

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 277**

51 Int. Cl.:

C07K 14/59 (2006.01)

A61K 38/24 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 14178729 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2808340**

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

30 Prioridad:

16.04.2008 US 45424 P
25.04.2008 EP 08251528

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 610 277 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

- 5 La presente invención se refiere a gonadotropinas para su uso en el tratamiento de la infertilidad. En particular se refiere a la hormona estimulante del folículo (FSH por sus siglas en inglés).

10 Las gonadotropinas son un grupo de hormonas glucoproteínas heterodiméricas que regulan la función gonadal en el macho y la hembra. Incluyen la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (CG).

15 FSH se segrega de forma natural por la hipófisis anterior y funciona para apoyar el desarrollo folicular y la ovulación. FSH comprende una subunidad alfa de 92 aminoácidos, también común a las otras hormonas glucoproteínas LH y CG, y una subunidad beta de 111 aminoácidos exclusiva de FSH que confiere la especificidad biológica de la hormona (Pierce y Parsons, 1981). Cada subunidad se modifica postraduccionalmente mediante la adición de restos de carbohidratos complejos. Ambas subunidad portan 2 sitios para unión de glucano unido en N, la subunidad alfa en los aminoácidos 52 y 78 y la subunidad beta en los restos de aminoácidos 7 y 24 (Rathnam y Saxena, 1975, Saxena y Rathnam, 1976). Por tanto, FSH está glucosilada hasta alrededor del 30 % en masa (Dias y Van Roey, 2001. Fox *et al.* 2001).

20 Se ha usado FSH purificada de orina humana posmenopáusica durante muchos años en el tratamiento de la infertilidad; tanto para fomentar la ovulación en la reproducción natural como para proporcionar ovocitos para tecnologías de reproducción asistida. A mediados de la década de 1990 estuvieron disponibles dos versiones recombinantes de FSH, Gonal-F (Serono) y Puregon (Organon). Éstas se expresan ambas en células de ovario de hámster chino (CHO) (Howles, 1996).

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

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

45 La glucosilación de productos de FSH recombinante refleja la gama de glucosiltransferasas presentes en la línea celular anfitriona. Los productos de rFSH existentes proceden de células de ovario de hámster chino (células CHO) manipuladas. La gama de modificaciones de glucano en rFSH procedente de CHO es más limitada que las encontradas en los productos naturales, procedentes bien de extractos hipofisarios o bien de orina. Los ejemplos de la reducida heterogeneidad de glucanos encontrada en rFSH procedente de CHO incluyen una falta de glucosamina bisectante y un contenido reducido de fucosilación del núcleo y extensiones de acetil-lactosamina (Hard *et al.*, 1990). Además, las células CHO solo son capaces de añadir ácido siálico usando el enlace $\alpha 2,3$ (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). Éste es diferente de la FSH producida de forma natural que contiene glucanos con una mezcla de ácido siálico unido en $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$.

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

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

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

5 Se ha documentado el tiempo de vida circulatoria de la FSH para materiales de una variedad de fuentes. Algunos de
 10 estos materiales se han fraccionado basándose en la carga molecular total, caracterizados por su pl, en los que más
 ácido equivale a mayor carga negativa. Como se ha afirmado previamente, el principal contribuyente a la carga
 molecular global es el contenido total en ácido siálico de cada molécula de FSH. Por ejemplo, rFSH (Organon) tiene un
 contenido de ácido siálico de alrededor de 8 mol/mol, mientras que la FSH procedente de orina tiene un contenido de
 15 ácido siálico mayor (de Leeuw *et al.*, 1996). Las velocidades de eliminación plasmática correspondientes en rata son
 0,34 y 0,14 ml/min (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2003). En otro ejemplo donde una muestra de FSH recombinante se separó en
 fracciones de alto y bajo pl, la potencia *in vivo* de la fracción de pl alto (menor contenido en ácido siálico) disminuyó y
 tuvo una semivida plasmática más corta (D'Antonio *et al.*, 1999). También se ha publicado que la FSH más básica
 20 circulante durante los últimos estadios del ciclo de ovulación se debe a la regulación negativa de la $\alpha 2,3$
 sialiltransferasa en la hipófisis anterior que se produce por el aumento de los niveles de estradiol (Damian-Matsumara
et al. 1999. Ulloa-Aguirre *et al.* 2001). No se han publicado resultados para la $\alpha 2,6$ sialiltransferasa.

El contenido total en ácido siálico de la FSH y rFSH no es directamente comparable ya que los ácidos siálicos se unen
 comúnmente de dos maneras. La FSH hipofisaria/sérica/urinaria contiene ácido siálico unido tanto en $\alpha 2,3$ como en
 20 $\alpha 2,6$, con una predominancia del primero. Sin embargo los recombinantes procedentes de células CHO solo contienen
 $\alpha 2,3$ (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). Esta es otra diferencia entre los productos
 naturales y recombinantes actuales, además del menor contenido total en ácido siálico de los últimos.

Las células CHO se usan comúnmente para la producción de proteínas recombinantes humanas farmacéuticas. Un
 análisis estructural ha identificado que el ácido siálico está unido exclusivamente por un enlace $\alpha 2,3$ (Kagawa *et al.*,
 25 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). Muchas glucoproteínas humanas contienen una mezcla de enlaces
 tanto $\alpha 2,3$ como $\alpha 2,6$. Por tanto, las proteínas recombinantes expresadas usando el sistema de CHO se diferenciarán
 de sus homólogas naturales en su tipo de enlaces de ácido siálico terminal. Ésta es una consideración importante en la
 producción de productos biológicos para uso farmacéutico ya que las fracciones de carbohidrato pueden contribuir a
 30 los atributos farmacológicos de la molécula.

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

35 Según la presente invención se proporciona FSH recombinante ("rFSH" o "recFSH") que incluye sialilación en $\alpha 2,3$ y
 sialilación en $\alpha 2,6$ en donde el 60% o más de la sialilación total es sialilación en $\alpha 2,3$ y en la que del 5 al 40% de
 la sialilación total es sialilación en $\alpha 2,6$. La rFSH (o preparación de rFSH) de la invención puede tener un 5% o menos de
 la sialilación total que es sialilación en $\alpha 2,8$, por ejemplo, del 0,1-4% de la sialilación total puede ser sialilación en $\alpha 2,8$.

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

Se hizo FSH recombinante con una mezcla de ácido siálico unido tanto en $\alpha 2,3$ como $\alpha 2,6$ modificando por ingeniería
 una línea celular humana para que exprese tanto rFSH como $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa (ejemplo 4 y 5). El producto
 60 expresado es muy ácido y porta una mezcla de ácidos siálicos unidos tanto en $\alpha 2,3$ como $\alpha 2,6$; el último proporcionado
 por la actividad sialiltransferasa endógena (figura 6). Esto tiene dos ventajas sobre la rFSH expresada en células CHO
 convencionales: Primero, el material está más altamente sialilado debido a las actividades combinadas de las dos
 sialiltransferasas; y en segundo lugar, el material se parece más estrechamente a la FSH natural. Es probable que esto
 65 sea probable que sea biológicamente más apropiado comparado con los productos recombinantes procedentes de
 células CHO que producen solo ácido siálico unido en $\alpha 2,3$ (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*,
 1990) y tienen contenido disminuido en ácido siálico (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995, Andersen *et al.*, 2004).

- Los solicitantes han encontrado sorprendentemente que la rFSH de la invención puede replicar o mimetizar más estrechamente el perfil fisicoquímico y farmacocinético del producto urinario humano natural que otros productos recombinantes. En otras palabras, la rFSH de la invención puede ser más cercana a la FSH "natural". Esto puede tener ventajas significativas respecto a la dosificación, etc. Además, un producto más "natural" o más "humano" puede ser
- 5 más deseable para el paciente, que puede desear que la terapia, aunque en un sentido artificial, sea tan "natural" como sea posible. Puede haber otras ventajas (por ejemplo, ventajas farmacocinéticas) en un producto recombinante que tiene estructura de carbohidrato (por ejemplo, glucano) que es más cercana a la FSH natural (por ejemplo, urinaria humana) que otros productos recombinantes.
- 10 Por tanto, la invención es una versión recombinante de FSH que porta una mezcla de ácido siálico en α 2,3 y α 2,6 y por tanto se parece más estrechamente a la FSH natural. Se espera que el uso de este compuesto para la estimulación ovárica controlada, en técnicas de FIV, y la inducción de la ovulación resulte en una estimulación más natural del ovario en comparación con productos recombinantes existentes.
- 15 Según la presente invención se proporciona FSH recombinante ("rFSH" o "recFSH") que incluye sialilación en α 2,3 y α 2,6 en la que el 80 % o más de la sialilación total es sialilación en α 2,3 y del 5 al 20% de la sialilación total es sialilación en α 2,6. La rFSH o preparación de rFSH pueden opcionalmente incluir además sialilación en α 2,8.
- 20 En realizaciones de la invención, la rFSH puede estar presente como una única isoforma o como una mezcla de isoformas.
- La rFSH según la invención puede tener un contenido en ácido siálico [expresado en cuanto a una proporción de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína] de 6 mol/mol o mayor.
- 25 La rFSH según la invención tiene el 80 % o más de la sialilación total que es sialilación en α 2,3. Por ejemplo, el 90 % o más de la sialilación total puede ser sialilación en α 2,3.
- La rFSH de la invención tiene del 5 al 20% de la sialilación total que es sialilación en α 2,6. La rFSH de la invención puede tener el 5 % o menos de la sialilación total que es sialilación en α 2,8. Por ejemplo el 2,5% o menos de la sialilación total puede ser sialilación en α 2,8. La rFSH (o preparación de rFSH) puede incluir sialilación en α 2,8 en una cantidad que es del 0,1 al 4% de la sialilación total, por ejemplo del 0,5 al 3% de la sialilación total, por ejemplo, desde el 0,5 al 2,5% de la sialilación total. Mediante sialilación se quiere decir la cantidad de restos siálicos presentes en las estructuras de carbohidrato de la FSH. La sialilación en α 2,3 significa sialilación en la posición 2,3 (como se sabe bien en la técnica) y sialilación en α 2,6, en la posición 2,6 (como se sabe bien en la técnica). Por tanto, el "% de la sialilación total puede ser sialilación en α 2,3" se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,3. La expresión "% de sialilación total que es sialilación en α 2,6" se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,6.
- 30 La rFSH de la invención tiene del 5 al 20% de la sialilación total que es sialilación en α 2,6. La rFSH de la invención puede tener el 5 % o menos de la sialilación total que es sialilación en α 2,8. Por ejemplo el 2,5% o menos de la sialilación total puede ser sialilación en α 2,8. La rFSH (o preparación de rFSH) puede incluir sialilación en α 2,8 en una cantidad que es del 0,1 al 4% de la sialilación total, por ejemplo del 0,5 al 3% de la sialilación total, por ejemplo, desde el 0,5 al 2,5% de la sialilación total. Mediante sialilación se quiere decir la cantidad de restos siálicos presentes en las estructuras de carbohidrato de la FSH. La sialilación en α 2,3 significa sialilación en la posición 2,3 (como se sabe bien en la técnica) y sialilación en α 2,6, en la posición 2,6 (como se sabe bien en la técnica). Por tanto, el "% de la sialilación total puede ser sialilación en α 2,3" se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,3. La expresión "% de sialilación total que es sialilación en α 2,6" se refiere al % del número total de residuos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,6.
- 35 La FSH recombinante expresada en células de ovario de hámster chino (CHO) incluye exclusivamente sialilación en α 2,3 (Kagawa *et al*, 1988, Takeuchi *et al*, 1988, Svensson *et al*, 1990).
- 40 La rFSH de la invención se puede producir o expresar en una línea celular humana. Esto puede simplificar (y hacer más eficaz) el método de producción porque la manipulación y control de, por ejemplo, el medio de crecimiento celular para mantener la sialilación puede ser menos crítico que con procesos conocidos. El método también puede ser más eficaz porque hay poca rFSH básica producida con respecto la producción de productos de rFSH conocidos; se produce rFSH más ácida y la separación/eliminación de FSH básica es menos problemática. La rFSH se puede producir o expresar en una línea celular Per.C6, una línea celular procedente de Per.C6 o una línea celular Per.C6 modificada. La línea celular se puede modificar usando α 2,3-sialiltransferasa. La línea celular se puede modificar usando α 2,6-sialiltransferasa. Como alternativa o adicionalmente, la rFSH puede incluir ácidos siálicos unidos en α 2,6 (sialilación en α 2,6) proporcionados por la actividad sialiltransferasa endógena [de la línea celular].
- 45 La rFSH se puede producir usando α 2,3- y/o α 2,6-sialiltransferasa. La rFSH se puede producir usando α 2,3-sialiltransferasa. La rFSH puede incluir ácidos siálicos unidos en α 2,6 (sialilación en α 2,6) proporcionados por la actividad sialiltransferasa endógena.
- 50 Según la presente invención en un aspecto adicional se proporciona un método de producción de rFSH y/o preparación de rFSH tal como se describe en el presente documento (según aspectos de la invención) que comprende la etapa de producir o expresar la rFSH en una línea celular humana, por ejemplo una línea celular Per.C6, una línea celular procedente de Per.C6 o una línea celular Per.C6 modificada, por ejemplo una línea celular que se ha modificado usando α 2,3- sialiltransferasa.
- 55 La estructura de rFSH contiene restos de glucano. Se puede producir ramificación con el resultado que el glucano puede tener 1, 2, 3, 4 o más restos de azúcares terminales o "antenas", como se sabe bien en la técnica. La rFSH de la invención puede tener glucanos con presencia de sialilación en estructuras monoantennarias y/o diantennarias y/o triantennarias y/o tetrantennarias.
- 60 La estructura de rFSH contiene restos de glucano. Se puede producir ramificación con el resultado que el glucano puede tener 1, 2, 3, 4 o más restos de azúcares terminales o "antenas", como se sabe bien en la técnica. La rFSH de la invención puede tener glucanos con presencia de sialilación en estructuras monoantennarias y/o diantennarias y/o triantennarias y/o tetrantennarias.
- 65

Según la presente invención en un aspecto adicional se proporciona una composición farmacéutica que comprende rFSH que incluye sialilación en $\alpha 2,3$ y sialilación en $\alpha 2,6$ en la que el 80 % o más de la sialilación total es sialilación en $\alpha 2,3$ y del 5 al 40 % de la sialilación total es sialilación en $\alpha 2,6$ (por ejemplo, como se ha expuesto anteriormente). La composición farmacéutica puede comprender además hCG y/o LH.

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

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

La composición farmacéutica puede ser para el tratamiento de infertilidad, por ejemplo, para uso en, por ejemplo, tecnologías de reproducción asistida (TRA), inducción de la ovulación o inseminación intrauterina (IIU). La composición farmacéutica se puede usar, por ejemplo, en indicaciones médicas donde se usan preparaciones de FSH conocidas. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular en composiciones bien conocidas para cualquier vía de administración de fármacos, por ejemplo, oral, rectal, parenteral, transdérmica (por ejemplo, tecnología de parches), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intrasubesternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, pomadas o gotas) o como un aerosol bucal o nasal. Una composición típica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una solución acuosa, excipientes atóxicos, 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 1481- 87, y el formulario nacional XIV decimocuarta edición (American Pharmaceutical Association, 1975) entre otros.

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

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

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

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

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

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

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

Descripción detallada de la invención

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

la figura 1 muestra un mapa plasmídico del vector de expresión pFSH α 2/beta;

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

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

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

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

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

la figura 7 muestra las velocidades de eliminación metabólica (MRC, por sus siglas en inglés) de muestras de FSH de Per.C6;

la figura 8 muestra las MRC de muestras de FSH de Per.C6 modificadas por ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa;

la figura 9 muestra las MRC de muestras de FSH de Per.C6 modificadas por ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa;

la figura 10 muestra las MRC de muestras de FSH de Per.C6 modificadas por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa

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

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

la figura 13 muestra el aumento de peso ovárico por clones de FSH de Per.C6 de FSH de Per.C6 original modificada por ingeniería (α 2,3- sialiltransferasa).

Selección de secuencias

FSH humana

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

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

Sialiltransferasa

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

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

5 Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción del vector de expresión de FSH

Las secuencias codificadoras del polipéptido alfa de FSH (AH007338, SEQ ID 1) y del polipéptido beta de FSH (NM_003032, SEQ ID 2) se amplificaron mediante PCR usando las combinaciones de cebadores FSHa-fw y FSHa-rev y FSHb-fw y FSHb-rev respectivamente.

15 FSHa-fw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGGATTACTACAGAAAAATATGC-3'
 FSHa-rev 5'-GGATGGCTAGCTTAAGATTTGTGATAATAAC-3'
 FSHb-fw 5'-CCAGGCGCGCCACCATGAAGACACTCCAGTTTTTC-3'
 FSHb-rev 5'-CCGGGTAACTTATTATTCTTTCATTTACCAAAGG-3'

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

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

Ejemplo 2. Construcción del vector de expresión de ST3

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

35 2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCTCCTGCAGGCTGGAAGC-3'
 2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'

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

40

Ejemplo 3. Construcción del vector de expresión de ST6

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

45

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

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

50

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

55

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

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

65

Se iniciaron estudios para determinar la productividad y calidad del material de siete clones en matraces T80 para generar material suficiente. Las células se cultivaron en medio complementado como se ha descrito previamente 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 (figura 6). Se muestran muestras representativas en la figura 4. La información del IEF se usó para seleccionar clones para análisis la velocidad de eliminación metabólica (ejemplo 9). Se seleccionaron clones con suficiente productividad y calidad (005, 104, 179, 223, 144) para la modificación por ingeniería con sialiltransferasa.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se separaron FSH de Per.C6 de un clon original (sin sialiltransferasa adicional), un clon modificado por ingeniería con $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa y un clon modificado por ingeniería con $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa usando técnicas convencionales de SDS-PAGE. Como patrón se usó una FSH recombinante disponible comercialmente (Gonal-f, Serono).

Se analizó el ácido siálico usando el kit DIG Glycan Differentiation (n.º de catálogo 11 210 238 001, Roche) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones positivas con aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) indicaron ácido siálico unido terminalmente (2-6). Las reacciones positivas con aglutinina II de *Maackia amurensis* (MAA) indicaron ácido siálico unido terminalmente ($\alpha 2$ -3).

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

En conclusión, la modificación por ingeniería de FSH de células Per.C6 con $\alpha 2,3$ - o $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa aumentó con éxito el número de moléculas de ácido siálico conjugadas con la FSH en la muestra.

Ejemplo 8a. Cuantificación del ácido siálico total

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

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

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

Se midió el contenido total de ácido siálico de FSH de Per.C6 y se encontró que fue mayor de 6 mol/mol.

Ejemplo 8b. Cuantificación de cantidades relativas de ácido siálico $\alpha 2,3$, $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,8$

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

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

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

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

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

- 5 Cada muestra de rFSH se inmovilizó (bloque de gel), lavó, redujo, unió grupos alquilo y digirió con PNGasa F durante toda la noche. Después se extrajeron y procesaron los N-glucanos. Los N-glucanos se marcaron con el fluoróforo 2AB para el análisis de NP-HPLC y WAX- HPLC tal como se detalla en Royle et al.
- 10 Se llevó a cabo HPLC de intercambio aniónico débil (WAX, por sus siglas en inglés) para separar los N-glucanos por carga (ejemplo 8b) tal como se muestra en Royle et al, con un patrón de fetuina N-glucano como referencia. Los glucanos eluyeron según el número de ácidos siálicos que contenían. Todas las muestras incluyeron estructuras mono (1S), di (2S), tri (3S) y tetra (4S) sialiladas. Se encontró que las cantidades relativas de las estructuras sialiladas
- 15 estuvieron en las siguientes proporciones (1S:2S:4S:4S): 9-15 %: 27-30 %: 30-36 %: 25-29 % (por ejemplo, 10,24:28,65:35,49:25,62).

Ejemplo 9. Determinación de las velocidades de eliminación metabólica de rFSH

- 20 Para determinar la velocidad de eliminación metabólica (MCR) de muestras de FSH de Per.C6 se inyectó un bolo de rFSH a ratas hembras conscientes (3 animales por clon) en la vena caudal en el momento cero (1-10 µg/rata, basado en la cuantificación por ELISA de las muestras, DRG EIA 1288). Se tomaron muestras de sangre (400 µl) de la punta de la cola 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 32 horas después de la inyección de la muestra de análisis. El suero se recogió por centrifugación y se ensayó el contenido de FSH por ELISA (DRG EIA 1288).
- 25 El receptor de asialoglucoproteína (ASGP-R) reconoce glucoproteínas desialiladas (terminadas en galactosa) tal como asialofetuina (ASF) (Pricer y Ashwell, 1971, Van Lenten y Ashwell, 1972). El receptor de ASGP y la glucoproteína desialilada unida se internalizan en la célula donde el receptor se recicla y el ligando se degrada (Regoeczi *et al*, 1978, Steer y Ashwell, 1980).
- 30 Para investigar si el material de FSH de Per.C6 se eliminaba por medio de este mecanismo, el ASGP-R se saturó con asialofetuina. La velocidad de eliminación metabólica de material original o modificado por ingeniería con α 2,6 o α 2,3-sialiltransferasa se determinó tal como se ha descrito con la coadministración de un exceso molar mínimo de 7500 veces de asialofetuina para saturar el ASGP-R durante 1-2 horas.
- 35 El material producido por los clones de FSH de Per.C6 originales contenía algún material de MCR más largo pero un alto porcentaje se eliminó rápidamente (figura 7). El clon principal 005 que contenía el material más sialilado se modificó por ingeniería usando α 2,6 o α 2,3-sialiltransferasa (ejemplo 5). Aunque los clones modificados por ingeniería con α 2,6- sialiltransferasa demostraron sialilación aumentada (figura 5) no hubo mejora en la MCR (figura 7). El bloqueo de ASGR restableció el MCR del material α 2,6 al del patrón, demostrando que incluso con enlaces α 2,6
- 40 aumentados el material se elimina rápidamente (figura 8). La modificación por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa resultó en clones con MCR comparable al patrón (figura 9) y el contenido siálico variable fue coincidente con lo que se sabe para las isoformas de FSH (figura 10).

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

- 45 Para demostrar que el contenido creciente en ácido siálico en la FSH resulta en un efecto biológico aumentado, se examinó el aumento en los pesos ováricos en ratas por FSH altamente sialilada, tal como la producida en el ejemplo 5.
- 50 El aumento en los pesos ováricos debido a los clones de rFSH de Per.C6 se analizó según el método de Steelman y Pohley (1953). Se cuantificó rFSH de Per.C6 de muestras de medio celular filtrado por ELISA (DRG, EIA-1288). Las muestras (rFSH de Per.C6) y patrones (rFSH de Gonal-f) se analizaron a cinco dosis diferentes (3 animales/dosis). Gonal-f se dosificó a 50, 100, 200, 400 y 800 ng/rata. Las dosis de las muestras se calcularon usando sus valores de ABC relativos a Gonal-f, típicamente 0,05-10 µg/rata.
- 55 En conclusión, el material subsialilado producido por los clones de FSH de Per.C6 originales (figura 11) no fue tan potente en el ensayo de aumento del peso ovárico como la rFSH disponible comercialmente. La modificación por ingeniería con sialiltransferasa para añadir enlaces α 2,6 adicionales aumentó el contenido de ácido siálico pero no mejoró la potencia en el ensayo *in vivo* (figura 12). Sin embargo, los enlaces α 2,3 adicionales mejoraron significativamente la potencia (figura 13) y las dos preparaciones de FSH recombinante (procedentes de Per.C6 y CHO) muestran perfiles muy similares en este ensayo.
- 60

Ejemplo 11. Visión de conjunto de la producción y purificación

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

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

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

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

25 A partir de ahí, la purificación de FSH se llevó a cabo usando una modificación del método descrito por Lowry *et al.* (1976). Esto se logró por cromatografía en DEAE celulosa, filtración en gel en Sephadex G100, cromatografía de adsorción en hidroxiapatita y electroforesis en poliacrilamida preparatoria.

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

Referencias

30 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.

35 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.

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

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

45 Damián-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sánchez-Hernández C, Timossi C, y Ulloa-Aguirre A. (1999). Oestrogens regulate pituitary alpha2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol*. 23(2), 153-165.

50 D'Antonio M., Borrelli F., Datola A., Bucci R., Mascia M., Polletta P., Piscitelli D., y Papoian R. (1999) Biological characterization of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms. *Human Reproduction* 14, 1160-1167

Dalpathado DS, Irungu J, Go EP, Butnev VY, Norton K, Bousfield GR, y Desaire H. (2006). Comparative glycomics of the glycoprotein folliclestimulating hormone: glycopeptide analysis of isolates from two mammalian species. *Biochemistry*. 45(28), 8665-8673. Sin copia.

55 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.

60 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

65 Fox KM, Dias JA, y Van Roey P. (2001). Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol*. 15(3), 378-89

- Grabenhorst E, Hoffmann A, Nimtz M, Zettlmeissl G, y Conradt HS. (1995). Construction of stable BHK-21 cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal(beta 1-4)GlcNAc-R alpha 2,6- sialyltransferase alpha 2,6-linked NeuAc is preferentially attached to the Gal(beta 1-4)GlcNAc(beta 1-2)Man(alpha 1-3)-branch of diantennary oligosaccharides from secreted recombinant beta-trace protein. *Eur J Biochem.* 232(3), 718-25.
- 5 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.
- 10 Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T. y Zettlmeissl, G. (1990). Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6- sialyltransferase. *G Nucleic Acids Res.* 18(3), 667.
- Howles, C.M. (1996). Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Hum Reprod. Update*, 2,172-191.
- 15 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.
- 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 de Leeuw, R., Mulders, J., Voortman, G. Rombout, F. Darnm, J. y Kloosterboer, L. (1996) Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Mol. Hum. Reprod.* 2, 361-369.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1), 265-75.
- 35 Lowry, PJ, McLean, C, Jones RL y Satgunasingam N. (1976) Purification of anterior pituitary and hypothalamic hormones *Clin Pathol Supl (Assoc Clin Pathol)*. 7, 16-21.
- Pierce JG, y Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function *Annu Rev Biochem.* 50, 465-495.
- 40 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.
- 45 Regoeczi E, Debanne MT, Hatton MC, y Koj A. (1978) Elimination of asialofetuin and asialoorosomuroid by the intact rat. Quantitative aspects of the hepatic clearance mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 541(3), 372-84.
- 50 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.
- 55 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
- 60 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.
- 65 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damian-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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 50 LISTADO DE SECUENCIAS
- SEQ ID 1**
- 55 Polipéptido alfa de la hormona estimulante del foliculo
- Número de acceso AH007338
- Secuencia de nucleótidos de FSH alfa

ES 2 610 277 T3

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

Secuencia de proteína de FSH alfa

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

5

SEQ ID 2

Polipéptido beta de la hormona estimulante del folículo

10

Número de acceso NM_000510

Secuencia de nucleótidos de FSH beta

1 ATGAAGACAC TCCAGTTTTT CTCCTTTTC TGTTGCTGGA AAGCAATCTG
CTGCAATAGC
61 TGTGAGCTGA CCAACATCAC CATTGCAATA GAGAAAGAAG AATGTCGTTT
CTGCATAAGC
15
121 ATCAACACCA CTTGGTGTGC TGGCTACTGC TACACCAGGG ATCTGGTGTA
TAAGGACCCA
181 GCCAGGCCCA AAATCCAGAA AACATGTACC TTCAAGGAAC TGGTATATGA
AACAGTGAGA
241 GTGCCCGGCT GTGCTCACCA TGCAGATTCC TTGTATACAT ACCCAGTGGC
CACCCAGTGT
301 CACTGTGGCA AGTGTGACAG CGACAGCACT GATTGTACTG TGCGAGGCCT
GGGGCCCAGC
361 TACTGCTCCT TTGGTGAAAT GAAAGAATAA

ES 2 610 277 T3

Secuencia de proteína de FSH beta

1 MKTLQFFFLF CCWKAICCNNS CELTNITIAI EKEECRFCIS INTTWCAGYC
YTRDLVYKDP
61 ARPKIQKTCT FKELVYETVR VPGCAHHADS LYTPVATQC HCGKCDS DST
DCTVRGLGPS
121 YCSFGEMKE

5 SEQ ID 3

Beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4

Número de acceso L23767

10

Secuencia de nucleótidos de ST3GAL4

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

ES 2 610 277 T3

361 GTCGTGGGGA ACGGGCACCG GCTGCGGAAC AGCTCACTGG GAGATGCCAT
CAACAAGTAC
421 GATGTGGTCA TCAGATTGAA CAATGCCCCA GTGGCTGGCT ATGAGGGTGA
CGTGGGCTCC
481 AAGACCACCA TGGGTCTCTT CTACCCTGAA TCTGCCCACT TCGACCCCAA
AGTAGAAAAC
541 AACCCAGACA CACTCCTCGT CCTGGTAGCT TTCAAGGCAA TGGACTTCCA
CTGGATTGAG
601 ACCATCCTGA GTGATAAGAA GCGGGTGCGA AAGGGTTTCT GGAAACAGCC
TCCCCTCATC
661 TGGGATGTCA ATCCTAAACA GATTCCGATT CTCAACCCCT TCTTCATGGA
GATTGCAGCT
721 GACAACTGC TGAGCCTGCC AATGCAACAG CCACGGAAGA TTAAGCAGAA
GCCACCACG
781 GGCCTGTTGG CCATCACGCT GGCCCTCCAC CTCTGTGACT TGGTGACAT
TGCCGGCTTT
841 GGCTACCCAG ACGCCTACAA CAAGAAGCAG ACCATTCCT ACTATGAGCA
GATCACGCTC
901 AAGTCCATGG CGGGGTCAGG CCATAATGTC TCCAAGAGG CCCTGGCCAT
TAAGCGGATG
961 CTGGAGATGG GAGCTATCAA GAACCTCACG TCCTTCTGA

Secuencia de proteína de ST3GAL4

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

5

SEQ ID 4

Beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1

10 Número de acceso NM_003032

Secuencia de nucleótidos de ST6GAL1

ES 2 610 277 T3

1 ATGATTCACA CCAACCTGAA GAAAAAGTTC AGCTGCTGCG TCCTGGTCTT
TCTTCTGTTT
61 GCAGTCATCT GTGTGTGGAA GGAAAAGAAG AAAGGGAGTT ACTATGATTC
CTTTAAATTG
121 CAAACCAAGG AATTCCAGGT GTTAAAGAGT CTGGGGAAAT TGGCCATGGG
GTCTGATTCC
181 CAGTCTGTAT CCTCAAGCAG CACCCAGGAC CCCACAGGG GCCGCCAGAC
CCTCGGCAGT
241 CTCAGAGGCC TAGCCAAGGC CAAACCAGAG GCCTCCTTCC AGGTGTGGAA
CAAGGACAGC
301 TCTTCCAAAA ACCTTATCCC TAGGCTGCAA AAGATCTGGA AGAATTACCT
AAGCATGAAC
361 AAGTACAAAG TGTCCTACAA GGGGCCAGGA CCAGGCATCA AGTTCAGTGC
AGAGGCCCTG
421 CGCTGCCACC TCCGGGACCA TGTGAATGTA TCCATGGTAG AGGTCACAGA
TTTTCCCTTC
481 AATACCTCTG AATGGGAGGG TTATCTGCCC AAGGAGAGCA TTAGGACCAA
GGCTGGGCCT
541 TGGGGCAGGT GTGCTGTTGT GTCGTCAGCG GGATCTCTGA AGTCCTCCCA
ACTAGGCAGA
601 GAAATCGATG ATCATGACGC AGTCCTGAGG TTTAATGGGG CACCCACAGC
CAACTTCCAA
661 CAAGATGTGG GCACAAAAC TACCATTTCGC CTGATGAACT CTCAGTTGGT
TACCACAGAG
721 AAGCGCTTCC TCAAAGACAG TTTGTACAAT GAAGGAATCC TAATTGTATG
GGACCCATCT

ES 2 610 277 T3

781 GTATACCACT CAGATATCCC AAAGTGGTAC CAGAATCCGG ATTATAATTT
CTTTAACAAC
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
0p-

Secuencia de proteína de ST6GAL1

1 MIHTNLKKKF SCCVLVLLF AVICVWKEKK KGSYYDSFKL QTKEFQVLKS
LGKLAMGSDS
61 QSVSSSSTQD PHRGRQTLGS LRGLAKAKPE ASFQWVNKDS SSKNLIPRLQ
KIWKNYLSMN
121 KYKVSYKGGP PGIKFSAEAL RCHLRDHVNV SMVEVTDFPF NTSEWEGYLP
KESIRTKAGP
181 WGRCAVVSSA GSLKSSQLGR EIDDHDAVLR FNGAPTANFQ QDVGTKTTIR
LMNSQLVTTE
241 KRFLKDSLYN EGILIVWDPS VYHSDIPKWY QNPDYNFFNN YKTYRKLHPN
QPFYILKPQM
301 PWELWDILQE ISPEEIQPNP PSSGMLGIII MMTLCDQVDI YEFLPSKRKT
DVCYYYQKFF
361 DSACTMGAYH PLYEKNLVK HLNQGTDEDI YLLGKATLPG FRTIHC

En lo que antecede se han desvelado las FSH recombinantes, preparaciones de FSH recombinante, composiciones farmacéuticas, usos y métodos definidos por los siguientes párrafos numerados:

- 5 1. FSH recombinante (rFSH) que incluye sialilación en α 2,3 y α 2,6
2. FSH recombinante según el párrafo 1 que tiene un contenido en ácido siálico [expresado en cuanto a proporción de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína] de 6 mol/mol o mayor.
- 10 3. FSH recombinante según el párrafo 1 o el párrafo 2 que tiene un contenido en ácido siálico de entre 6 mol/mol y 15 mol/mol.
4. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos precedentes en la que un 10 % o más de la sialilación total es sialilación en α 2,3.
- 15 5. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos precedentes que incluye sialilación en α 2,3 en una cantidad que es del 65 al 85 % de la sialilación total.
- 20 6. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos precedentes que incluye sialilación en α 2,3 en una cantidad que es del 70 al 80 % de la sialilación total.
7. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos precedentes en la que un 50 % o menos de la sialilación total es sialilación en α 2,6.
- 25 8. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos precedentes que incluye sialilación en α 2,6 en una cantidad que es del 15 al 35 % de la sialilación total.
9. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos precedentes que incluye sialilación en α 2,6 en una cantidad que es del 20 al 30 % de la sialilación total.
- 30 10. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos precedentes que incluye adicionalmente sialilación en α 2,8.
11. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos precedentes en la que el contenido en ácido siálico es del 6 % o mayor en masa.
- 35 12. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos precedentes producida o expresada en una línea celular humana.
13. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos precedentes producida o expresada en una línea celular Per.C6, una línea celular procedente de Per.C6 o una línea celular Per.C6 modificada.
- 40 14. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos 12 o 13 en la que la línea celular se ha modificado usando α 2,3-sialiltransferasa.
- 45 15. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos 12 a 14 que incluye ácidos siálicos unidos en α 2,6 (sialilación en α 2,6) proporcionados por actividad sialil transferasa endógena.
16. FSH recombinante expresada en una línea celular humana.
- 50 17. FSH recombinante según el párrafo 16 en la que un 10 % o más de la sialilación total es sialilación en α 2,3.
18. FSH recombinante según el párrafo 16 o 17 que incluye sialilación en α 2,3 en una cantidad que es del 65 al 85 % de la sialilación total.
- 55 19. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos 16 a 18 en la que un 50 % o menos de la sialilación total es sialilación en α 2,6.
20. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos 16 a 19 que incluye sialilación en α 2,6 en una cantidad que es del 15 al 35 % de la sialilación total.
- 60 21. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos 16 a 20 que incluye un contenido en ácido siálico [expresado en cuanto a proporción de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína] de 6 mol/mol o mayor.
22. FSH recombinante según cualquiera de los párrafos 16 a 21 que incluye sialilación en α 2,3 y sialilación en α 2,6.
- 65 23. Una preparación de FSH recombinante que incluye sialilación en α 2,3 y sialilación en α 2,6.

24. Una preparación según el párrafo 23 que es una preparación farmacéutica.
25. Una preparación según el párrafo 23 o 24 que tiene un contenido en ácido siálico [expresado en cuanto a proporción de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína] de 6 mol/mol o mayor.
- 5 26. Una preparación según cualquiera de los párrafos 23 a 25 en la que un 10 % o más de la sialilación total es sialilación en α 2,3.
- 10 27. Una preparación según cualquiera de los párrafos 23 a 26 que incluye sialilación en α 2,3 en una cantidad que es del 65 al 85 % de la sialilación total.
28. Una preparación según cualquiera de los párrafos 23 a 27 en la que un 50 % o menos de la sialilación total es sialilación en α 2,6.
- 15 29. Una preparación según cualquiera de los párrafos 23 a 28 que incluye sialilación en α 2,6 en una cantidad que es del 15 al 35 % de la sialilación total.
30. Una preparación según cualquiera de los párrafos 23 a 29 producida o expresada en una línea celular humana.
- 20 31. Una composición farmacéutica que comprende rFSH que incluye sialilación α 2,3 y sialilación en α 2,6.
32. Una composición farmacéutica según el párrafo 31 en la que un 10 % o más de la sialilación total es sialilación en α 2,3.
- 25 33. Una composición farmacéutica según los párrafos 31 o 32 que incluye sialilación en α 2,3 en una cantidad que es del 65 al 85 % de la sialilación total.
- 30 34. Una composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos 31 a 33 en la que un 50 % o menos de la sialilación total es sialilación en α 2,6.
- 35 35. Una composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos 31 a 33 que incluye sialilación en α 2,6 en una cantidad que es del 15 al 35 % de la sialilación total.
36. Una composición farmacéutica que comprende rFSH según cualquiera de los párrafos 1 a 22 y/o una preparación según cualquiera de los párrafos 23 a 30.
37. Una composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos 31 a 36 que comprende adicionalmente hCG y/o LH.
- 40 38. Una composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos 31 a 37 para su uso en el tratamiento de la infertilidad.
- 45 39. un método de tratamiento de la infertilidad que comprende una etapa de administrar a un sujeto una composición que comprende rFSH según cualquiera de los párrafos 1 a 22 y/o una preparación según cualquiera de los párrafos 23 a 30 y/o una composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos 31 a 37.
40. Uso de rFSH según cualquiera de los párrafos 1 a 22 y/o una preparación de rFSH según cualquiera de los párrafos 23 a 30 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infertilidad.
- 50 41. Un método de producción de rFSH según cualquiera de los párrafos 1 a 22 y/o una preparación de rFSH según cualquiera de los párrafos 23 a 30 que comprende la etapa de producir o expresar la rFSH en una línea celular humana.

55 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ferring International Center S.A.

<120> Preparación farmacéutica

60

<130> P/60084.EP05

<150> US 61/045424

<151> 16-04-2008

65

<150> EP 08251528.9

ES 2 610 277 T3

<151> 25-04-2008

<160> 16

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 351
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SEQ ID 1 Secuencia de nucleótidos de FSH alfa

15 <400> 1

```

atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctgggtca cattgtcggg gtttctgcat      60
gttctocatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca      120
ttctttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattgg gctgctgctt ctctagagca      180
tatcccactc cactaaggtc caagaagacg atggtgggtcc aaaagaacgt cacctcagag      240
tccaacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatgggggg tttcaaagtg      300
gagaaccaca cggcgtgcc a ctgcagtact tgttattatc acaaatctta a      351

```

<210> 2
 20 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> SEQ ID 2 Secuencia de nucleótidos de FSH beta

<400> 2

```

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

```

30 <210> 3
 <211> 999
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SEQ ID 3 Secuencia de nucleótidos de ST3GAL4

40 <400> 3

ES 2 610 277 T3

atgtgtcctg caggctggaa gctcctggcc atgttggtc tggctcctggt cgtcatggtg 60
 tggattcca tctcccggga agacaggtac atcgagcttt tttattttcc catcccagag 120
 aagaaggagc cgtgcctcca gggtagggca gagagcaagg cctctaagct ctttgccaac 180
 tactcccggg atcagcccat cttcctgcgg cttgaggatt atttctgggt caagacgcca 240
 tctgcttacg agctgcccta tgggaccaag gggagtgagg atctgctcct ccgggtgcta 300
 gccatcacca gctcctccat cccaagaac atccagagcc tcagggtgccg ccgctgtgtg 360
 gtcgtgggga acgggcaccg gctgcggaac agctcactgg gagatgccat caacaagtac 420
 gatgtggtca tcagattgaa caatgcccc a gtggctggct atgagggtga cgtgggctcc 480
 aagaccacca tgcgtctctt ctaccctgaa tctgccact tcgaccccaa agtagaaaac 540
 aaccagaca cactcctcgt cctggtagct ttcaaggcaa tggacttcca ctggattgag 600
 accatcctga gtgataagaa gcgggtgoga aagggtttct ggaaacagcc tcccctcacc 660
 tgggatgtca atcctaaca gattcggatt ctcaaccct tcttcatgga gattgcagct 720
 gacaaactgc tgagcctgcc aatgcaacag ccacggaaga ttaagcagaa gccaccacg 780
 ggctgtttgg ccatcacgct ggccctccac ctctgtgact tgggtgcacat 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
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> SEQ ID 4 Secuencia de nucleótidos de ST6GAL1

10

<400> 4

atgattcaca ccaacctgaa gaaaaagttc agctgctgcg tcctggctctt tcttctgttt 60
 gcagtcatct gtgtgtggaa ggaaaagaag aaaggaggt actatgattc ctttaaattg 120
 caaaccaagg aattccaggt gttaaagagt ctggggaaat tggccatggg gtctgattcc 180
 cagtctgtat cctcaagcag caccagagc cccacaggg gccgccagac cctcggcagt 240
 ctcagaggcc tagccaaggc caaacagag gcctccttcc aggtgtggaa caaggacagc 300

ES 2 610 277 T3

tcttccaaaa accttatccc taggctgcaa aagatctgga agaattacct aagcatgaac 360
aagtacaaag tgtcctacaa ggggccagga ccaggcatca agttcagtgc agaggccctg 420
cgctgccacc tccgggacca tgtgaatgta tccatggtag aggtcacaga ttttcccttc 480
aatacctctg aatgggaggg ttatctgccc aaggagagca ttaggaccaa ggctgggcct 540
tggggcaggt gtgctgttgt gtcgtcagcg ggatctctga agtctccca actaggcaga 600
gaaatogatg atcatgacgc agtctgagg tttaatgggg caccacagc caacttccaa 660
caagatgtgg gcacaaaaac taccattcgc ctgatgaact ctcagttggt taccacagag 720
aagcgcttcc tcaaagacag tttgtacaat gaaggaatcc taattgtatg ggacccatct 780
gtataccact cagatatccc aaagtggtag cagaatccgg attataatct ctttaacaac 840
tacaagactt atcgtaaact gcacccaat cagccctttt acatcctcaa gccccagatg 900
ccttgggagc tatgggacat tcttcaagaa atctcccag aagagattca gccaaaaccc 960
ccatcctctg ggatgcttg tatcatcatc atgatgacgc tgtgtgacca ggtggatatt 1020
tatgagttcc tcccatcaa gcgcaagact gacgtgtgct actactacca gaagttcttc 1080
gatagtgcct gcacgatggg tgctaccac ccgctgctct atgagaagaa tttggtgaag 1140
catctcaacc agggcacaga tgaggacatc tacctgcttg gaaaagccac actgcctggc 1200
ttccggacca ttcactgcta a 1221

<210> 5
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de proteína de FSH alfa

<400> 5

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

ES 2 610 277 T3

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> 6
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de proteína de FSH beta

<400> 6

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

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

ES 2 610 277 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de proteína de ST3GAL4

<400> 7

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

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

ES 2 610 277 T3

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
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de proteína de ST6GAL1

10

<400> 8

ES 2 610 277 T3

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

ES 2 610 277 T3

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
 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

ES 2 610 277 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de PCR 2,3STfw	
	<400> 13	
	ccaggatccg ccacatgtg tctgcaggc tgaagc	37
10	<210> 14	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de PCR 2,3STrev	
	<400> 14	
20	ttttttctt aagtcagaag gacgtgaggt tcttg	35
	<210> 15	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de PCR 2,6STfw	
	<400> 15	
30	ccaggatccg ccacatgat tcacaccaac ctgaag	36
	<210> 16	
	<211> 32	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR 2,6STrev	
	<400> 16	
40	ttttttctt aagtagcag tgaatgtcc gg	32

REIVINDICACIONES

1. FSH recombinante (rFSH) que incluye sialilación en α 2,3 y α 2,6 en la que el 80 % o más de la sialilación total es sialilación en α 2,3 y en la que del 5 al 20 % de la sialilación total es sialilación en α 2,6.
- 5 2. FSH recombinante según la reivindicación 1 expresada en una línea celular humana.
3. Una composición farmacéutica que comprende rFSH según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 10 4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3 que comprende adicionalmente hCG y/o LH.
5. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3 o 4 para su uso en el tratamiento de la infertilidad.
- 15 6. Un método de producción de rFSH según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende la etapa de producir o expresar la rFSH en una línea celular humana.
7. Un método según la reivindicación 6 en la que la línea celular se ha modificado usando α 2,3-sialiltransferasa y/o α 2,6-sialiltransferasa.

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

Figura 1. Vector de expresión de FSH

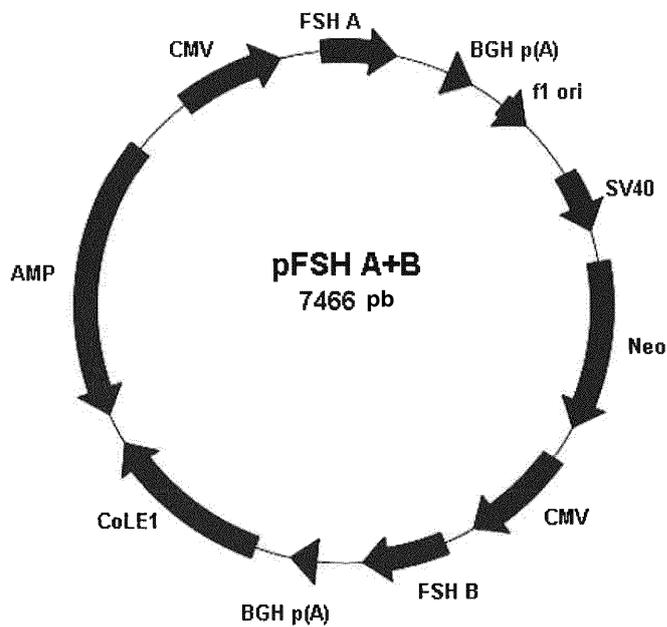


Figura 2. Vector de expresión de α 2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4)

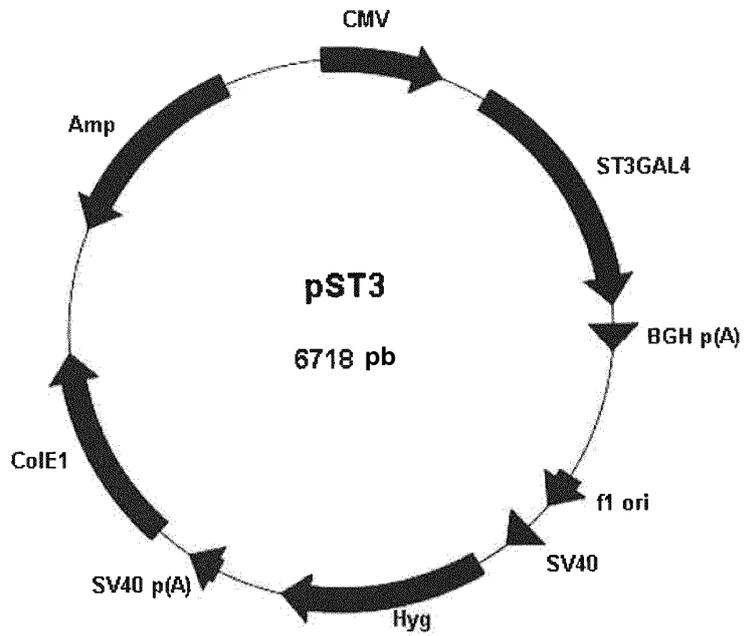


Figura 3. Vector de expresión de α 2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1)

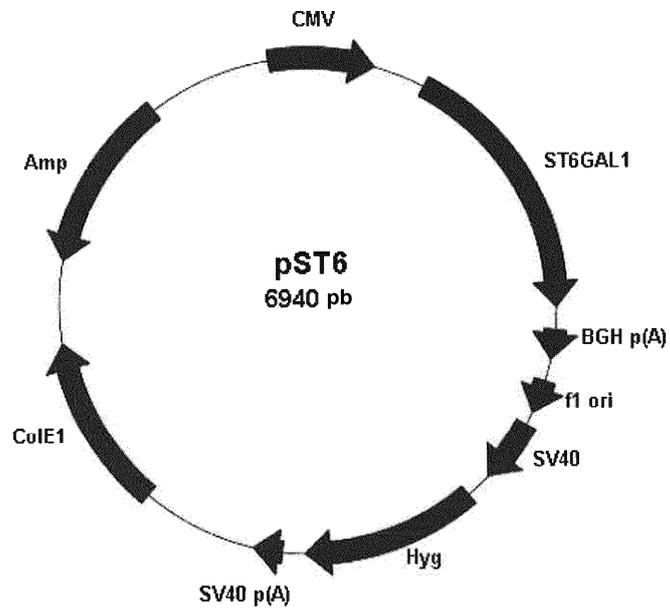


Figura 4. Isoelectroenfoque de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan FSH de forma estable. Sobrenadantes de cultivos celulares separados en condiciones nativas en un gradiente de pH de 3,0-7,0. El clon 005 es representativo de los cinco clones con los que se siguió adelante para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

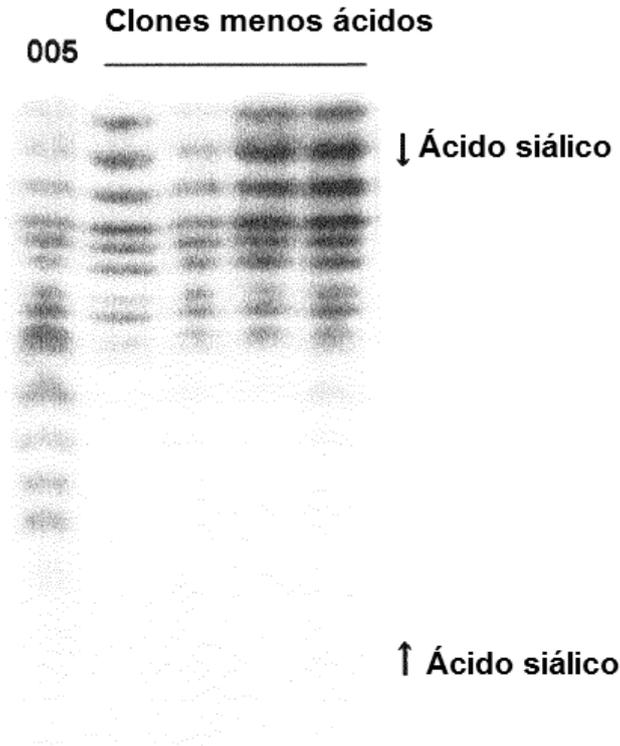


Figura 5. Ejemplo de clones analizados mediante isoelectroenfoque de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan FSH de forma estable después de modificarlas mediante ingeniería con α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa. Sobrenadantes de cultivos celulares separados en condiciones nativas en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

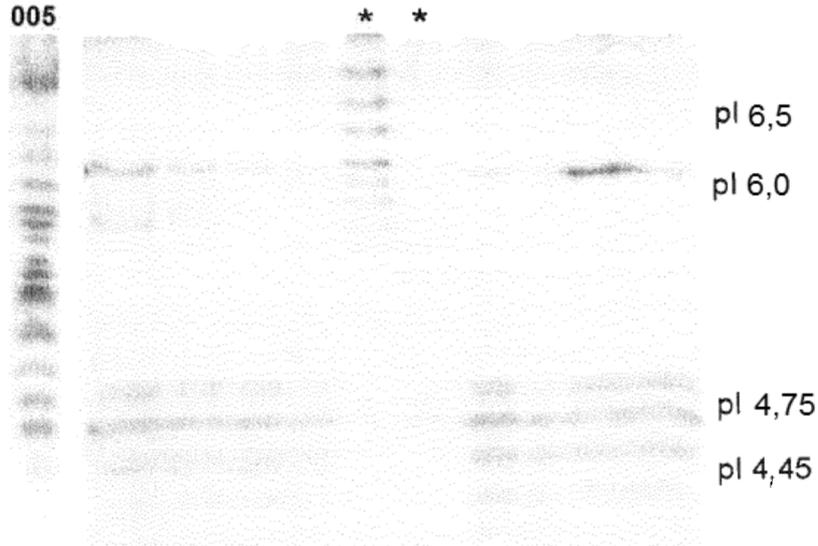
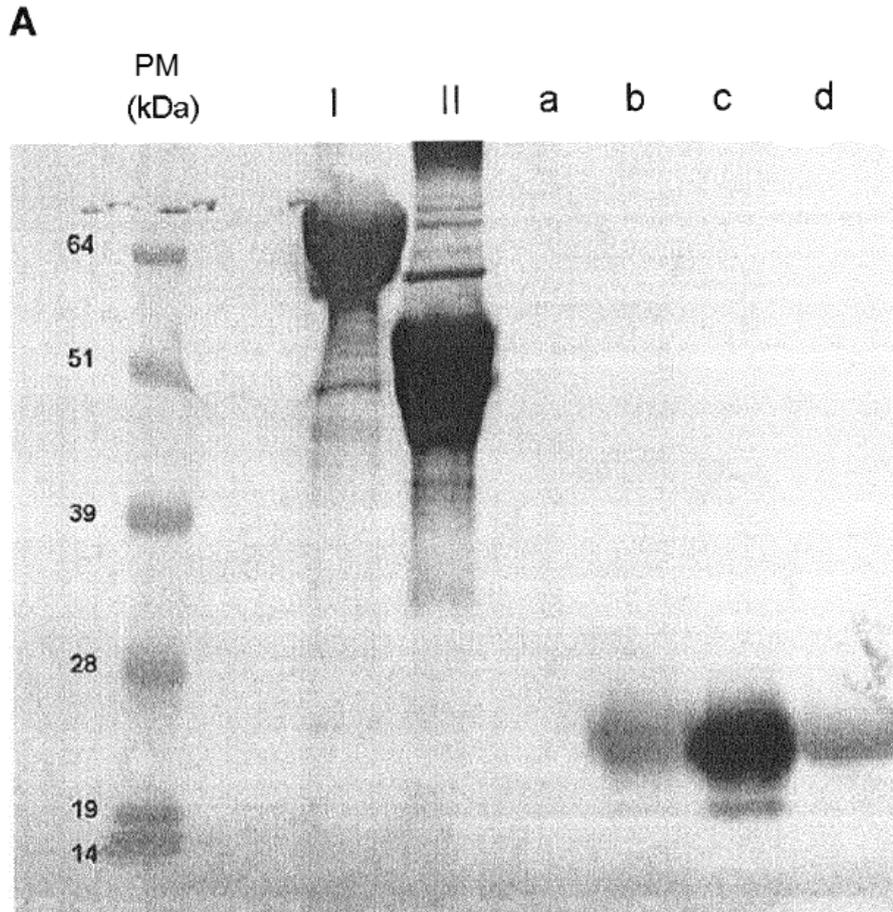


Figura 6. Análisis de los enlaces de ácido siálico de FSH de Per.C6. La FSH de Per.C6 purificada se separó por SDS PAGE en geles duplicados, se transfirió a nitrocelulosa y se visualizó usando el kit DIG Glycan Differentiation (n.º de catálogo 11 210 238 001, Roche) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones positivas con aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) indicaron ácido siálico unido en (2-6) terminalmente (**A**). Las reacciones positivas con aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA) indicaron ácido siálico unido en (2-3) terminalmente (**B**). Carril I control del fabricante que contiene enlaces α 2,6 únicamente. Carril II control del fabricante que contiene enlaces α 2,6 y α 2,3. Muestra a, FSH recombinante procedente de CHO comercial (Gona-f, Serono). Muestra b, FSH de Per.C6 parental, sin modificación por ingeniería con sialiltransferasa. Muestra c, FSH de Per.C6 con modificación por ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa. Muestra d, FSH de Per.C6 con modificación por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa



B

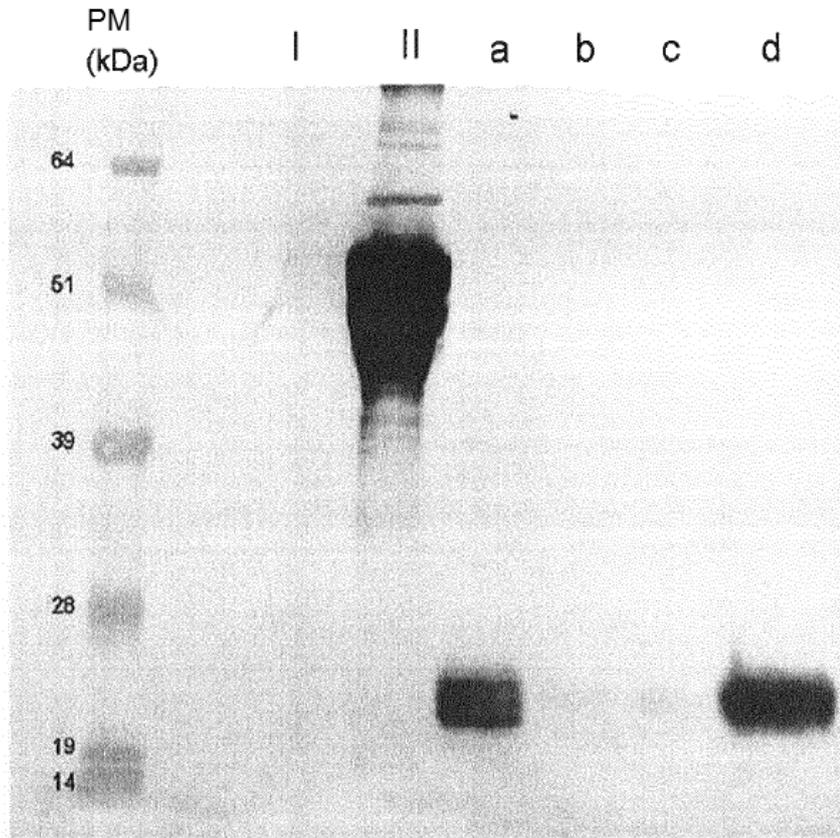


Figura 7. Velocidades de eliminación metabólica de muestras de FSH de Per.C6. Se inyectó un bolo de rFSH a ratas hembra (3 animales por clon) en la vena caudal en el momento cero (1-10 µg/rata). Se ensayó el contenido de FSH mediante ELISA en muestras de sangre recogidas a lo largo del tiempo.

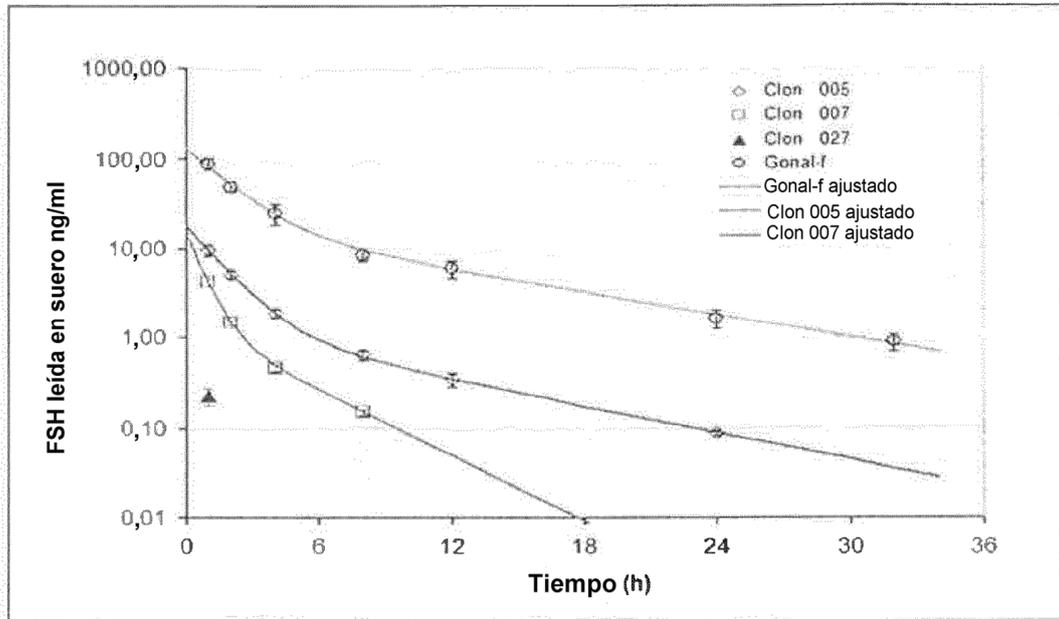


Figura 8. Velocidades de eliminación metabólica de muestras de FSH de Per.C6 modificada por ingeniería con $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa. Se inyectó un bolo de rFSH a ratas hembra (3 animales por clon) en la vena caudal en el momento cero (1-10 $\mu\text{g}/\text{rata}$). Se ensayó el contenido de FSH mediante ELISA en muestras de sangre recogidas a lo largo del tiempo.

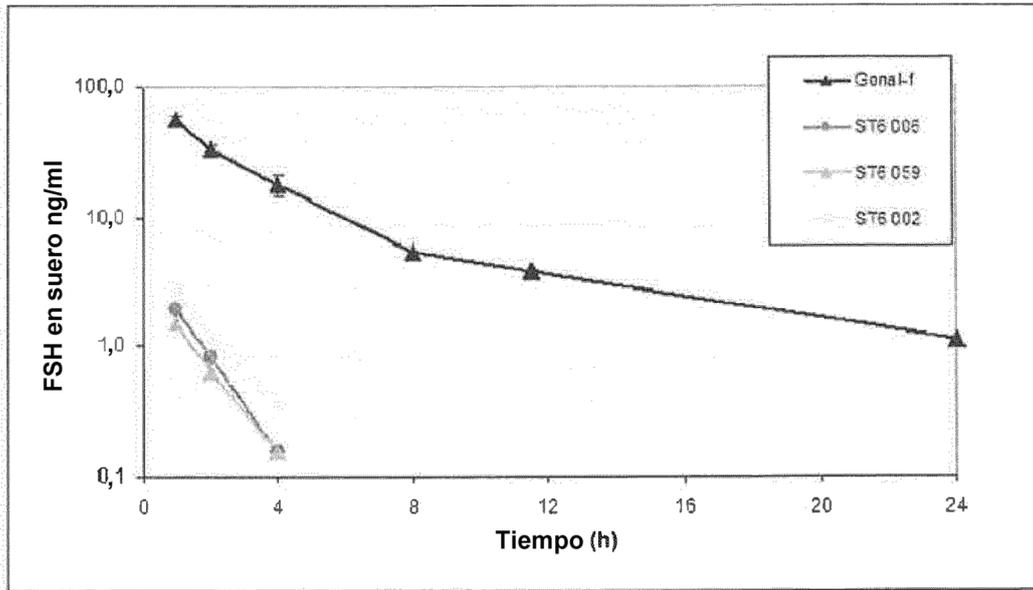


Figura 9. Velocidades de eliminación metabólica de muestras de FSH de Per.C6 modificada por ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa con coadministración de un exceso molar de 7500 veces de asialofetúina para saturar el ASGP-R durante 1-2 horas.

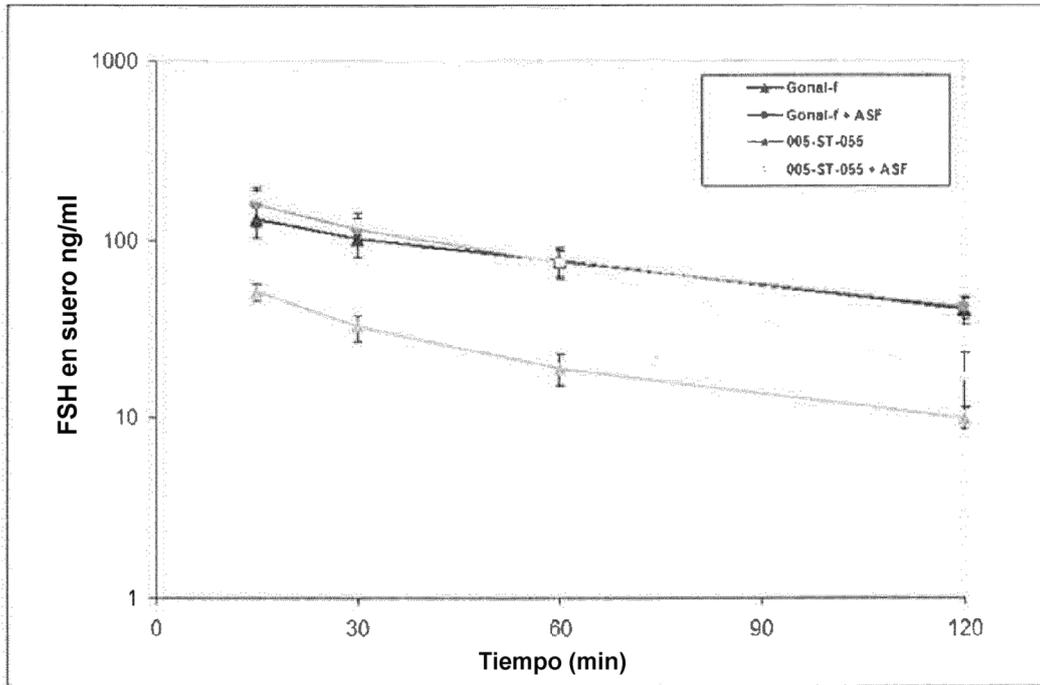


Figura 10. Velocidades de eliminación metabólica de muestras de FSH de Per.C6 modificada por ingeniería con $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa. Las muestras se eligieron por su contenido en ácido siálico basado en su perfil IEF.

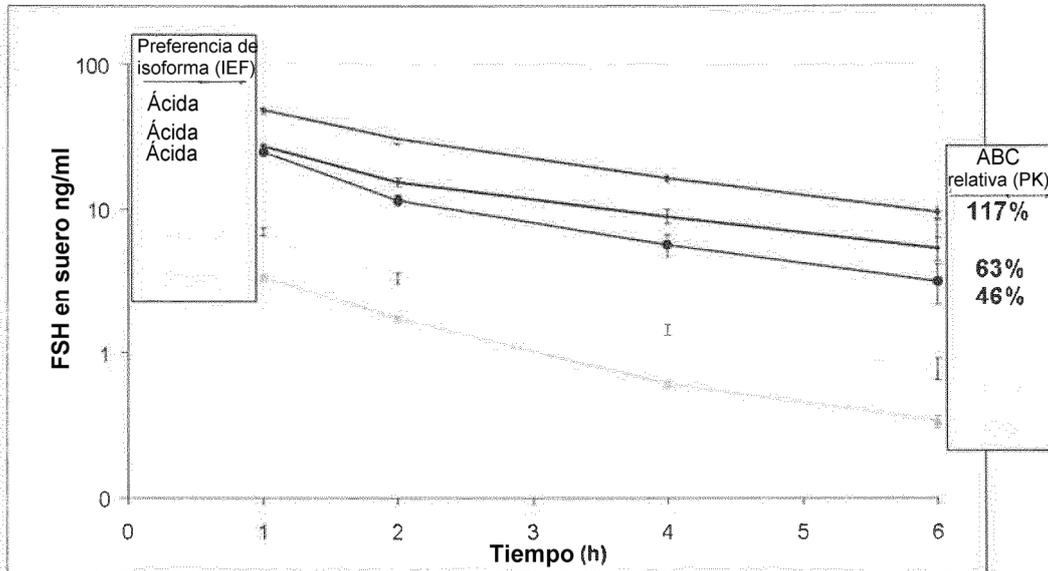


Figura 11. Aumento de peso ovárico según el método de Steelman y Pohley (1953). La FSH de Per.C6 y los patrones (rFSH Gonal-f) se analizaron a diferentes dosis (3 ratas/dosis).

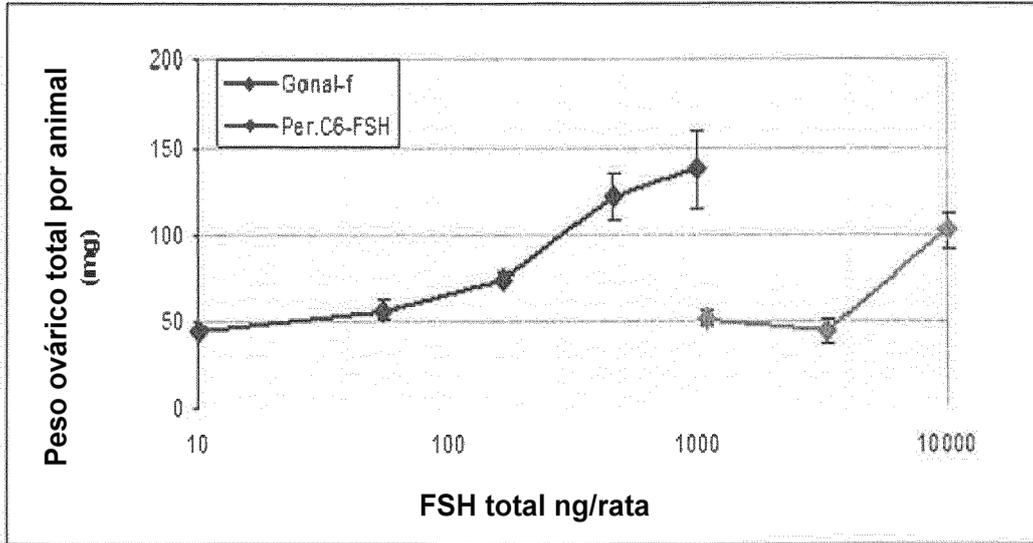


Figura 12. Aumento de peso ovárico según el método de Steelman y Pohley (1953). La FSH de Per.C6 modificada por ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa y los patrones (rFSH Gonal-f) se analizaron a diferentes dosis (3 ratas/dosis).

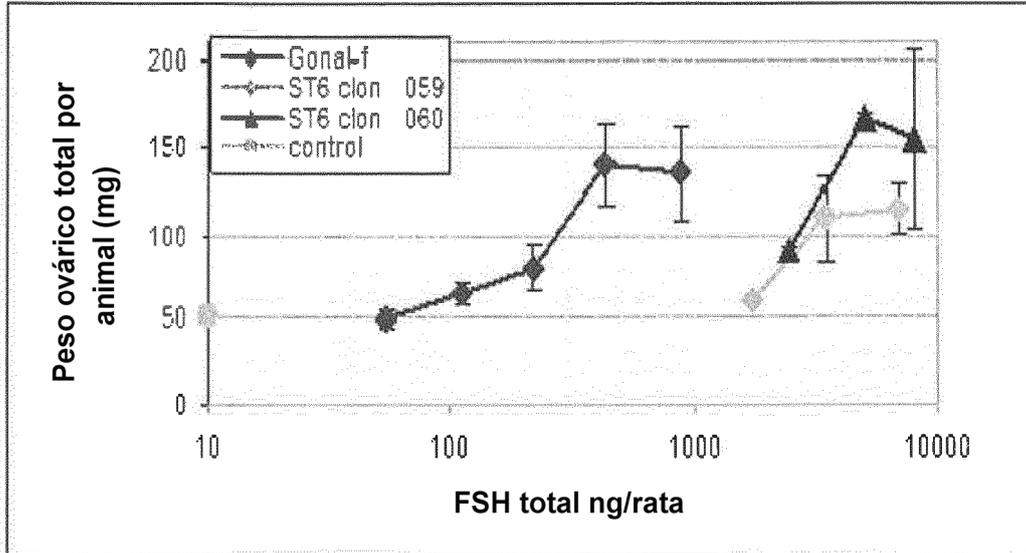


Figura 13. Aumento de peso ovárico según el método de Steelman y Pohley (1953). La FSH de Per.C6 original, la FSH de Per.C6 modificada por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa y los patrones (rFSH Gonal-f) se analizaron a cinco dosis diferentes (3 ratas/dosis).

