

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 392**

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 16158141 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 3045471**

54 Título: **FSH recombinante que incluye la sialilación α 2,3 y α 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:
09.08.2017

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 2 629 392 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 la sialilación α 2,3 y α 2,6.

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

10 Las gonadotropinas son un grupo de hormonas glicoproteicas heterodiméricas que regulan la función de las gónadas en machos y hembras. Incluyen la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH, *luteinising hormone*) y la gonadotropina coriónica (CG, *chorionic gonadotrophin*).

15 La FSH se secreta de forma natural en la glándula pituitaria anterior y funciona para dar soporte al desarrollo folicular y a la ovulación. La FSH comprende una subunidad alfa de 92 aminoácidos, también común para otras hormonas glicoproteicas LH y CG, y una subunidad beta de 111 aminoácidos única para FSH que confiere la especificidad biológica de la hormona (Pierce y Parsons, 1981). Cada subunidad se modifica después de la traducción mediante la adición de restos de carbohidrato complejos. Ambas subunidades portan 2 sitios para unión de glicano 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 lo tanto la FSH está glicosilada hasta aproximadamente un 30 % en masa (Dias y Van Roey, 2001. Fox *et al.*, 2001).

20 Durante muchos años la FSH purificada de orina humana post-menopáusica se ha usado en el tratamiento de la infertilidad; tanto para estimular la ovulación en la reproducción natural como para proporcionar ovocitos para tecnologías de reproducción asistida. Dos versiones recombinantes de FSH, Gonal-F (Serono) y Puregon (Organon) llegaron a estar disponibles a mediados de los años 90. Ambas se expresan en células de ovario de hámster chino (CHO) (Howles, 1996).

30 Existe una heterogeneidad considerable 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 en el que se modifican después de la traducción; las isoformas en particular se caracterizan por la heterogeneidad de las estructuras de las ramificaciones de carbohidratos y cantidades diferentes de incorporación de ácido siálico (un azúcar terminal), de las cuales parece que ambas influyen en la bioactividad de la isoforma específica.

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

45 La glicosilación de productos de FSH recombinante refleja la gama de glicosiltransferasas presentes en la línea celular hospedadora. Los productos de rFSH existentes se obtienen a partir de células de ovario de hámster chino (células CHO) modificadas por ingeniería. La gama de modificaciones de glicano en rFSH obtenida a partir de CHO está más limitada que las encontradas en los productos naturales, obtenidos a partir de extractos de pituitaria u orina. Los ejemplos de la reducción de heterogeneidad de glicanos encontrada en rFSH obtenida a partir de CHO incluyen una falta de glucosamina bisectante y una reducción del contenido 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 α 2,3 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990). Esto es diferente de la FSH producida de forma natural que contiene glicanos con una mezcla de ácido siálico unido en α 2,3 y α 2,6.

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

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

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

El tiempo de vida en circulación de la FSH se ha documentado para materiales a partir de una diversidad de fuentes. Algunos de estos materiales se han fraccionado basándose en la carga molecular total, tal como se caracterizan por su pI, en los que más ácido equivale a mayor carga negativa. Como se ha indicado previamente el principal elemento de contribución a la carga molecular global es el contenido total de ácido siálico de cada molécula de FSH. Por ejemplo, rFSH (Organon) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 8 mol/mol, mientras que la FSH obtenida a partir de orina tiene un contenido mayor de ácido siálico (de Leeuw *et al.*, 1996). Las tasas de eliminación en plasma correspondientes en rata son 0,34 y 0,14 ml/min (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2003). En otro ejemplo en el que una muestra de FSH recombinante se separó en fracciones de alto y bajo pI, la potencia *in vivo* de la fracción de pI alto (menor contenido de ácido siálico) disminuyó y tenía una semivida en plasma más corta (D'Antonio *et al.*, 1999). También se ha informado que la FSH más básica que circula durante los estadios tardíos del ciclo de ovulación se debe a la disminución de α 2,3 sialil-transferasa en la pituitaria 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 informado resultados para la α 2,6 sialiltransferasa.

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

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

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

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

Se preparó FSH recombinante con una mezcla de ácido siálico unido tanto en α 2,3 como en α 2,6 modificando por ingeniería una línea celular humana para que expresara tanto rFSH como α 2,3 sialiltransferasa (Ejemplo 4 y 5). El producto expresado es muy ácido y tiene una mezcla de ácidos siálicos unidos tanto en α 2,3 como en α 2,6; el último proporcionado por la actividad de sialil transferasa endógena (Figura 6). Esto tiene dos ventajas con respecto a rFSH expresada en células CHO convencionales: en primer lugar el material está más altamente sialilado debido a las actividades combinadas de las dos sialiltransferasas; y en segundo lugar el material se parece más estrechamente a la FSH natural. Es probable que esto sea más apropiado biológicamente hablando en comparación con los productos recombinantes obtenidos a partir de células CHO que producen solo ácido siálico unido en α 2,3 (Kagawa *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988, Svensson *et al.*, 1990) y presentan una disminución del contenido de ácido siálico (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995., Andersen *et al.*, 2004).

De acuerdo con la presente invención se proporciona un método de producción de FSH recombinante (en el

presente documento rFSH o recFSH) que incluye sialilación en α 2,3 y sialilación en α 2,6, método que comprende una etapa de producción o expresión de rFSH en una línea de células Per.C6, en la que la línea de células Per.C6 se ha modificado mediante ingeniería para expresar una α 2,3-sialiltransferasa.

5 La rFSH se produce o expresa en una línea celular Per.C6. Esto puede simplificar (y hacer más eficaz) el método de producción porque la manipulación y control de, por ejemplo, el medio de crecimiento celular para retener la sialilación puede ser menos crítico que con procesos conocidos. El método también puede ser más eficaz porque se produce poca rFSH básica en comparación con 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 produce o expresa en una
10 línea de células Per.C6 modificada 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 de sialil transferasa endógena [de la línea celular].

15 La rFSH se produce 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 de sialiltransferasa endógena.

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

25 Por tanto el método de la invención proporciona una versión recombinante de FSH que porta una mezcla de ácido siálico en α 2,3 y α 2,6 y por lo tanto se parece más estrechamente a la FSH natural. Se espera que el uso de este compuesto para la estimulación ovárica controlada, en técnicas de FIV, e inducción de la ovulación de como resultado una estimulación más natural del ovario en comparación con los productos recombinantes existentes.

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

35 La FSH recombinante ("rFSH" o "recFSH") (y/o preparación de FSH recombinante) producida de acuerdo con la invención incluye sialilación en α 2,3 y sialilación en α 2,6. Opcionalmente, la preparación de rFSH o rFSH puede incluir adicionalmente sialilación en α 2,8.

40 En el presente documento, la expresión "preparación de FSH recombinante" incluye una preparación para, por ejemplo, uso farmacéutico que incluye FSH recombinante. En realizaciones de la invención, la rFSH puede estar presente en una isoforma individual o como una mezcla de isoformas.

45 La rFSH (o preparación de rFSH) puede tener un contenido de ácido siálico [expresado en términos de una proporción de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína] de 6 mol/mol o superior (Ejemplo 8), por ejemplo entre 6 mol/mol y 15 mol/mol, por ejemplo entre 8 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo entre 10 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo entre 11 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo entre 12 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo entre 12 mol/mol y 13 mol/mol.

50 La rFSH (o preparación de rFSH) puede tener un 10 % o más de la sialilación total que es sialilación en sialilación en α 2,3. Por ejemplo, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o un 90 % o más de la sialilación total puede ser sialilación en α 2,3. La rFSH (o preparación de rFSH) puede incluir sialilación en α 2,3 en una cantidad que es de un 65 a un 85 % de la sialilación total, por ejemplo de un 70 a un 80 % de la sialilación total, por ejemplo de un 71 a un 79 % de la sialilación total. La rFSH (o preparación de rFSH) puede tener un 50 % o menos de la sialilación total que es sialilación en α 2,6. Por ejemplo un 40, 30, 20, 10, 5 % o menos de la sialilación total puede ser sialilación en α 2,6. La rFSH (o preparación de rFSH) puede incluir sialilación en α 2,6 en una cantidad que es de un 15 a un 35 % de la sialilación total, por ejemplo de un 20 a un 30 % de la sialilación total, por ejemplo de un 21 a un 29 % de la sialilación total. La rFSH (o preparación de rFSH) puede tener 5 % o menos de la sialilación total que es sialilación en α 2,8. Por ejemplo un 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 de un 0,1 a un 4 % de la sialilación total, por ejemplo de un 0,5 a un 3 % de la sialilación total, por ejemplo de un 0,5 a un 2,5 % de la sialilación total. Por sialilación se hace referencia a la cantidad de restos siálicos presentes en las estructuras de la FSH. La sialilación en α 2,3 se refiere a sialilación en la posición 2,3 (como se sabe bien en la técnica) y sialilación en α 2,6 en la posición 2,6 (también se sabe bien en la técnica). Por lo tanto, "% de la sialilación total puede ser sialilación en α 2,3", se refiere al % del número total de restos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,3. El término "% de sialilación total que es sialilación en α 2,6" se refiere al % del número total de restos de ácido siálico
60 presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,6.
65

La rFSH (o preparación de rFSH) puede tener un contenido de ácido siálico (cantidad de sialilación por molécula de FSH) de (basándose en la masa de la proteína, en lugar de la masa de proteína más carbohidrato) de un 6 % o superior (por ejemplo, entre un 6 % y un 15 %, por ejemplo entre un 7 % y un 13 %, por ejemplo entre un 8 % y un 12 %, por ejemplo entre un 11 % y un 15 %, por ejemplo entre un 12 % y un 14 %) en masa.

5 La estructura de rFSH contiene fracciones de glicano. Se pueden producir ramificaciones con el resultado de que el glicano puede tener 1, 2, 3, 4 o más restos de azúcares terminales o "antenas", como se sabe bien en la técnica. La rFSH puede tener glicanos con presencia de sialilación en estructuras monoanténarias y/o dianténarias y/o trianténarias y/o tetranténarias. La rFSH puede incluir preferentemente estructuras de glicano monosialilado, disialilado, trisialilado y tetrasialilado con cantidades relativas como sigue a continuación: monosialilado en un 9-10 15 %, disialilado en un 27 - 30 %, trisialilado en un 30-36 % y tetrasialilado en un 25-29 % (por ejemplo, como se muestra por análisis WAX de glicanos cargados, como se expone en el Ejemplo 8 c).

15 La rFSH preparada con el método de la invención se puede usar en una composición farmacéutica que comprende rFSH que incluye sialilación en α 2,3 y sialilación en α 2,6 (por ejemplo, como se ha establecido anteriormente). La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente hCG y/o LH.

20 La hCG se puede obtener por cualquier medio conocido en la técnica. Como se usa en el presente documento, la hCG incluye hCG obtenida a partir de ser humano y recombinante. La hCG obtenida a partir de ser humano se puede purificar a partir de cualquier fuente apropiada (por ejemplo, orina y placenta) mediante cualquier método conocido en la técnica. Los métodos para expresar y purificar hCG recombinante se conocen bien en la técnica.

25 La LH se puede obtener por cualquier medio conocido en la técnica. Como se usa en el presente documento, la LH incluye LH obtenida a partir de ser humano y recombinante. La LH obtenida a partir de ser humano se puede purificar a partir de cualquier fuente apropiada (por ejemplo, orina) mediante cualquier método conocido en la técnica. Los métodos para expresar y purificar LH recombinante se conocen bien en la técnica.

30 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 en las que se usan preparaciones de FSH conocidas. La presente invención también proporciona el uso de rFSH y/o una preparación de rFSH descrita en el presente documento (de acuerdo con aspectos de la invención) para, o en la preparación de un medicamento para, el tratamiento de infertilidad. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular en composiciones bien conocidas para cualquier vía de administración de fármacos, por ejemplo, oral, rectal, 35 parenteral, transdérmica (por ejemplo, tecnología de parches), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intrasusternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, pomadas o gotas) o como una pulverización bucal o nasal. Una composición habitual comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución acuosa, excipientes no tóxicos, incluyendo sales y conservantes, tampones y similares, como se describe en la decimoquinta edición de Pharmaceutical Sciences de Remington (Matt Publishing Company, 1975), en las páginas 1405 a 1412 y 40 1461 - 87, y en el formulario nacional XIV decimocuarta edición (American Pharmaceutical Association, 1975), entre otros.

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

50 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 se pueden incluir 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 sódico, y similares.

55 En algunos casos, para realizar una acción prolongada es deseable ralentizar la absorción de FSH (y otros principios activos, si estuvieran presentes) de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede conseguir mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con baja solubilidad en agua. La velocidad de absorción de FSH depende entonces de su tasa 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 consigue disolviendo o suspendiendo la combinación de FSH en un vehículo oleaginoso. 60

65 Las formas en depósito inyectables se pueden preparar formando matrices microencapsuladas de FSH (y otros agentes, si estuvieran presentes) en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de FSH con respecto al polímero y de la naturaleza del polímero usado en particular, la tasa de liberación de FSH se puede controlar. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen polivinilpirrolidona, poli(ortoésteres), poli(anhídridos), etc. Las formulaciones inyectables en depósito también se preparan atrapando la

FSH en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con tejidos corporales.

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

Las formulaciones inyectables se pueden suministrar como un producto que tiene composiciones farmacéuticas que contienen FSH (opcionalmente con hCG, LH, etc.). Si hay más de un principio activo (es decir, FSH y por ejemplo hCG o LH) estos pueden ser adecuados para la administración por separado o juntos. Si se administran por separado, la administración puede ser secuencial. El producto se puede suministrar en cualquier envase adecuado. Por ejemplo, un producto puede contener un número de jeringas cargadas previamente que contienen bien FSH, hCG o una combinación tanto de FSH como de hCG, las jeringas embaladas en un envase de tipo 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 diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con la práctica de rutina en este campo. Véase, *THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS* de GOODMAN y GILMAN, 7ª ed. En una realización referente, las composiciones de la invención se suministran como composiciones para 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*, mencionado anteriormente, en las páginas 780-820. Las composiciones parenterales se pueden suministrar en formulación líquida o en forma de un sólido que se mezclará con un medio inyectable estéril justo antes de su administración. En una realización especialmente preferente, las composiciones parenterales se suministran en formas farmacéuticas unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación.

Descripción detallada de la invención

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

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

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

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

la Figura 4 muestra el enfoque isoeléctrico de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan FSH de forma estable;

la Figura 5 muestra un ejemplo de clones analizados mediante enfoque isoeléctrico de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan FSH de forma estable después de modificadas mediante ingeniería con α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa;

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

la Figura 7 muestra las tasas de eliminación metabólica (MCR) de muestras de Per.C6 FSH;

la Figura 8 muestra las MCR de muestras de Per.C6 FSH modificadas mediante ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa;

la Figura 9 muestra las MCR de muestras de Per.C6 FSH modificadas mediante ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa;

la Figura 10 muestra las MCR de muestras de Per.C6 FSH modificadas mediante ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa;

la Figura 11 muestra el aumento de peso ovárico por clones de Per.C6 rFSH de Per.C6 rFSH precursoras, de acuerdo con el método de Steelman y Pohley (1953);

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

la Figura 13 muestra el aumento de peso ovárico por clones de Per.C6 rFSH de Per.C6 rFSH modificados mediante ingeniería (α 2,3-sialiltransferasa).

Selección de Secuencias

FSH Humana

La región codificante del gen para el polipéptido alfa de FSH se usó de acuerdo con 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. En el presente documento la secuencia se denomina SEQ ID 1.

La región codificante del gen para el polipéptido beta de FSH se usa de acuerdo con 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. En el presente documento la secuencia se denomina SEQ ID 2.

Sialiltransferasa

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

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

Ejemplos

Ejemplo 1 Construcción del vector de expresión de FSH

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

20 FSHa-dir 5'-CCAGGATCCGCCACCATGGATTACTACAGAAAAATATGC-3'
 FSHa-inv 5'-GGATGGCTAGCTTAAGATTTGTGATAATAAC-3'
 FSHb-dir 5'-CCAGGCGCGCCACCATGAAGACACTCCAGTTTTTC-3'
 FSHb-inv 5'-CCGGGTAACTTATTATTCTTTTCATTTACCAAAGG-3'

25 El ADN de FSH beta amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Ascl* y *HpaI* y se insertó en los sitios *Ascl* y *HpaI* en el vector de expresión de mamíferos dirigido por CMV que porta un marcador de selección de neomicina. De forma análoga el ADN de FSH alfa se digirió con *Bam*HI y *NheI* y se insertó en los sitios *Bam*HI y *NheI* en el vector de expresión que ya contenía el ADN del polipéptido beta de FSH.

30 El ADN del vector se usó para transformar la cepa DH5 α de *E. coli*. Se cogieron sesenta colonias para amplificación y cincuenta y siete contenían el vector que contenía FSH tanto alfa como beta. Se seleccionaron veinte de estas colonias para secuenciación y todas contenían las secuencias correctas de acuerdo con SEQ ID 1 y SEQ ID 2. Para transfección se seleccionó el plásmido pFSH A+B N.º 17 (Figura 1).

Ejemplo 2 Construcción del vector de expresión de ST3

35 La secuencia codificante de beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4 (ST3, L23767, SEQ ID 3) se amplificó por PCR usando la combinación de cebadores 2,3STdir y 2,3STinv.

40 2,3STdir 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3'
 2,3STinv 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'

45 El ADN de ST3 amplificado resultante DNA se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Afl*II y se insertó en los sitios *Bam*HI y *Afl*II en el vector de expresión de mamíferos dirigido por CMV que porta un marcador de resistencia a higromicina. El vector se amplificó como se ha descrito anteriormente y se secuenció. El clon pST3 N.º 1 (Figura 2) contenía la secuencia correcta de acuerdo con SEQ ID 3 y se seleccionó para transfección.

Ejemplo 3 Construcción del vector de expresión de ST6

50 La secuencia codificante de beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (ST6, NM_003032, SEQ ID 4) se amplificó por PCR usando la combinación de cebadores 2,6STdir y 2,6STinv.

2,6STdir 5'-CCAGGATCCGCCACCATGATTCACACCAACCTGAAG-3'
 2,6STinv 5'-TTTTTTTCTTAAGTTAGCAGTGAATGGTCCGG-3'

55 El ADN de ST6 amplificado resultante se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Afl*II y se insertó en los sitios *Bam*HI y *Afl*II en el vector de expresión de mamíferos dirigido por CMV que porta un marcador de resistencia a higromicina. El vector se amplificó como se ha descrito anteriormente y se secuenció. El clon pST6 N.º 11 (Figura 3) contenía la secuencia correcta de acuerdo con SEQ ID 4 y se seleccionó para transfección.

Ejemplo 4 Expresión estable de pFSH A+B en células PER.C6. Transfección, aislamiento e identificación sistemática de clones.

65 Se generaron clones de Per.C6 que producen FSH mediante la expresión de ambas cadenas polipeptídicas de FSH a partir de un único plásmido (véase el Ejemplo 1).

Para obtener clones estables, se usó un agente de transfección basado en liposomas con la construcción pFSH

A+B. Se seleccionaron clones estables en VPRO suplementado con FCS 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 una confluencia de un 70-80 %. Los sobrenadantes se sometieron a ensayo para contenido de proteína de FSH 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. Los clones (98) que expresaban proteína funcional se desarrollaron para expansión del cultivo en formato de 24 pocillos, 6 pocillos y matraces T80.

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 suplementado como se ha descrito anteriormente durante 7 días y el sobrenadante se recogió. La productividad se determinó usando el ELISA selectivo para FSH. Se determinó el perfil isoeléctrico del material (Ejemplo 6). En la Figura 4 se muestran muestras representativas. La información del IEF se usó para seleccionar clones para análisis de tasa de eliminación metabólica (Ejemplo 9). Los clones (005, 104, 179, 223, 144) con suficiente productividad y calidad se seleccionaron para modificación mediante 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 e identificación sistemática de clones

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

Se generaron clones estables como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4. Un total de 202 clones del programa de α 2,3-sialiltransferasa y 210 clones del programa de α 2,6-sialiltransferasa se aislaron, se expandieron y 40 se sometieron a ensayo. 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 se ha mencionado anteriormente, los clones se sometieron a ensayo usando un ELISA selectivo de FSH, respuesta funcional en un línea celular con receptor de FSH, IEF (Ejemplo 6), tasa de eliminación metabólica (Ejemplo 9) y análisis de Steelman Pohley (Ejemplo 10). Los resultados se compararon con una FSH recombinante disponible en el mercado (Gonal-f, Serono) y las líneas de células Per.C6 con FSH precursoras. En la Figura 5 se muestran muestras representativas. Algunos clones no demostraron un aumento de la sialilación pero se puede observar que la FSH producida por la mayoría de los clones presenta una sialilación significativamente mejorada (es decir, como promedio más isoformas de FSH con índices elevados de ácidos siálicos) en comparación con la FSH expresada sin α 2,3-o α 2,6-sialiltransferasa.

En conclusión, la expresión de FSH junto con sialiltransferasa en células Per.C6 da como resultado un aumento de los niveles 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 enfoque isoeléctrico.

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

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

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

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

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

- 5 Usando este método se identificaron clones que producían isoformas de FSH con un número mayor de moléculas de ácido siálico. La modificación mediante ingeniería con α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa dio como resultado clones con más ácido siálico y un pI menor.

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

- 10 Los glicoconjugados se analizaron usando un método de diferenciación de glicano basado en lectina. Con este método se pueden caracterizar glicoproteínas y glicoconjugados unidos a nitrocelulosa. Las lectinas reconocen de forma selectiva un resto en particular, por ejemplo ácido siálico unido en α 2,3. Las lectinas aplicadas se conjugan con la digoxigenina de hapteno esteroide que permite la detección inmunológica de las lectinas unidas.
- 15 La FSH de Per.C6 purificada a partir de un clon precursor (sin sialiltransferasa adicional), un clon modificado por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa y un clon modificado por ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa se separaron usando técnicas convencionales de SDS-PAGE. Como patrón se usó una FSH recombinante disponible en el mercado (Gonal-f, Serono).
- 20 El ácido siálico se analizó usando el kit de Diferenciación de Glicano DIG (N.º de Cat. 11 210 238 001, Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones positivas con aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) indicaban ácido siálico unido terminalmente en (2-6). Las reacciones positivas con aglutinina II de *Maackia amurensis* (MAA) indicaban ácido siálico unido terminalmente en (α 2-3).
- 25 En resumen el clon precursor 005 contenía niveles bajos de ácido siálico tanto en α 2,3 como en α 2,6. Los clones modificados por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa contenían niveles altos de enlaces de ácido siálico α 2,3 y niveles bajos de enlaces de ácido siálico α 2,6. Los clones modificados por ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa contenían niveles altos de enlaces de ácido siálico α 2,6 y niveles bajos de enlaces de ácido siálico α 2,3. El control patrón Gonal-f solo contiene enlaces de ácido siálico α 2,3. Esto es coherente 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).
- 30

En conclusión, la modificación por ingeniería con células Per.C6 FSH con α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa aumentada de forma satisfactoria el número de moléculas de ácido siálico conjugadas a la FSH en la muestra.

35

Ejemplo 8a Cuantificación del ácido siálico total

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

40

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

45

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

50

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

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

El porcentaje de las cantidades relativas de en ácido siálico α 2,3, α 2,6 y α 2,8 en rFSH purificada (Ejemplo 11) se midieron usando técnicas conocidas.

55

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

60

Las muestras de los glicanos extraídos, combinados (extraídos como se ha mencionado anteriormente) se digirieron con diferentes sialidasas para determinar los enlaces. La NAN 1 (sialidasa recombinante) libera ácidos siálicos terminales no reductores unidos en α 2,3 (NeuNAc y NeuNGc), ABS (*sialidasa de Arthrobacter ureafaciens*) libera ácidos siálicos terminales no reductores unidos en α 2,3, α 2,6 y α 2,8 (NeuNAc y NeuNGc). Las muestras se

65

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 resultados diferentes. Esto indica que las muestras tienen ácidos siálicos con enlaces en α 2,3, α 2,6 y α 2,8. Los porcentajes relativos se calcularon a partir de estructuras presentes en el conjunto de glicanos sin digerir y se encontró que estaban en los intervalos de un 65 % - 85 % (por ejemplo, 77,75 %) para sialilación en α 2,3; de un 15 a un 35 % (por ejemplo, 21,46 %) para sialilación en α 2,6; y de un 0,1 a un 3 % para sialilación en α 2,8.

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

Las cantidades de porcentaje relativo se midieron de estructuras mono, di, tri y tetra sialiladas en glicanos extraídos a partir de rFSH purificada (Ejemplo 11) se midieron usando técnicas conocidas.

Cada muestra de rFSH se inmovilizó (bloque de gel), se lavó, se redujo, se alquiló y se digirió con PNGasa F durante una noche. A continuación, los N-glicanos se extrajeron y procesaron. Los N-glicanos se etiquetaron para análisis de NP-HPLC y WAX-HPLC con el fluoróforo 2AB como se detalla en Royle *et al.*

La HPLC de intercambio aniónico débil (WAX) para separar los N-glicanos por carga (Ejemplo 8b) se realizó como se establece En Royle *et al.*, con un patrón de Fetuina N-glicano como referencia. Los glicanos se eluyeron de acuerdo con el número de ácidos siálicos que contenían. Todas las muestras incluían estructuras mono (1S), di (2S), tri (3S) y tetra (4S) sialiladas. Se encontró que las cantidades relativas de las estructuras sialiladas estaban 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 tasas de eliminación metabólica de rFSH

Para determinar la tasa de eliminación metabólica (MCR) de muestras de Per.C6 FSH, se inyectaron ratas hembras conscientes (3 animales por clon) en la vena de la cola en el tiempo cero con un bolo de rFSH (1 - 10 μ g/rata, basándose en la cuantificación de las muestras por ELISA, DRG EIA 1288). Se extrajeron muestras de sangre (400 μ l) de la punta de la cola 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 32 horas después de la inyección de la muestra de ensayo. El suero se recogió por centrifugación y se sometió a ensayo para el contenido de FSH por ELISA (DRG EIA 1288).

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

Para investigar si el material de Per.C6 FSH se eliminaba a través de este mecanismo, el ASGP-R se saturó con asialofetuína. La tasa de eliminación metabólica del material precursor modificado por ingeniería con α 2,6 o α 2,3-sialiltransferasa se determinó como se ha descrito con la coadministración de un mínimo de exceso molar de 7500 veces de asialofetuína para saturar el ASGP-R durante 1-2 horas.

El material producido por los clones precursores de Per.C6 FSH contenía una cierta cantidad de material de MCR de mayor duración pero un alto porcentaje se eliminó rápidamente (Figura 7). El clon director 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 demostraban un aumento de la sialilación (Figura 5) no había mejora en la MCR (Figura 7). El bloqueo de ASGR restableció la MCR del material α 2,6 con respecto a la del patrón lo que demuestra que incluso con un aumento de los enlaces α 2,6 el material se elimina rápidamente (Figura 8). La modificación por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa dio como resultado clones con MCR comparable a la del patrón (Figura 9) y el contenido siálico variable era coherente con lo que se sabe para las isoformas de FSH (Figura 10).

Ejemplo 10 Ensayo *in vivo* de Steelman-Pohley

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

El aumento en los pesos ováricos debido a los clones de Per.C6 rFSH se analizó de acuerdo con el método de Steelman y Pohley (1953). Se cuantificó la rFSH de Per.C6 de muestras de medio celular filtrado por ELISA (DRG, EIA-1288). Las muestras (rFSH de Per.C6) y los patrones (rFSH de Gonalf) se sometieron a ensayo a cinco dosis diferentes (3 animales/dosis). El Gonalf se administró a 50, 100, 200, 400 y 800 ng/rata. Las dosis de las muestras se calcularon usando sus valores de AUC con respecto a Gonalf, por lo general de 0,05 - 10 μ g/rata.

En conclusión, el material subsialilado producido por los clones Per.C6 FSH precursores (Figura 11) no era tan potente en el ensayo de aumento del peso ovárico como la rFSH disponible en el mercado. La modificación por ingeniería con sialiltransferasa para añadir enlaces α 2,6 adicionales aumentaba el contenido de ácido siálico pero no mejoraba la potencia en el ensayo *in vivo* (Figura 12). Sin embargo, los enlaces en α 2,3 adicionales mejoraban la

potencia de forma significativa (Figura 13) y las dos preparaciones de FSH recombinante (obtenidas a partir de Per.C6 y CHO) presentan perfiles muy similares en este ensayo.

Ejemplo 11 Visión de conjunto de producción y purificación

5 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 de células PER.C6 productoras de FSH.

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

15 Para la producción de PER.C6-FSH, las líneas celulares se adaptaron a un medio sin suero, es decir, Excell 525 (JRH, Biosciences). Las células se cultivaron primero para formar una monocapa confluyente en un 70 %-90 % en un matraz de cultivo T80. Al pasarlas las células se volvieron a suspender en el medio sin suero, Excell 525 + L-glutamina 4 mM, a una densidad celular de $0,3 \times 10^6$ células/ml. Una suspensión celular de 25 ml se colocó en un matraz agitador 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 a una densidad celular de 0,2 o $0,3 \times 10^6$ células/ml y se cultivaron adicionalmente en matraces agitadores a 37 °C en CO₂ al 5 % y 100 rpm.

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

30 A partir de ese momento, la purificación de FSH se realizó usando una modificación del método descrito por Lowry *et al.*, (1976). Esto se consiguió por cromatografía sobre DEAE celulosa, filtración en gel en Sephadex G100, cromatografía de adsorción sobre hidroxiapatita, y electroforesis en poliacrilamida preparativa.

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

Referencias

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

45 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.

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

55 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.

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

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

65 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.
- 5 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.
- 10 Fox KM, Dias JA, y Van Roey P. (2001). Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol.* **15 (3)**, 378-89.
- 15 Grabenhorst E, Hoffmann A, Nimitz M, Zettlmeissl G, y Conradt HS. (1995). Construction of stable BHK-21 cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal(beta 1-4)GlcNAc-R alfa 2,6-sialyltransferase alpha 2,6-linked NeuAc is preferentially attached to the Gal(beta 1-4)GlcNAc(beta 1-2)Man(alfa 1-3)-branch of diantennary oligosaccharides from secreted recombinant beta-trace protein. *Eur J Biochem.* **232 (3)**, 718-25.
- 20 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.
- 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, CM. (1996). Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Hum Reprod. Actualización*, **2**, 172-191.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 Kitagawa, H. y Paulson, J.C (1994) Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J. Biol. Chem.* **269 (2)**, 1394-1401.
- Lee EU, Roth J, y Paulson JC (1989) Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem.* **264 (23)**, 13848-13855.
- 40 de Leeuw, R., Mulders, J., Voortman, G. Rombout, F. Damm, J. y Kloosterboer, L. (1996) Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Mol. Hum. Reprod.*, **2**, 361-369.
- 45 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193 (1)**, 265-75.
- Lowry, PJ, McLean, C, Jones RL y Satgunasingam N. (1976) Purification of anterior pituitary and hypothalamic hormones *Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)*. **7**, 16-21.
- 50 Pierce JG, y Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function *Annu Rev Biochem.* **50**, 465-495.
- Pricer WE Jr, y Ashwell G. (1971). The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem.* **246 (15)**, 4825-33.
- 55 Rathnam P, y Saxena BB. (1975). Primary amino acid sequence of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit. *J Biol Chem.*; **250 (17)**: 6735-6746.
- Regoeczi E, Debanne MT, Hatton MC, y Koj A. (1978) Elimination of asialofetuin and asialoorosomucoid by the intact rat. Quantitative aspects of the hepatic clearance mechanism. *Biochim Biophys Acta.* **541 (3)**, 372-84.
- 60 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.
- 65 Saxena BB y Rathnam P. (1976) Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human

- pituitary glands. *J Biol Chem.* **251 (4)**, 993-1005.
- Steelman SL, y Pohley FM. (1953) Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* **53 (6)**, 604-616.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damián-Matsumura, P. Jimenez, M, Zambrano, E y Diaz-Sanchez, V. (1992) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.* **7**, 23-30.
- 40 Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr, Beitins IZ, y Padmanabhan V. (1995). Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev.* **16 (6)**, 765-787.
- 45 Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P, y Timossi C (2001). Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation.. *Arch Med Res.* **32 (6)**. 520-532.
- 50 Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A, y Nayudu P. (2003). Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *Biol Reprod.* **69 (2)**, 379-389.
- 55 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.
- 60 Wide, L. y Albertsson-Wikland, K. (1990) Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 271-276.
- Wide, L. y Bakos, O. (1993). More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 885-889.
- 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.
- Zambrano E, Zariñán T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J, y Ulloa-Aguirre A. (1999). Receptor binding activity in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants. *Endocrine.* **10 (2)**, 113-121.
- Zhang X, Lok SH, y Kon OL (1998) Stable expression of human alpha-2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. *Biochim Biophys Acta.* **1425 (3)**, 441-452.

SEQ ID 1

Polipéptido alfa de la hormona foliculoestimulante

5 Número de registro AH007338

Secuencia de nucleótidos de alfa FSH

```

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 TCCACTTGCT  GTGTAGCTAA  ATCATATAAC  AGGGTCACAG  TAATGGGGGG
TTTCAAAGTG
301 GAGAACCACA  CGGCGTGCCA  CTGCAGTACT  TGTTATTATC  ACAAATCTTA  A
    
```

10

Secuencia de proteína de alfa FSH

```

1  MKTLQFFFLF  CCWKAICCMS  CELTNIITAI  EKEECRFCIS  INTTWCAGYC
YTRDLVYKDP
61  ARPKIQKTCT  FKELVYETVR  VPGCAHHADS  LYTPVATQC  HCGKCDSDST
DCTVRGLGPS
121 YCSFGEMKE
    
```

15 **SEQ ID 2**

Polipéptido beta de la hormona foliculoestimulante

Número de registro NM_000510

20

Secuencia de nucleótidos de beta FSH

```

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

ES 2 629 392 T3

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

Secuencia de proteína de beta FSH

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

5

SEQ ID 3

Beta-galactósido alfa -2,3-sialiltransferasa 4

10

Número de registro L23767

Secuencia de nucleótidos de ST3GAL4

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

15

ES 2 629 392 T3

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

Secuencia de proteína de ST3GAL4

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

5

SEQ ID 4

Beta-galactosamida alfa-2,6-sialittransferasa 1

10

Número de registro NM_003032

Secuencia de nucleótidos de ST6GAL1

ES 2 629 392 T3

1 ATGATTCACA CCAACCTGAA GAAAAAGTTC AGCTGCTGCG TCCTGGTCTT
 TCTTCTGTTT
 61 GCAGTCATCT GTGTGTGGAA GGAAAAGAAG AAAGGGAGTT ACTATGATTC
 CTTTAAATTG
 121 CAAACCAAGG AATCCAGGT GTTAAAGAGT CTGGGGAAAT TGGCCATGGG
 GTCTGATTCC
 181 CAGTCTGTAT CCTCAAGCAG CACCCAGGAC CCCCACAGGG GCCGCCAGAC
 CCTCGGCAGT
 241 CTCAGAGGCC TAGCCAAGGC CAAACCAGAG GCCTCCTTCC AGGTGTGGAA
 CAAGGACAGC
 301 TCTTCCAAAA ACCTTATCCC TAGGCTGCAA AAGATCTGGA AGAATTACCT
 AAGCATGAAC
 361 AAGTACAAAG TGTCCCTACAA 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 GCACAAAAAC TACCATTGCG CTGATGAACT CTCAGTTGGT
 TACCACAGAG
 721 AAGCGCTTCC TCAAAGACAG TTTGTACAAT GAAGGAATCC TAATTGTATG
 GGACCCATCT
 781 GTATACCACT CAGATATCCC AAAGTGGTAC CAGAATCCGG ATTATAATTT
 CTTTAACAAC
 841 TACAAGACTT ATCGTAAGCT GCACCCCAAT CAGCCCTTTT ACATCCTCAA
 GCCCCAGATG
 901 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

ES 2 629 392 T3

Op-

Secuencia de proteína de ST6GAL1

```
1  MIHTNLKKKF  SCCVLVFLLF  AVICVWKEKK  KGSYYDSFKL  QTKEFQVLKS
LGKCLAMGSDS
61  QSVSSSSTQD  PHRGRQTLGS  LRGLAKAKPE  ASFQVWNKDS  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
```

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ferring International Center S.A.

5 <120> Preparación farmacéutica

<130> P/60084.EP03

10 <150> US 61/045424
<151> 16-04-2008

<150> EP 08251528.9
<151> 25-04-2008

15 <160> 16

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> SEQ ID 1 Secuencia de nucleótidos de alfa FSH

<400> 1

atggattact acagaaaata tgcagctatc ttctctggta cattgtcggg gttcttgc	60
gttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaacca	120
ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattg gctgctgctt ctctagagca	180
tatcccactc cactaaggtc caagaagacg atgttggtcc aaaagaacgt cacctcagag	240
tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatgggggg tttcaaagtg	300
gagaaccaca cggcgtgcca ctgcagtact tgttattatc acaaattctta a	351

30 <210> 2
<211> 390
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> SEQ ID 2 Secuencia de nucleótidos de beta FSH

40 <400> 2

ES 2 629 392 T3

```

atgaagacac tccagttttt cttccttttc tgttgctgga aagcaatctg ctgcaatagc      60
tgtgagctga ccaacatcac cattgcaata gagaaagaag aatgtcgttt ctgcataagc      120
atcaacacca cttggtgtgc tggctactgc tacaccaggg atctggtgta taaggacca      180
gccaggccca aaatccagaa aacatgtacc ttcaaggaac tggatatatga aacagtgaga      240
gtgccccgct gtgctcacca tgcagattcc ttgtatacat acccagtggc caccagtggt      300
cactgtggca agtgtgacag cgacagcaact gattgtactg tgcgaggcct ggggccccagc      360
tactgtcctt ttggtgaaat gaaagaataa                                     390

```

5 <210> 3
 <211> 999
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> SEQ ID 3 Secuencia de nucleótidos de ST3GAL4

<400> 3

```

atgtgtcctg caggctggaa gctcctggcc atgttggctc tggcctcgtt cgtcatggtg      60
tggatttcca tctcccggga agacaggtac atcgagcttt tttatitttc catcccagag      120
aagaaggagc cgtgcctcca gggtgaggca gagagcaagg cctctaagct ctttggaac      180
tactcccggg atcagcccat cttcctgcgg cttgaggatt atttctgggt caagacgcca      240
tctgcttacg agctgcccta tgggaccaag gggagtgagg atctgctcct ccgggtgcta      300
gccatcacca gctcctccat cccaagaac atccagagcc tcaggtgccg ccgctgtgtg      360
gtcgtgggga acgggcaccg gctgcggaac agctcactgg gagatgccaat caacaagtac      420
gatgtggtca tcagattgaa caatgcccc agtggtggtt atgagggatga cgtgggctcc      480
aagaccacca tgcgtctctt ctaccctgaa tctgcccact togaccccaa agtagaaaac      540
aaccagaca cactcctcgt cctggtagct ttcaaggcaa tggacttcca ctggattgag      600
accatcctga gtgataagaa gcgggtgcga aagggtttct ggaaacagcc tcccctcatc      660
tgggatgtca atcctaaca gattcggatt ctcaaccctt tcttcatgga gattgcagct      720
gacaaactgc tgagcctgcc aatgcaacag ccacggaaga ttaagcagaa gccaccaccg      780
ggcctgttgg ccatcacgct ggcctccac ctctgtgact tggtgacat tgccggcttt      840
ggctaccag acgcctacaa caagaagcag accattcact actatgagca gatcacgctc      900
aagtccatgg cggggtcagc ccataatgtc tccaagagc ccctggccat taagcggatg      960
ctggagatgg gagctatcaa gaacctcagc tccttctga                               999

```

15 <210> 4
 <211> 1221
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> SEQ ID 4 Secuencia de nucleótidos de ST6GAL1

ES 2 629 392 T3

<400> 4

```

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

```

5

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

10

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

15

<400> 5

ES 2 629 392 T3

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

5 <210> 6
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de proteína de beta FSH

<400> 6

ES 2 629 392 T3

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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de proteína de ST3GAL4

10

<400> 7

ES 2 629 392 T3

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

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

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

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

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

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

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

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 2 629 392 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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de proteína de ST6GAL1

<400> 8

ES 2 629 392 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 2 629 392 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 2 629 392 T3

340

345

350

Cys Tyr Tyr Tyr Gln Lys Phe Phe Asp Ser Ala Cys Thr Met Gly Ala
355 360 365

Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu Lys Asn Leu Val Lys His Leu Asn Gln
370 375 380

Gly Thr Asp Glu Asp Ile Tyr Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Pro Gly
385 390 395 400

Phe Arg Thr Ile His Cys
405

<210> 9

<211> 39

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR FSHa-dir

10 <400> 9

ccaggatccg ccaccatgga ttactacaga aaaatatgc

39

<210> 10

<211> 31

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR FSHa-inv

20

<400> 10

ggatggctag cttaagattt gtgataataa c

31

<210> 11

<211> 35

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR FSHb-dir

30

<400> 11

ccaggcgcgc caccatgaag aactccagt ttttc

35

<210> 12

<211> 36

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR FSHb-inv

40

<400> 12

	ccgggtaac ttattattct ttcattcac caaagg	36
5	<210> 13 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR 2,3STdir	
	<400> 13 ccaggatccg ccaccatgtg tctgcaggc tggaagc	37
15	<210> 14 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador de PCR 2,3STinv	
25	<400> 14 tttttctt aagtcagaag gacgtgaggt tcttg	35
30	<210> 15 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador de PCR 2,6STdir	
	<400> 15 ccaggatccg ccaccatgat tcacaccaac ctgaag	36
40	<210> 16 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador de PCR 2,6STinv	
	<400> 16 tttttctt aagtagcag tgaatgtcc gg	32

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de rFSH que incluye sialilación en α 2,3 y en α 2,6, comprendiendo el método una etapa de producción o expresión de rFSH en una línea de células Per.C6; en el que la línea de células Per.C6 se ha modificado por ingeniería para expresar una α 2,3-sialiltransferasa.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la línea de células Per.C6 tiene actividad de α 2,6-sialiltransferasa endógena.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que de un 10 % a un 90 % de la sialilación total es sialilación en α 2,3.

Figuras 1, 2 y 3: Mapas plasmídicos de los vectores de expresión pFSHalfa/beta, pST3 y pST6. CMV = promotor del citomegalovirus, BGHp(A) = secuencia de poli-adenilación 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 poli-adenilación del virus simio 40, FSH A = polipéptido alfa de la hormona estimulante del folículo, FSH B = polipéptido beta de la hormona estimulante del folículo, 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

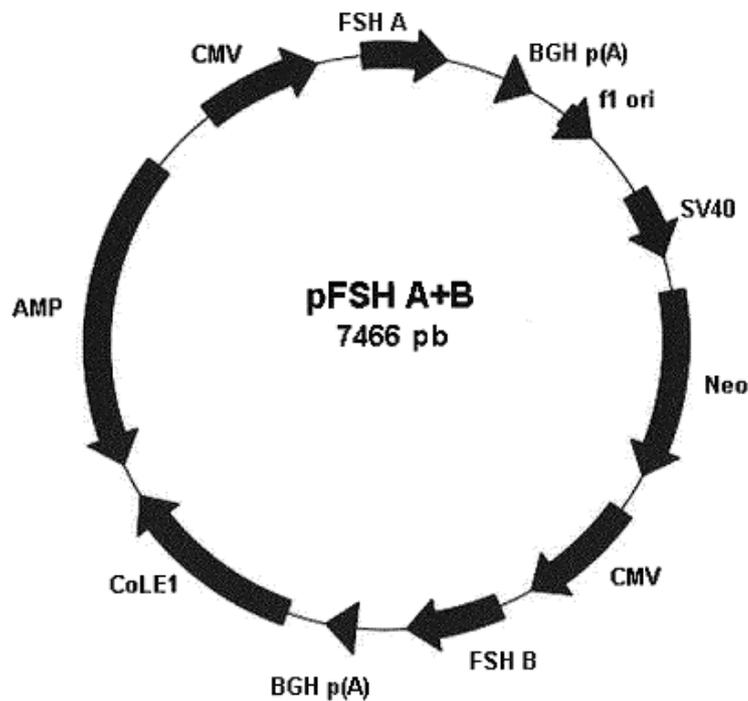


Figura 2. Vector de expresión de α 2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4)

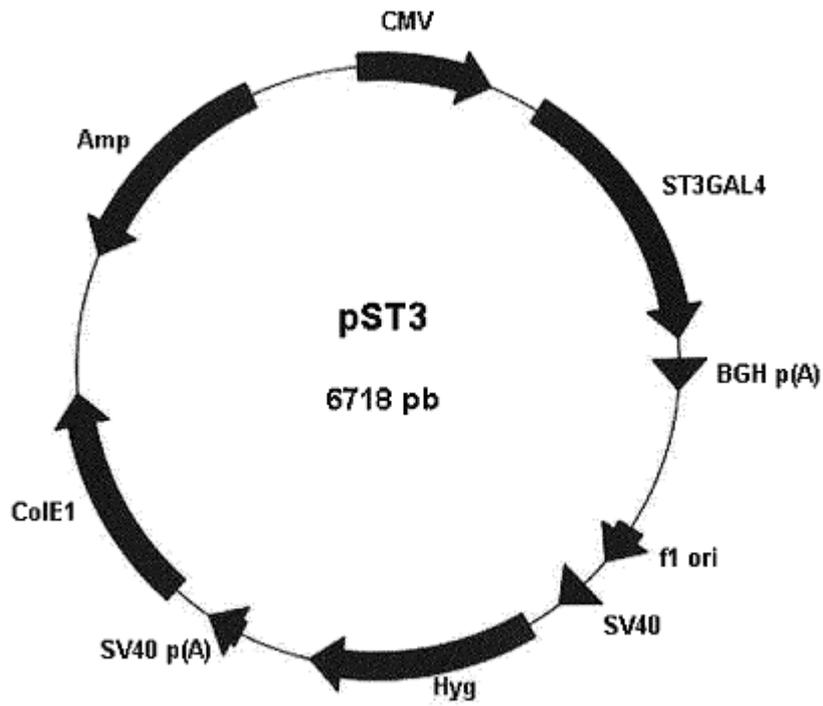


Figura 3. Vector de expresión de α 2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1)

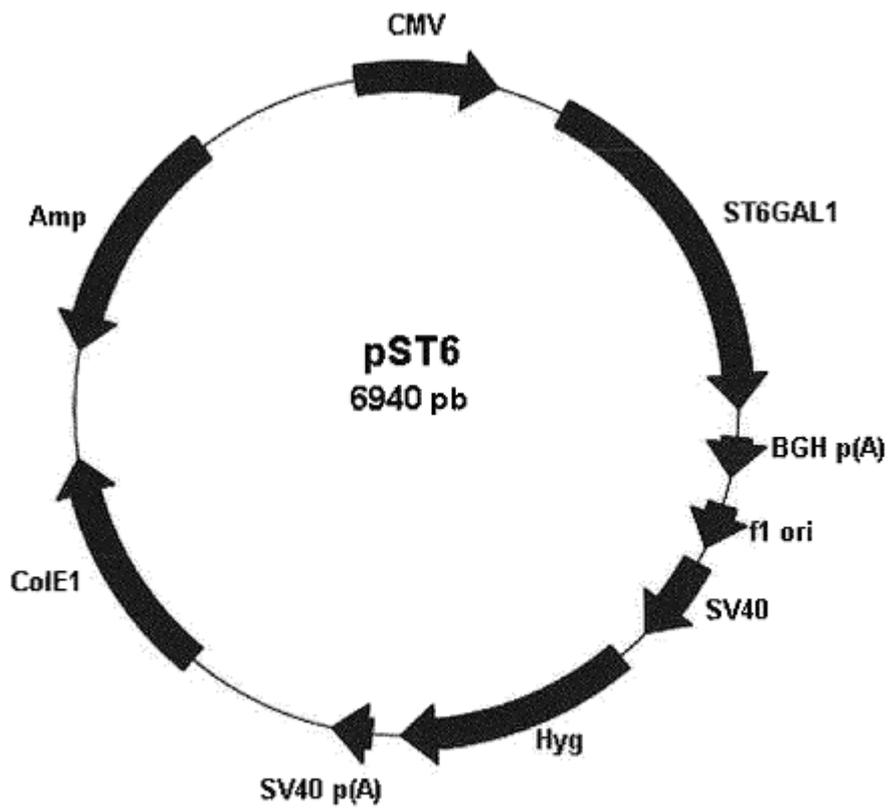


Figura 4 Enfoque isoelectrico de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan FSH de forma estable. Sobrenadantes de cultivo celular separados en condiciones nativas en un gradiente de pH de 3,0 - 7,0. El clon 005 es representativo de los cinco clones con los que se avanza para la modificación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

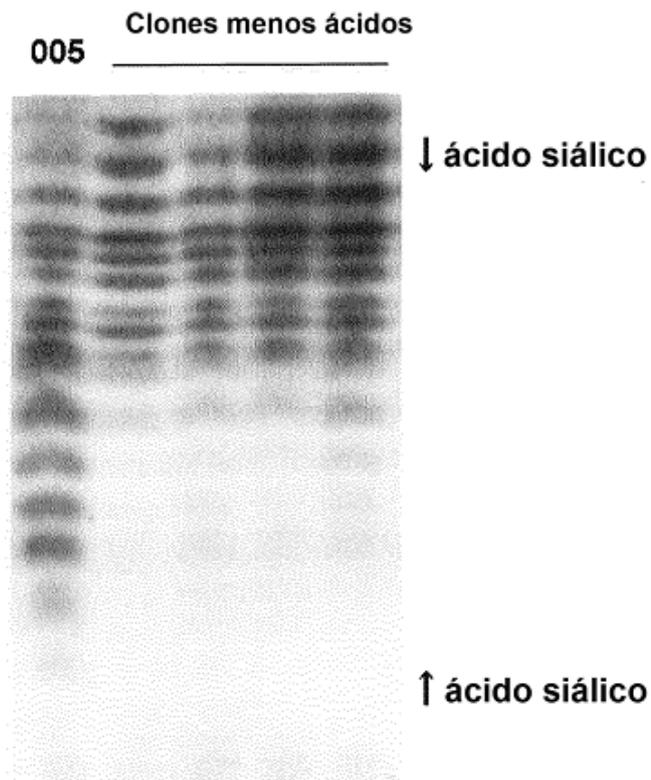


Figura 5 Ejemplo de clones analizados por enfoque isoeléctrico de FSH recombinante producida por células Per.C6 que expresan FSH de forma estable después de modificación por ingeniería con α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa. Sobrenadantes de cultivo celular separados en condiciones nativas en un gradiente de pH de 3,0 - 7,0. El clon 005 es la línea de células Per.C6 FSH precursoras. Los clones que presentan perfiles básicos o mixtos se interrumpieron (*). Los clones restantes demuestran una modificación por ingeniería exitosa con una sialiltransferasa para aumentar el número de moléculas de ácido siálico en FSH.

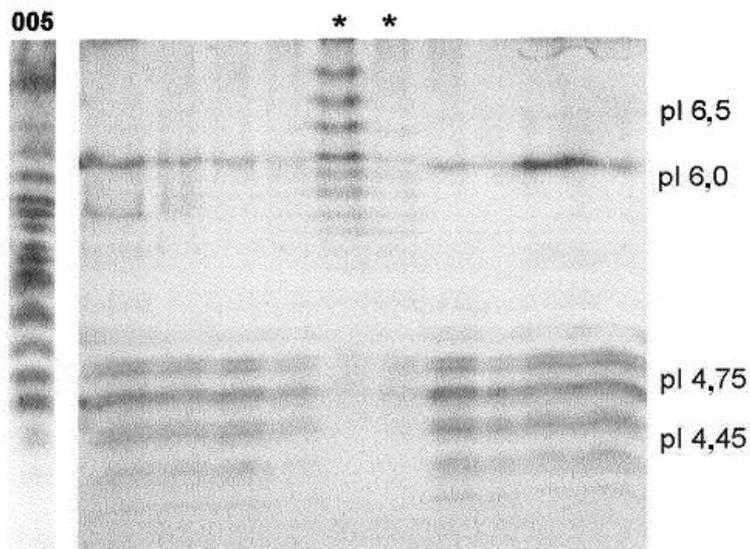
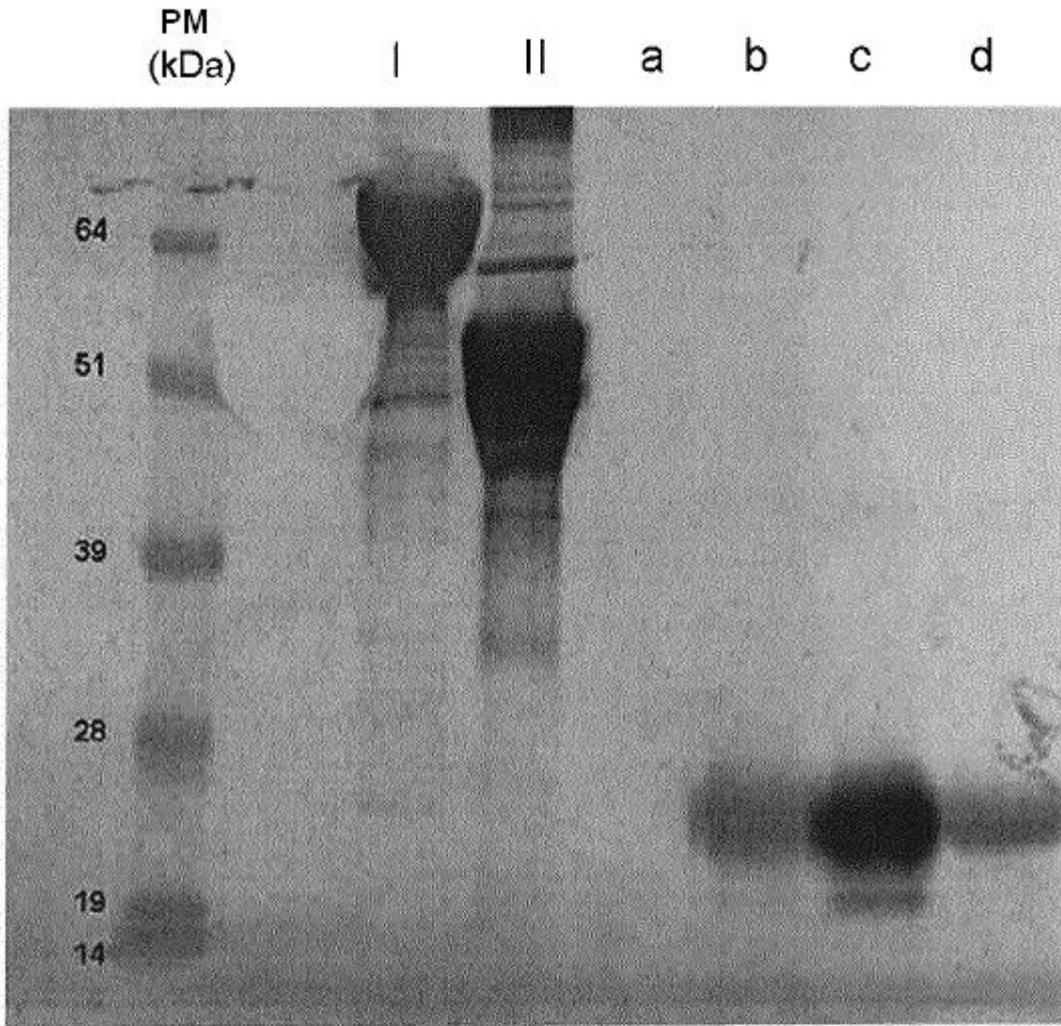


Figura 6 Análisis de los enlaces de ácido siálico de FSH de Per.C6. La FSH de Per.C6 purificada se separó por SDS PAGE en geles duplicados, se transfirió a nitrocelulosa y se visualizó usando el kit de diferenciación de Glicano DIG (N.º de Cat. 11 210 238 001, Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones positivas con aglutinina de Sambucus nigra (SNA) indicaban ácido siálico unido en (2-6) terminalmente (**A**). Reacciones positivas con aglutinina de Maackia amurensis (MAA): indicaban ácido siálico unido en (2-3) terminalmente (**B**). Carril I control de los fabricantes que solo contiene enlaces α 2,6. Carril II control de los fabricantes que contiene enlaces α 2,6 y α 2,3. Muestra a, FSH recombinante obtenida a partir de CHO comercial (Gonal-f, Serono). Muestra b, Per.C6 rFSH precursora, sin modificación por ingeniería de sialiltransferasa. Muestra c, Per.C6 rFSH con modificación por ingeniería de α 2,6-sialiltransferasa. Muestra d, Per.C6 rFSH con modificación por ingeniería de α 2,3-sialiltransferasa

A



B

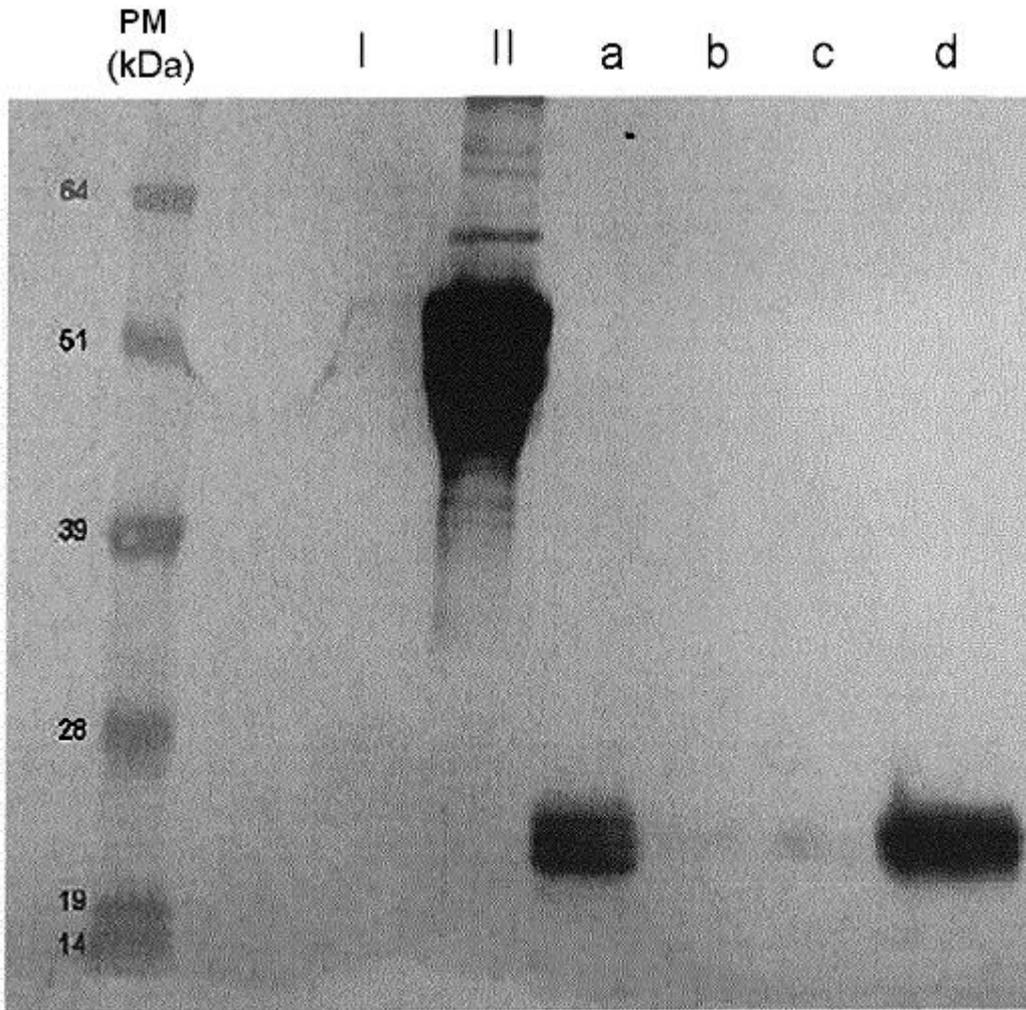


Figura 7 Tasas de eliminación metabólica de muestras de Per.C6 FSH. Se inyectaron ratas hembra (3 animales por clon) en la vena de la cola en el tiempo cero con un bolo de rFSH (1 - 10 µg/rata). Las muestras de sangre recogidas a lo largo del tiempo se sometieron a ensayo para contenido de FSH mediante ELISA.

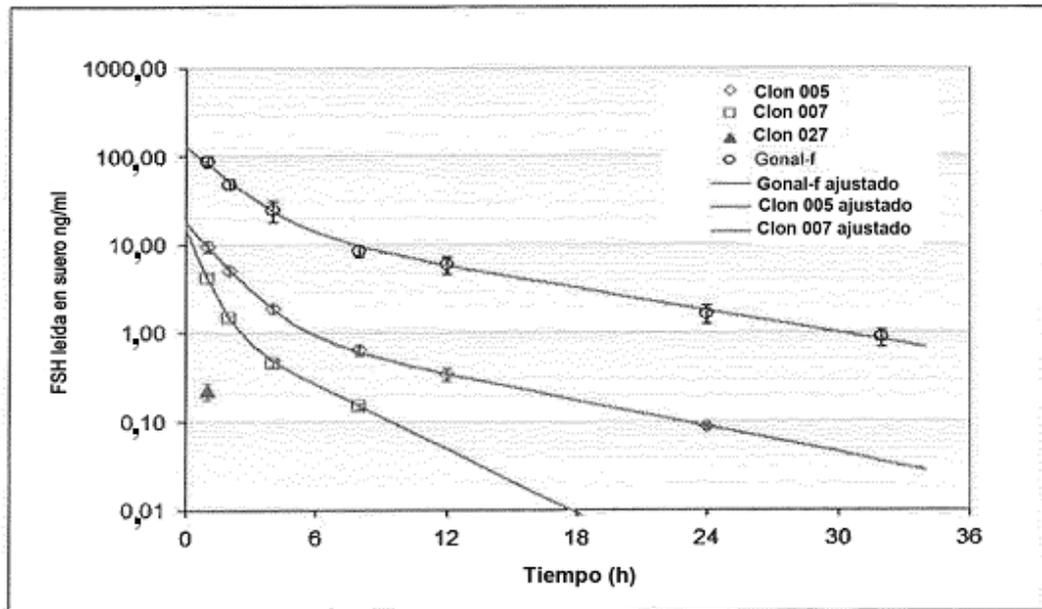


Figura 8 Tasas de eliminación metabólica de muestras de Per.C6 FSH modificadas por ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa. Se inyectaron ratas hembra (3 animales por clon) en la vena de la cola en el tiempo cero con un bolo de rFSH (1 - 10 μ g/rata). Las muestras de sangre recogidas a lo largo del tiempo se sometieron a ensayo para contenido de FSH mediante ELISA.

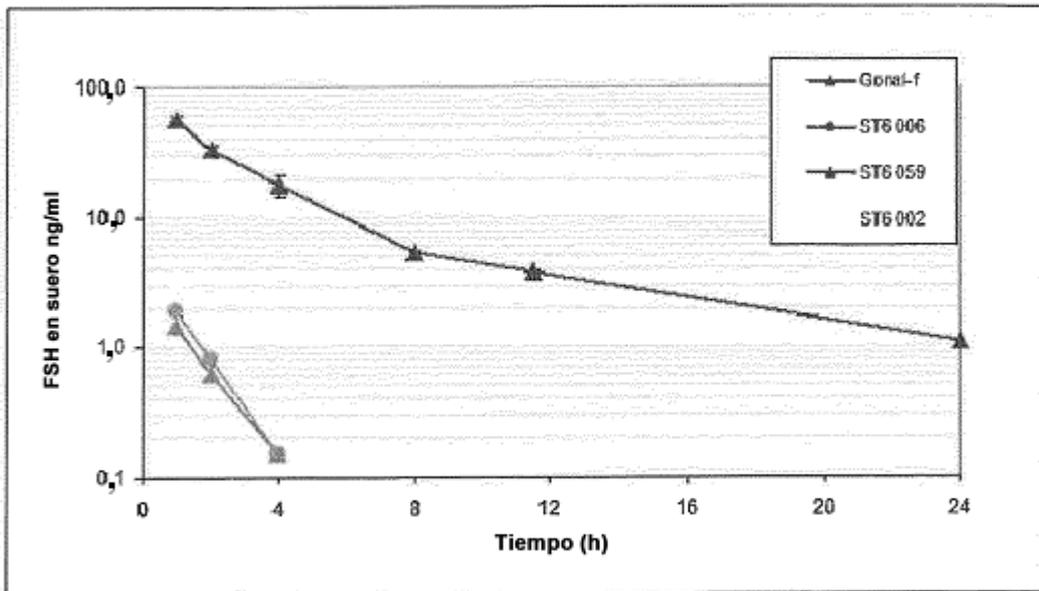


Figura 9 Tasas de eliminación metabólica de muestras de Per.C6 FSH modificadas por ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa con co administración de un exceso molar de 7500 veces de asialofetuina para saturar el ASGP-R durante 1-2 h.

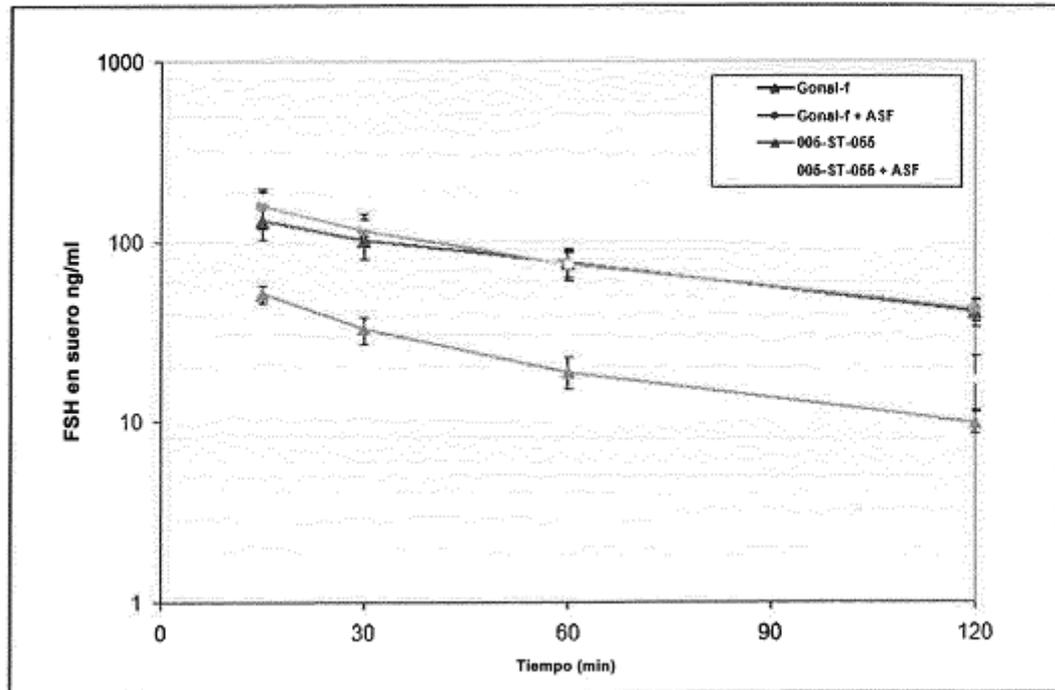


Figura 10 Tasas de eliminación metabólica de muestras de Per.C6 FSH modificadas por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa. Las muestras se eligieron por su contenido de ácido siálico basándose en su perfil de IEF.

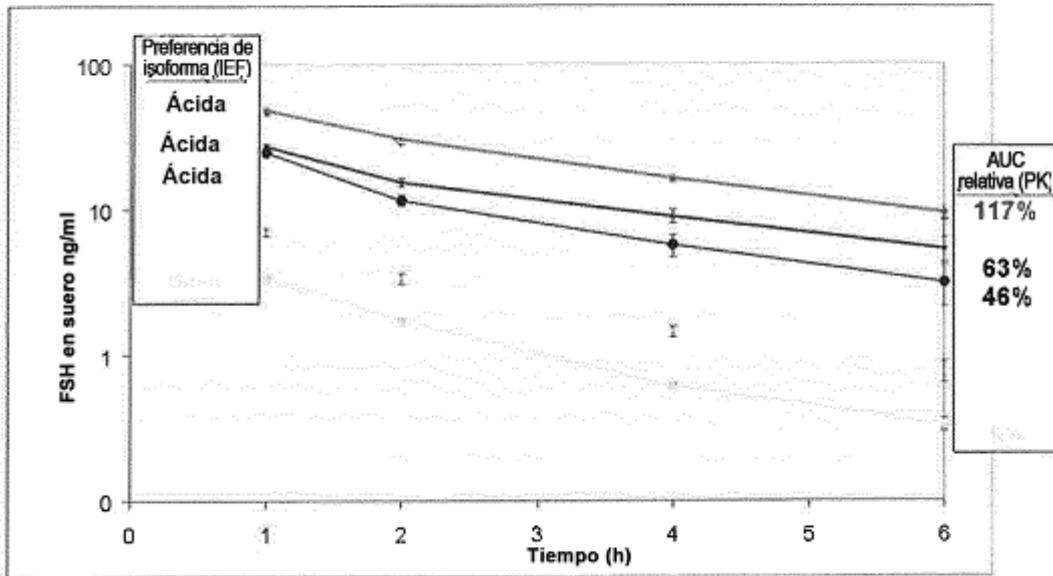


Figura 11 Aumento del peso ovárico de acuerdo con el método de Steelman y Pohley (1953). Per.C6 rFSH y patrones (rFSH Gonal-f) se sometieron a ensayo a diferentes dosis (3 ratas/dosis).

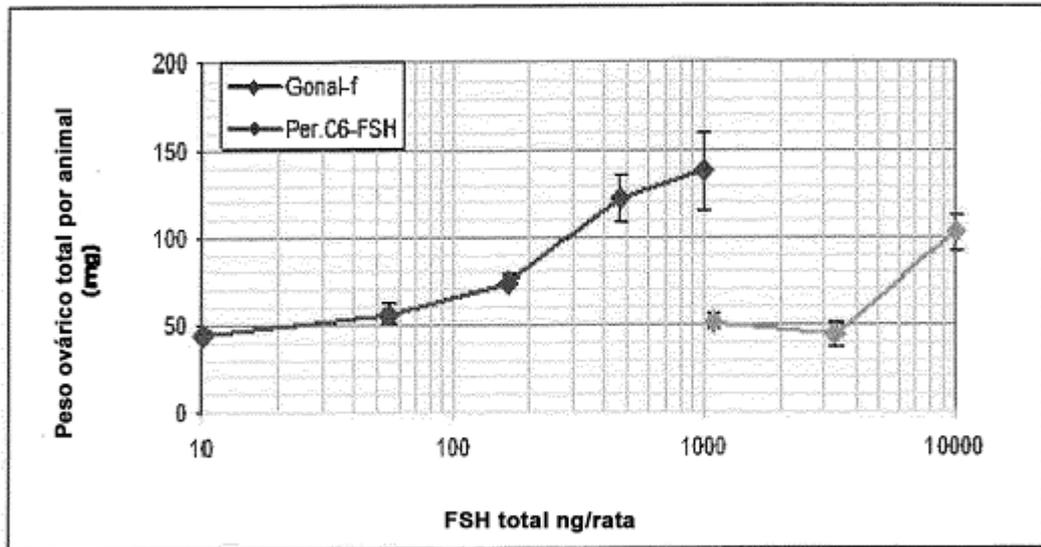


Figura 12 Aumento del peso ovárico de acuerdo con el método de Steelman y Pohley (1953). Per.C6 rFSH modificada por ingeniería con α 2,6-sialiltransferasa y patrones (rFSH Gonal-f) se sometieron a ensayo a diferentes dosis (3 ratas/dosis).

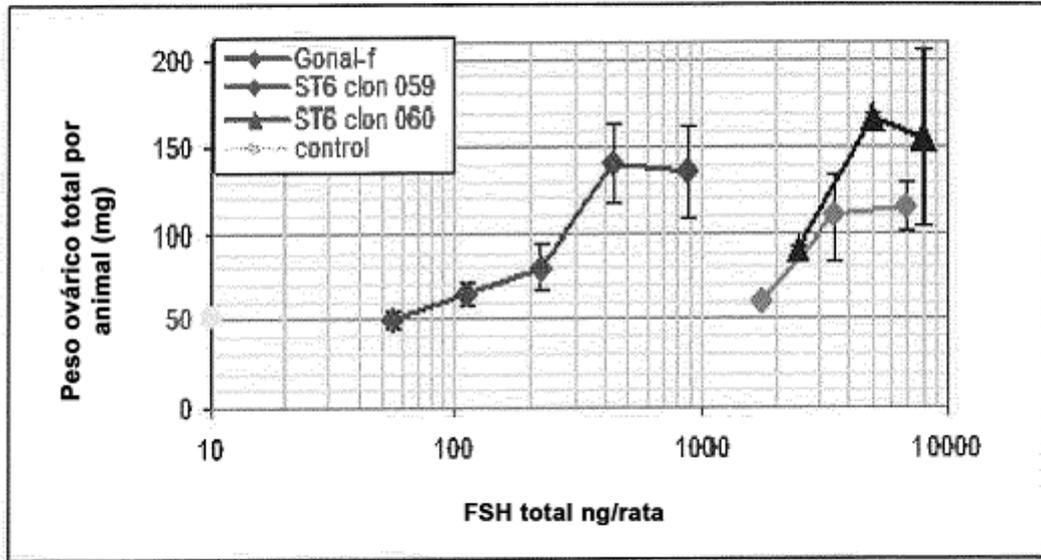


Figura 13 Aumento del peso ovárico de acuerdo con el método de Steelman y Pohley (1953). Per.C6 rFSH precursora, Per.C6 rFSH modificada por ingeniería con α 2,3-sialiltransferasa y patrones (rFSH Gonal-f) se sometieron a ensayo a cinco dosis diferentes (3 ratas/dosis).

