTTGGT TACCACAGAG
721 AAGCGCTTCC TCAAAGACAG TTTGTACAAT GAAGGAATCC TAATTGTATG GGACCCATCT
781 GTATACCACT CAGATATCCC AAAGTGGTAC CAGAATCCGG ATTATAATTT CTTTAAACAAC
841 TACAAGACTT ATCGTAAGCT GCACCCCAAT CAGCCCTTTT ACATCCTCAA GCCCCAGATG
901 CCTTGGGAGC TATGGGACAT TCTTCAAGAA ATCTCCCCAG 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-

Secuencia de proteína de ST6GAL1 (SEQ ID NO: 8)

1 MIHTNLKKKF SCCVLVFLLF AVICVWKEKK KGSYDSFKL QTKEFQVLKS LGKLAMGSDS
61 QSVSSSSTQD PHRGRQTLGS LRGLAKAKPE ASFQVWNKDS SSKNLIPRLQ KIWKNYLSMN
121 KYKVSYSKPGP PGIKFSAEAL RCHLRDHVNV SMVEVTDFFP NTSEWEGYLP KESIRTKAGP
181 WGRCAVVSSA GSLKSSQLGR EIDDHDAVLR FNGAPTANFQ QDVGTKTTIR LMNSQLVTTE
241 KRFLKDSLYN EGILIVWDPS VYHSDIPKWE QNPDYNFFNN YKTYRKLHPN QPFYILKPQM
301 PWELWDILQE ISPEEIQPNP PSSGMLGIII MMTLCDQVDI YEFLPSKRKT DVCYYYYQKFF
361 DSACTMGAYH PLYEKNLVK HLNQGTDEDI YLLGKATLPG FRTIHC

5 Lista de secuencias

<110> Ferring B.V.

<120> Composición para estimulación ovárica controlada

10 <130> P/66643.WO01

<150> Documento EP 11176803.2

<151> 08-08-2011

ES 2 562 648 T3

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

5 <211> 351

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctgggtca cattgtcggg gtttctgcat      60
gtttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca      120
ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattg gctgctgctt ctctagagca      180
tatcccactc cactaaggct caagaagacg atgttgggtcc aaaagaacgt cacctcagag      240
tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatggggggg tttcaaagtg      300
gagaaccaca cggcgtgcca ctgcagtact tgttattatc acaaacttta a                    351
```

10

<210> 2

<211> 390

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 2

```
atgaagacac tccagttttt cttccttttc tgttgctgga aagcaatctg ctgcaatagc      60
tgtgagctga ccaacatcac cattgcaata gagaaagaag aatgtcgttt ctgcataagc      120
atcaacacca cttggtgtgc tggctactgc tacaccaggg atctggtgta taaggacca      180
gccaggccca aaatccagaa aacatgtacc ttcaaggaac tggatatatga aacagtgaga      240
gtgcccggct gtgctcacca tgcagattcc ttgtatacat acccagtggc caccagtgt      300
cactgtggca agtgtgacag cgacagcact gattgtactg tgcgaggcct ggggcccagc      360
tactgctcct ttggtgaaat gaaagaataa                    390
```

<210> 3

<211> 999

20 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 562 648 T3

atgtgtcctg caggctggaa gtcctggcc atgttggtc tggtcctggt cgtcatggtg	60
tggattcca tctcccggga agacaggtac atcgagcttt tttattttcc catcccagag	120
aagaaggagc cgtgcctcca gggtaggca gagagcaagg cctctaagct ctttggcaac	180
tactcccggg atcagcccat cttcctgctg cttgaggatt atttctgggt caagacgcca	240
tctgcttacg agctgcccta tgggaccaag gggagtgagg atctgctcct ccgggtgcta	300
gccatcacca gtcctccat cccaagaac atccagagcc tcaggtgccg ccgctgtgtg	360
gtcgtgggga acgggcaccg gctgcggaac agctcactgg gagatgccat caacaagtac	420
gatgtggtca tcagattgaa caatgcccc a gtggctggct atgagggtga cgtgggctcc	480
aagaccacca tgcgtctctt ctaccctgaa tctgcccact tcgaccccaa agtagaaaac	540
aaccagaca cactcctcgt cctggtagct ttcaaggcaa tggacttcca ctggattgag	600
accatcctga gtgataagaa gcgggtgcga aagggtttct ggaaacagcc tcccctcatc	660
tgggatgtca atcctaaaca gattcggatt ctcaaccct tcttcatgga gattgcagct	720
gacaaactgc tgagcctgcc aatgcaacag ccacggaaga ttaagcagaa gccaccacg	780
ggcctgttgg ccatcacgct ggccctccac ctctgtgact tggtgacat tgccggcttt	840
ggctaccag acgcctacaa caagaagcag accattcact actatgagca gatcacgctc	900
aagtccatgg cggggtcagg ccataatgtc tccaagagg ccctggccat taagcggatg	960
ctggagatgg gagctatcaa gaacctcacg tccttctga	999

<210> 4

<211> 1221

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 562 648 T3

atgattcaca ccaacctgaa gaaaaagttc agctgctgcg tcctggtcct tcttctgttt 60
 gcagtcatct gtgtgtggaa ggaaaagaag aaagggagtt actatgattc ctttaaattg 120
 caaaccaagg aattccaggt gttaaagagt ctggggaaat tggccatggg gtctgattcc 180
 cagtctgtat cctcaagcag caccaggac cccacaggg gccgccagac cctcggcagt 240
 ctcagaggcc tagccaaggc caaacagag gcctccttcc aggtgtggaa caaggacagc 300
 tcttccaaaa accttatccc taggctgcaa aagatctgga agaattacct aagcatgaac 360
 aagtacaaag tgtcctacaa ggggccagga ccaggcatca agttcagtgc agaggccctg 420
 cgctgccacc tccgggacca tgtgaatgta tccatggtag aggtcacaga ttttccttc 480
 aatacctctg aatgggaggg ttatctgccc aaggagagca ttaggaccaa ggctgggcct 540
 tggggcaggt gtgctgttgt gtcgtcagcg ggatctctga agtcctcca actaggcaga 600
 gaaatcgatg atcatgacgc agtcctgagg tttaatgggg caccacagc caacttcaa 660
 caagatgtgg gcacaaaaac taccattcgc ctgatgaact ctcagttggt taccacagag 720
 aagcgcttcc tcaaagacag tttgtacaat gaaggaatcc taattgtatg ggacccatct 780
 gtataccact cagatatccc aaagtgttac cagaatccgg attataattt ctttaacaac 840
 tacaagactt atcgtaagct gcacccaat cagccctttt acatcctcaa gccccagatg 900
 ccttgggagc tatgggacat tcttcaagaa atctccccag aagagattca gccaaacccc 960
 ccacctctg ggatgcttgg tatcatcatc atgatgacgc tgtgtgacca ggtggatatt 1020
 tatgagttcc tcccatcaa gcgcaagact gacgtgtgct actactacca gaagttcttc 1080
 gatagtgcct gcacgatggg tgcctaccac ccgctgctct atgagaagaa tttggtgaag 1140
 catctcaacc agggcacaga tgaggacatc tacctgcttg gaaaagccac actgcctggc 1200
 ttccggacca ttcactgcta a 1221

<210> 5

<211> 116

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 562 648 T3

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
1 5 10 15

Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
20 25 30

Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
35 40 45

Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
50 55 60

Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
65 70 75 80

Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
85 90 95

Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
100 105 110

Tyr His Lys Ser
115

<210> 6

<211> 129

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile
1 5 10 15

ES 2 562 648 T3

Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys
20 25 30

Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
35 40 45

Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys
50 55 60

Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg
65 70 75 80

Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
85 90 95

Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
100 105 110

Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys
115 120 125

Glu

<210> 7

<211> 332

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

ES 2 562 648 T3

Met Cys Pro Ala Gly Trp Lys Leu Leu Ala Met Leu Ala Leu Val Leu
 1 5 10 15

Val Val Met Val Trp Tyr Ser Ile Ser Arg Glu Asp Arg Tyr Ile Glu
 20 25 30

Leu Phe Tyr Phe Pro Ile Pro Glu Lys Lys Glu Pro Cys Leu Gln Gly
 35 40 45

Glu Ala Glu Ser Lys Ala Ser Lys Leu Phe Gly Asn Tyr Ser Arg Asp
 50 55 60

Gln Pro Ile Phe Leu Arg Leu Glu Asp Tyr Phe Trp Val Lys Thr Pro
 65 70 75 80

Ser Ala Tyr Glu Leu Pro Tyr Gly Thr Lys Gly Ser Glu Asp Leu Leu
 85 90 95

Leu Arg Val Leu Ala Ile Thr Ser Ser Ser Ile Pro Lys Asn Ile Gln
 100 105 110

ES 2 562 648 T3

Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys Val Val Val Gly Asn Gly His Arg Leu
 115 120 125

Arg Asn Ser Ser Leu Gly Asp Ala Ile Asn Lys Tyr Asp Val Val Ile
 130 135 140

Arg Leu Asn Asn Ala Pro Val Ala Gly Tyr Glu Gly Asp Val Gly Ser
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Met Arg Leu Phe Tyr Pro Glu Ser Ala His Phe Asp Pro
 165 170 175

Lys Val Glu Asn Asn Pro Asp Thr Leu Leu Val Leu Val Ala Phe Lys
 180 185 190

Ala Met Asp Phe His Trp Ile Glu Thr Ile Leu Ser Asp Lys Lys Arg
 195 200 205

Val Arg Lys Gly Phe Trp Lys Gln Pro Pro Leu Ile Trp Asp Val Asn
 210 215 220

Pro Lys Gln Ile Arg Ile Leu Asn Pro Phe Phe Met Glu Ile Ala Ala
 225 230 235 240

Asp Lys Leu Leu Ser Leu Pro Met Gln Gln Pro Arg Lys Ile Lys Gln
 245 250 255

Lys Pro Thr Thr Gly Leu Leu Ala Ile Thr Leu Ala Leu His Leu Cys
 260 265 270

Asp Leu Val His Ile Ala Gly Phe Gly Tyr Pro Asp Ala Tyr Asn Lys
 275 280 285

Lys Gln Thr Ile His Tyr Tyr Glu Gln Ile Thr Leu Lys Ser Met Ala
 290 295 300

Gly Ser Gly His Asn Val Ser Gln Glu Ala Leu Ala Ile Lys Arg Met
 305 310 315 320

Leu Glu Met Gly Ala Ile Lys Asn Leu Thr Ser Phe
 325 330

<210> 8

<211> 406

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

ES 2 562 648 T3

<400> 8

Met Ile His Thr Asn Leu Lys Lys Lys Phe Ser Cys Cys Val Leu Val
 1 5 10 15

Phe Leu Leu Phe Ala Val Ile Cys Val Trp Lys Glu Lys Lys Lys Gly
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Lys Leu Gln Thr Lys Glu Phe Gln Val Leu
 35 40 45

Lys Ser Leu Gly Lys Leu Ala Met Gly Ser Asp Ser Gln Ser Val Ser
 50 55 60

Ser Ser Ser Thr Gln Asp Pro His Arg Gly Arg Gln Thr Leu Gly Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Gly Leu Ala Lys Ala Lys Pro Glu Ala Ser Phe Gln Val Trp
 85 90 95

Asn Lys Asp Ser Ser Ser Lys Asn Leu Ile Pro Arg Leu Gln Lys Ile
 100 105 110

Trp Lys Asn Tyr Leu Ser Met Asn Lys Tyr Lys Val Ser Tyr Lys Gly
 115 120 125

Pro Gly Pro Gly Ile Lys Phe Ser Ala Glu Ala Leu Arg Cys His Leu
 130 135 140

Arg Asp His Val Asn Val Ser Met Val Glu Val Thr Asp Phe Pro Phe
 145 150 155 160

Asn Thr Ser Glu Trp Glu Gly Tyr Leu Pro Lys Glu Ser Ile Arg Thr
 165 170 175

Lys Ala Gly Pro Trp Gly Arg Cys Ala Val Val Ser Ser Ala Gly Ser
 180 185 190

Leu Lys Ser Ser Gln Leu Gly Arg Glu Ile Asp Asp His Asp Ala Val
 195 200 205

Leu Arg Phe Asn Gly Ala Pro Thr Ala Asn Phe Gln Gln Asp Val Gly
 210 215 220

Thr Lys Thr Thr Ile Arg Leu Met Asn Ser Gln Leu Val Thr Thr Glu
 225 230 235 240

Lys Arg Phe Leu Lys Asp Ser Leu Tyr Asn Glu Gly Ile Leu Ile Val
 245 250 255

Trp Asp Pro Ser Val Tyr His Ser Asp Ile Pro Lys Trp Tyr Gln Asn

ES 2 562 648 T3

260	265	270																		
Pro	Asp	Tyr	Asn	Phe	Phe	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Tyr	Arg	Lys	Leu	His					
		275					280					285								
Pro	Asn	Gln	Pro	Phe	Tyr	Ile	Leu	Lys	Pro	Gln	Met	Pro	Trp	Glu	Leu					
	290					295					300									
Trp	Asp	Ile	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Gln	Pro	Asn	Pro					
305					310					315					320					
Pro	Ser	Ser	Gly	Met	Leu	Gly	Ile	Ile	Ile	Met	Met	Thr	Leu	Cys	Asp					
				325					330					335						
Gln	Val	Asp	Ile	Tyr	Glu	Phe	Leu	Pro	Ser	Lys	Arg	Lys	Thr	Asp	Val					
			340					345					350							
Cys	Tyr	Tyr	Tyr	Gln	Lys	Phe	Phe	Asp	Ser	Ala	Cys	Thr	Met	Gly	Ala					
		355					360					365								
Tyr	His	Pro	Leu	Leu	Tyr	Glu	Lys	Asn	Leu	Val	Lys	His	Leu	Asn	Gln					
	370					375					380									
Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Ile	Tyr	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Pro	Gly					
385					390					395					400					
Phe	Arg	Thr	Ile	His	Cys															
				405																

<210> 9

<211> 39

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR FSHa-fw

10 <400> 9

ccaggatccg ccaccatgga ttactacaga aaaatatgc 39

<210> 10

<211> 31

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR FSHa-rev

5

<400> 10

ggatggctag ctaagattt gtgataataa c 31

<210> 11

10

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Cebador de PCR FSHb-fw

<400> 11

ccaggcgcgc caccatgaag acactccagt ttctc 35

20

<210> 12

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador de PCR FSHb-rev

<400> 12

ccgggtaac ttattattct tcatttcac caaagg 36

30

<210> 13

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador de PCR 2,3STfw

ES 2 562 648 T3

<400> 13

ccaggatccg ccaccatgtg tcctgcaggc tggaagc 37

5 <210> 14

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador de PCR 2,3STrev

<400> 14

ttttttctt aagtcagaag gacgtgaggt tcttg 35

15

<210> 15

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador de PCR 2,6STfw

<400> 15

25 ccaggatccg ccaccatgat tcacaccaac ctgaag 36

<210> 16

<211> 32

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR 2,6STrev

35 <400> 16

ttttttctt aagttagcag tgaatgtcc gg 32

REIVINDICACIONES

1. Producto que comprende hormona estimulante del folículo (FSH) para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de <15 pmol/l, en el que el producto va a administrarse a una dosis, o equivalente a, de 11 a 13 μg de FSH recombinante derivada de ser humano al día, incluyendo la FSH recombinante $\alpha 2,3$ - y $\alpha 2,6$ -sialilación, en el que del 1% al 50% de la sialilación total es $\alpha 2,6$ -sialilación, y del 50% al 99% de la sialilación total es $\alpha 2,3$ -sialilación; y en el que el tratamiento de la esterilidad comprende una etapa de determinación del nivel de AMH en suero de la paciente, y una etapa de administración de la dosis a una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de <15 pmol/l.
5
2. Producto para su uso según la reivindicación 1, en el que el producto va a administrarse a una dosis de, o equivalente a, 12 μg de FSH recombinante al día.
10
3. Producto que comprende hormona estimulante del folículo (FSH) para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de ≥ 15 pmol/l, en el que el producto va a administrarse a una dosis, o equivalente a, de 0,09 a 0,19 μg de FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente al día, incluyendo la FSH recombinante $\alpha 2,3$ - y $\alpha 2,6$ -sialilación, en el que del 1% al 50% de la sialilación total es $\alpha 2,6$ -sialilación, y del 50% al 99% de la sialilación total es $\alpha 2,3$ -sialilación; y en el que el tratamiento de la esterilidad comprende una etapa de determinación del nivel de AMH en suero de la paciente, y una etapa de administración de la dosis a una paciente que tiene el nivel de AMH en suero definido.
15
4. Producto para su uso según la reivindicación 3, en el tratamiento de una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 15 a 24,9 pmol/l, en el que el producto va a administrarse a una dosis, o equivalente a, de 0,14 a 0,19 μg de FSH recombinante por kg de peso corporal de la paciente al día.
20
5. Producto para su uso según la reivindicación 3, en el tratamiento de una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 25 a 34,9 pmol/l, en el que el producto va a administrarse a una dosis, o equivalente a, de 0,11 a 0,14 μg de FSH recombinante por kg de peso corporal de la paciente al día.
25
6. Producto para su uso según la reivindicación 3, en el tratamiento de una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de ≥ 35 pmol/l, en el que el producto va a administrarse a una dosis, o dosis equivalente a, de 0,10 a 0,11 μg de FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente al día.
30
7. Producto según cualquier reivindicación anterior, en el que la FSH incluye estructuras de glicano mono-, di-, tri- y tetra-sialiladas, en el que el 15-24%, por ejemplo el 17-23% de las estructuras de glicano sialiladas son estructuras de glicano tetrasialiladas.
30
8. Producto que comprende hormona estimulante del folículo (FSH) para su uso en el tratamiento de la esterilidad según cualquier reivindicación anterior, en el que el producto comprende además una sal que comprende un catión de metal alcalino farmacéuticamente aceptable seleccionada del grupo que consiste en sales de Na^+ o K^+ , o una combinación de las mismas.
35

Fig.1: Vector de expresión de FSH

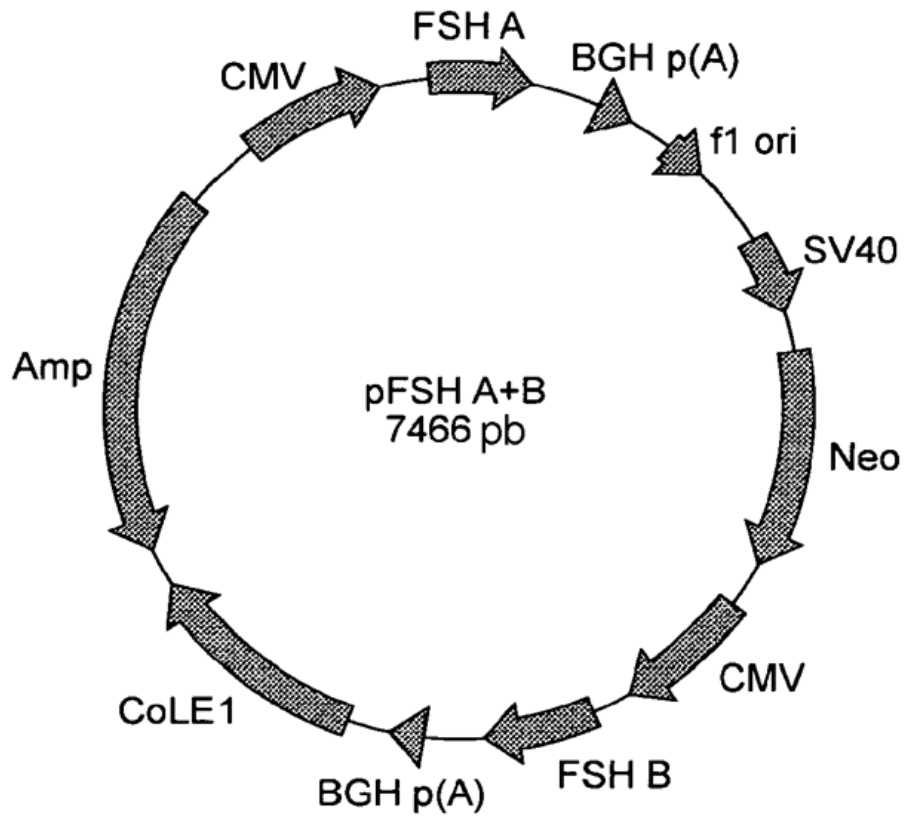


FIG. 1

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

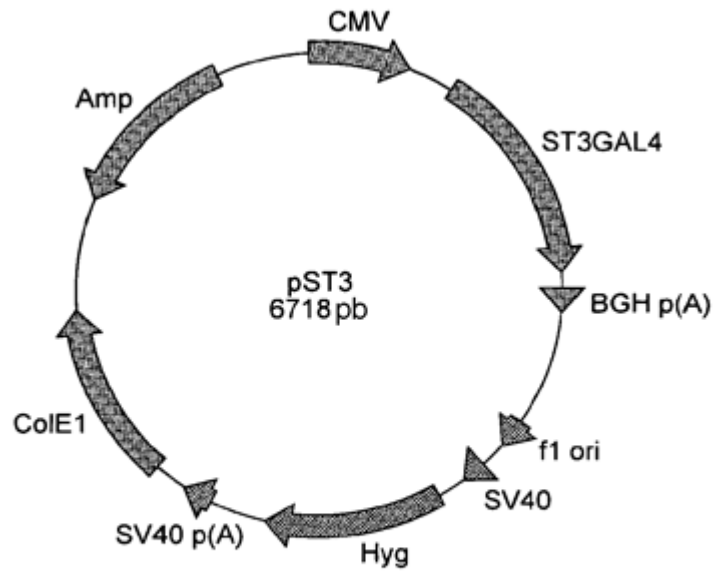


FIG. 2

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

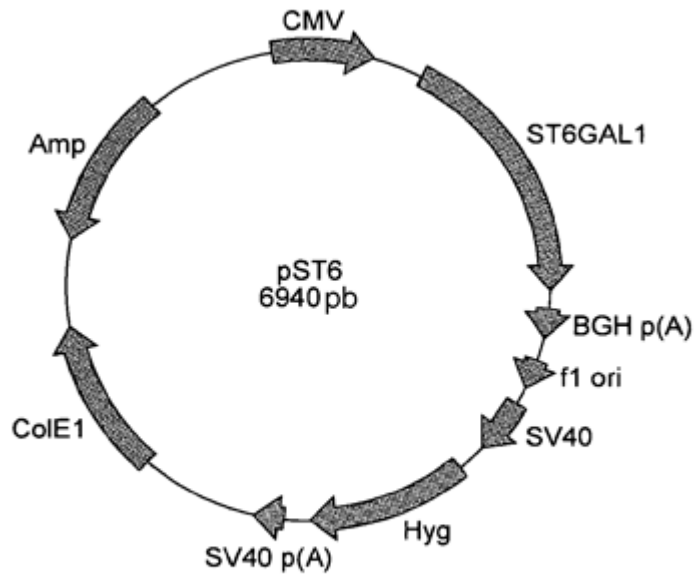


FIG. 3

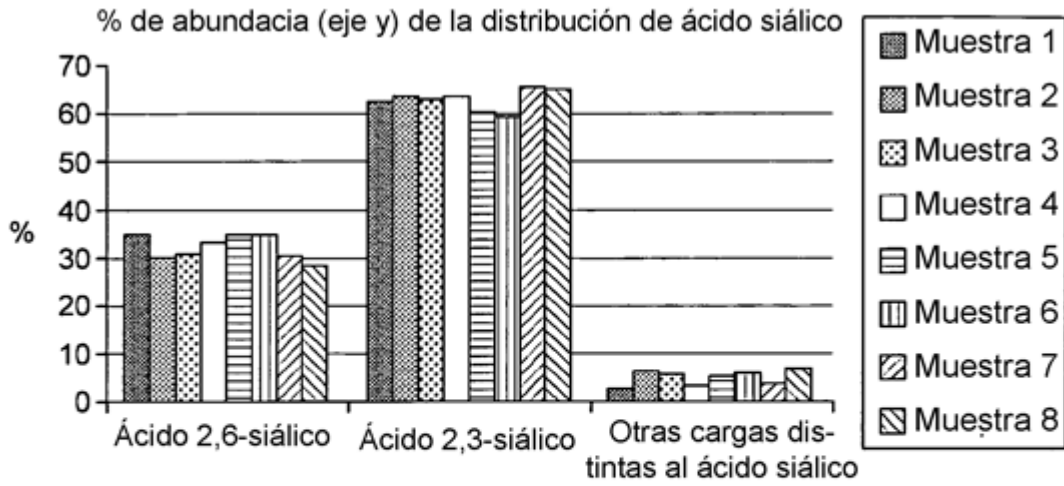


FIG. 4

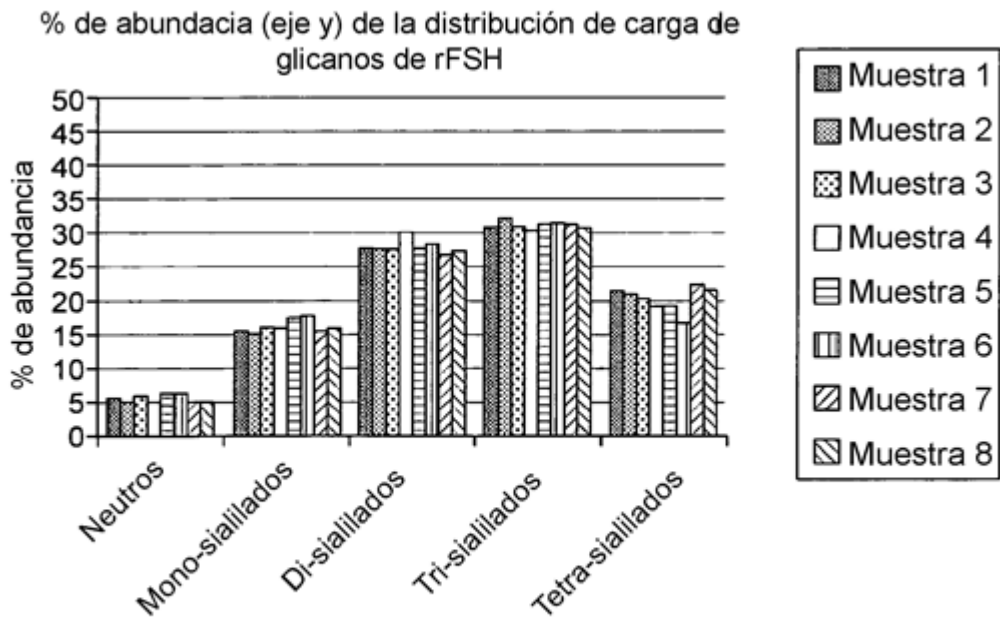


FIG. 5

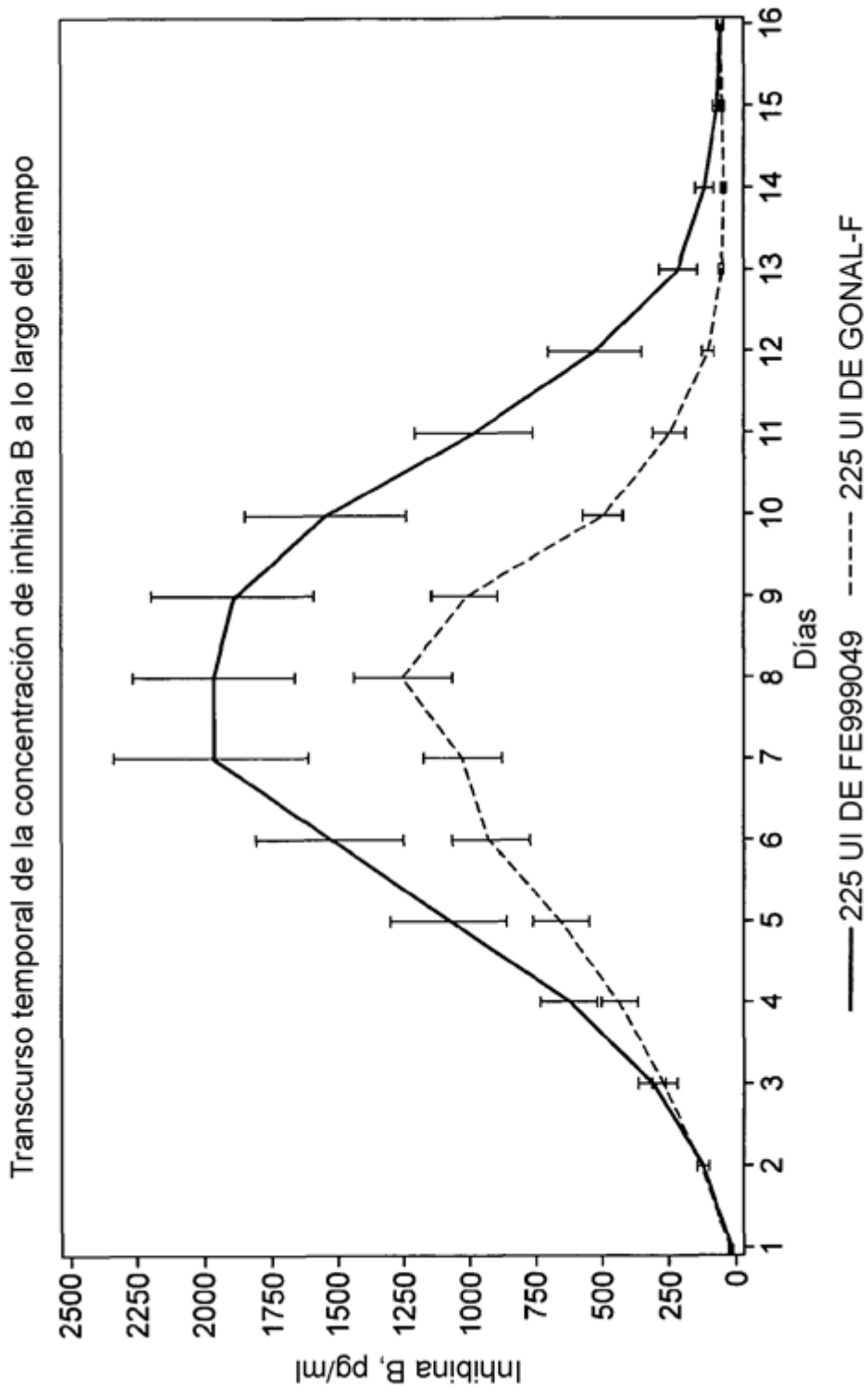


FIG. 6

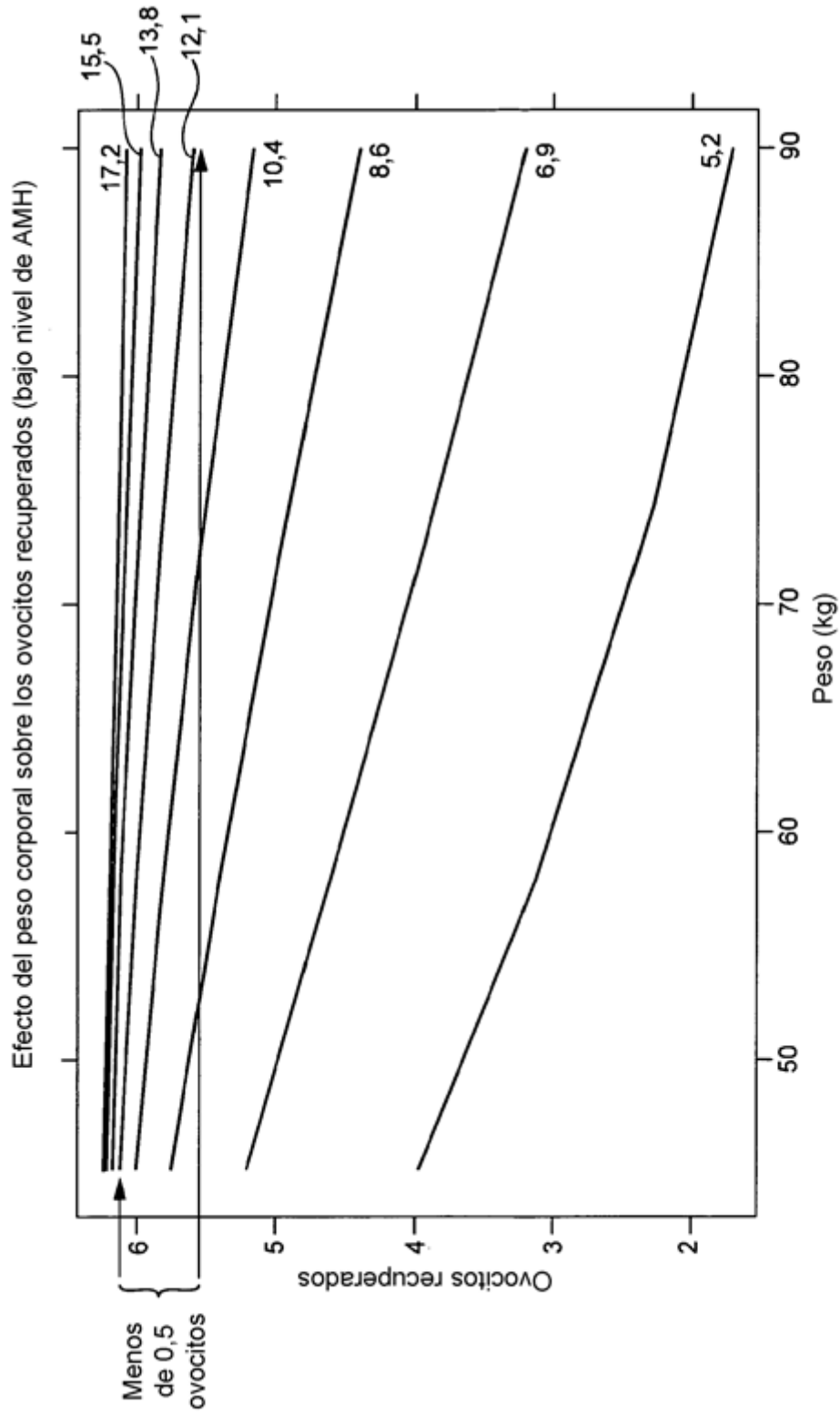


FIG. 7

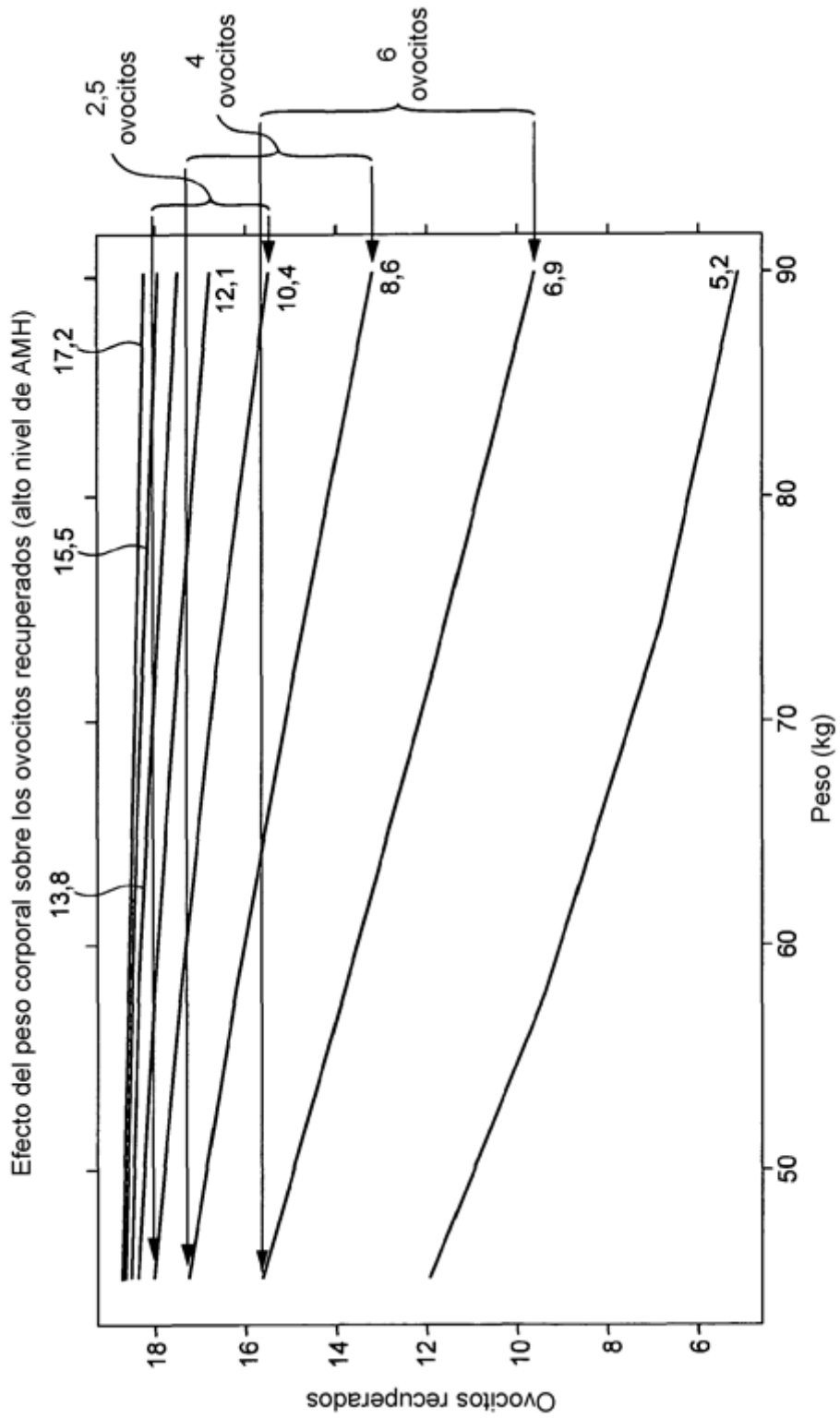


FIG. 8