(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 673 317**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/59	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)
C12N 15/62	(2006.01)
C12N 15/16	(2006.01)
A61K 38/24	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2013 PCT/CN2013/087676**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14079384**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2013 E 13856451 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2924049**

(54) Título: **Proteína de fusión de hormona trófica, método de preparación y aplicación de la misma**

(30) Prioridad:

22.11.2012 CN 201210476665

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2018

(73) Titular/es:

Suzhou Alphamab Co., Ltd (100.0%)
Bldg C23, Biobay, 218 Xinghu Street,
Suzhou Industrial Park
Suzhou, Jiangsu 215125, CN

(72) Inventor/es:

XU, TING;
GUO, KANGPING y
YUN, LIHONG

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 673 317 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

Proteína de fusión de hormona trófica, método de preparación y aplicación de la misma

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a una proteína de fusión. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a una proteína de fusión de hormona trófica, a un método para su preparación y a su uso.

Antecedentes de la invención

Las hormonas tróficas incluyen hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona adrenocorticotrópica y gonadotropinas. Las gonadotropinas constituyen un tipo de hormonas glucoproteicas que regulan el desarrollo gonadal de los vertebrados y promueven la producción y secreción de hormonas gonadales. Por ejemplo, la hormona luteotrópica (LH) o la hormona estimulante del folículo (FSH), secretadas por la pituitaria anterior, pueden funcionar sinérgicamente para estimular el desarrollo de células germinales ováricas y testiculares y la producción y secreción de hormonas gonadales; y la gonadotropina coriónica humana (HCG), secretada por la placenta humana, puede estimular la secreción de progesterona desde el cuerpo lúteo durante el embarazo.

Las gonadotropinas (p.ej.,_LH, FSH, y HCG) y las hormonas estimulantes de la tiroides constituyen colectivamente una familia de glucoproteínas y cada una de ellas consiste en una subunidad α y una subunidad β, en las que las subunidades α son idénticas en dichas hormonas, mientras que las subunidades β tienen características específicas para cada hormona y, por tanto, determinan la actividad biológica y la reactividad inmunológica de las hormonas.

Clínicamente, FSH es útil en técnicas de reproducción asistida, como pueda ser la fecundación *in vitro* (FIV), la transferencia intrafalopiana de gametos (GIFT) y la transferencia intrafalopiana de cigoto (ZIFT) para inducir la superovulación en las pacientes. Por otra parte, es posible utilizarla también para las mujeres que padecen de ovulia, incluyendo las pacientes con síndrome ovárico poliquístico que no responden a clomifeno, así como para hombres con hipogonadismo de la glándula pituitaria. LH se suele utilizar en tratamientos complementarios con FSH. hCG se utiliza principalmente para promover la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo. Para los hombres, es posible utilizarla para estimular células de Leydig para que secreten testosterona, para analizar las funciones de células de Leydig y para promover la espermatogénesis, cuando se utilizan en combinación con gonadotropina a largo plazo. TSH suele utilizarse en combinación con I^{131} para inhibir y eliminar el tejido canceroso residual postoperatorio en pacientes con cáncer de tiroides.

Generalmente, se requiere un tratamiento a largo plazo para conseguir un efecto terapéutico. Sin embargo, la pauta posológica de la inyección intramuscular o subcutánea diaria tiene como resultado normalmente una reacción local y molestias. Por lo tanto, sería útil, para una aplicación clínica práctica, desarrollar una gonadotropina y una hormona estimulante de la tiroides de acción prolongada y reducir la frecuencia de administración.

Por ejemplo, puede aislarse FSH de la glándula pituitaria o la orina de mujeres postmenopáusicas (véase, la patente europea EP322.438), y puede producirse también por recombinación (véase, las patentes estadounidenses US5.639.640, US5.156.957, US4.923.805, US4.840.896 y la patente europea EP211.894). Para conseguir un efecto terapéutico, se tarda 8-10 días consecutivos, a veces hasta 21 días, en estimular la foliculogénesis en mujeres; y se tarda hasta 18 meses en inducir la espermatogénesis en hombres con un nivel de gonadotropina bajo. En los últimos años, una serie de patentes y publicaciones han notificado el desarrollo de FSH de acción prolongada, cuya estrategia fundamental es aumentar la semivida aumentando los sitios de glucosilación en FSH. Una de las formas consiste en aumentar los sitios de modificación de glucosilación dentro de la molécula de FSH. En la patente internacional WO01/58493, se divulgan 77 mutaciones que se pueden realizar en la subunidad α de FSH y 51 mutaciones que se pueden realizar en la subunidad β de FSH. Sin embargo, en dicha patente no se divulga la producción o la medición de ninguna subunidad α o β de FSH, en la que se introduzca un sitio(s) de glucosilación por mutagénesis dirigida a sitio. En la patente estadounidense US7.740.862, se divulga la inserción de la secuencia GNFT o GNRT entre los restos de aminoácido 3 y 4 de la subunidad α de FSH, lo cual tiene como resultado una semivida *in vivo* de aproximadamente 17 horas en ratas y la capacidad de estimular *in vitro* células CHO que expresan receptores de FSH por recombinación para producir adenosin monofosfato cíclico (cAMP) de manera comparable a la de FSH nativa. Otra forma consiste en aumentar los sitios de modificación de glucosilación añadiendo secuencias adicionales al extremo de la secuencia. Uno de los productos relativamente logrados desarrollados hasta ahora es Elonva, distribuido en el mercado por Merck, Alemania, en 2010. Este análogo tiene una actividad biológica comparable a la de FSH natural, pero una semivida en circulación más prolongada, que es de aproximadamente 69 h en el ser humano. La secuencia de proteína específica se describe en las patentes estadounidenses US5.338.835 y US5.585.345. Contiene la subunidad β de FSH modificada, cuyo glutamato C-terminal se extiende con el grupo péptido carboxi terminal (CTP) de hCG. Los resultados experimentales de Pieter Verbost, *et al.* demostraron que este análogo tenía una semivida *in vivo* de 17,3 horas y 46,9 horas en ratas y perros, respectivamente, lo cual aumentaba 1,5-2 veces más en comparación con la de FSH recombinante. Signe Perlman, *et al.,* notificaron una subunidad α de FSH modificada con la secuencia de aminoácidos "ANITVNITV" añadida al terminal N. Este análogo tuvo una semivida *in vivo* de 22 horas en ratas, lo cual aumentaba 3-4 veces

más en comparación con la de FSH recombinante.

La inmunoglobulina IgG es una de las proteínas más abundantes en la sangre humana, con una semivida de hasta 21 días. Su estabilidad se debe al hecho de que el fragmento Fc de la IgG puede unirse al receptor de Fc neonatal (FcRn) en virtud de lo cual se evita que IgG entre en los lisosomas y se degrade en ellos (5-7). Por lo tanto, el fragmento Fc de IgG se utiliza para ligar una proteína activa para formar una proteína de fusión, aumentando así la semivida *in vivo* de la proteína activa y, por lo tanto, consiguiendo un efecto de acción prolongada. Sobre la base de la longitud de las regiones bisagra y las diferentes secuencias de aminoácidos de los fragmentos Fc, la IgG humana puede dividirse en 4 subtipos, entre los cuales IgG Fcγ2 tiene un efecto de inducción de citotoxicidad relativamente débil e IgG Fcγ1 tiene el efecto más fuerte. Las proteínas de fusión de IgG se construyen en su mayoría ligando el terminal N del fragmento Fc (bisagra-CH2-CH3) o fragmento CH (CH1-bisagra-CH2-CH3) de IgG con el terminal C de la proteína activa para evitar la posible influencia de la construcción de la proteína de fusión sobre la actividad biológica de la proteína activa. Asimismo, las proteínas de fusión de IgG pueden purificarse eficientemente y de forma conveniente por cromatografía de afinidad de proteína A. En consecuencia, varias patentes han notificado que la fusión del fragmento Fc de IgG con otras proteínas puede prolongar significativamente la semivida y aumentar la actividad biológica *in vivo* de la proteína diana (patentes estadounidenses US5.155.027, 5.428.130, 5.480.981 y 5.808.029).

En la patente estadounidense No. 20050.186.662 se divulga que mediante la construcción de homodímeros y heterodímeros de proteína de fusión FSH-Fc se aumentó la semivida *in vivo* en ratas a 60 horas. Tal como se divulga en dicha patente, para evaluar la bioactividad de sus fusiones FSH-Fc, se midió el peso ovárico de las ratas 72 horas después de una única dosis de las fusiones FSH-Fc o FSH recombinante. Los resultados de mostraron que el peso ovárico en el grupo de proteína de fusión FSH-Fc (26,9 μg) había aumentado en comparación con el grupo de FSH recombinante (14,3 μg) (el control negativo: 12,1 μg). Sin embargo, dada la corta semivida de FSH recombinante, generalmente se requiere una dosis diaria en dicho ensayo de actividad. Si se administra una vez cada tres días, de acuerdo con el protocolo, FSH podría metabolizarse sustancialmente sin ninguna actividad. Por lo tanto, mientras que se asegura la semivida de la proteína de fusión FSH-Fc construida, sigue pendiente de mejora la actividad.

Por lo tanto, existe la necesidad médica de contar con un producto que proporcione unos efectos terapéuticos totales de las gonadotropinas o la hormona estimulante de la tiroides y que pueda administrarse con menor frecuencia de los productos de gonadotropina u hormona estimulante de la tiroides. Por otra parte, el producto de acción prolongada puede proporcionar una actividad más consistente en comparación con la actividad de las gonadotropinas y hormonas estimulantes de la tiroides disponible con las terapias que existen. Dumont *et al.* divulga fusiones de Fc monoméricas (Biodrugs, 2006; 20(3), 151-160).

Sumario de la invención

Los autores de la presente divulgación han descubierto inesperadamente a través de un exhaustivo estudio que una proteína de fusión obtenida fusionando una subunidad β de una gonadotropina u hormona estimulante de la tiroides con un fragmento Fc de un anticuerpo y uniendo la subunidad α a la subunidad β a través de una interacción intermolecular entre ellos presenta una semivida más prolongada al mismo tiempo que se mantiene la actividad, lo que ha conducido a la presente invención.

El primer aspecto de la presente divulgación se refiere a una proteína de fusión que comprende una proteína de hormona trófica y un fragmento Fc de un anticuerpo, en la que la subunidad β de la proteína de hormona trófica está unida al fragmento Fc directamente o indirectamente a través de un engarce y la subunidad α de la proteína de hormona trófica se une a la subunidad β a través de las interacciones intermoleculares entre ellas, en la que la subunidad α de la hormona trófica no está unida covalentemente al fragmento Fc y en la que la hormona trófica se selecciona del grupo que consiste en hormona luteotrópica, hormona estimulante del folículo, gonadotropina coriónica y hormona estimulante de la tiroides, preferentemente hormona estimulante del folículo.

Opcionalmente, la proteína de fusión comprende además una proteína activa adicional o etiqueta para facilitar la purificación de la proteína, p.ej., una etiqueta FLAG, una etiqueta histidina, una etiqueta GST, una etiqueta de proteína de unión a maltosa, o similares.

En la presente divulgación, la proteína activa adicional o etiqueta para facilitar la purificación de la proteína se une al terminal N- o C- de la proteína de fusión.

En una realización de la presente divulgación, la proteína de fusión se forma por fusión de la proteína de hormona trófica con el fragmento Fc de un anticuerpo.

En una realización de la presente divulgación, la hormona trófica es una hormona estimulante del folículo (FSH).

En una realización de la presente divulgación, la FSH es FSH humana.
En una realización de la presente divulgación, la secuencia de aminoácidos de la subunidad α de FSH es tal como

se expone en SEQ ID NO: 1.

En una realización de la presente divulgación, la secuencia de aminoácidos de la subunidad β de FSH es tal como se presenta en SEQ ID NO: 4.

En una realización de la presente divulgación, la secuencia de aminoácidos del fragmento Fc de un anticuerpo es tal como se presenta en SEQ ID NO: 7.

En una realización de la presente divulgación, la subunidad β está ligada al fragmento Fc directamente.

En una realización de la presente divulgación, la subunidad β está ligada al fragmento Fc directamente o a través de al menos un engarce (también denominado elemento de unión). El engarce es opcional, que se puede insertar entre la molécula bioactiva y la región constante de inmunoglobulina. Los métodos para diseñar la secuencia del engarce son conocidos dentro de la especialidad. El engarce puede unirse al terminal N- o C- del fragmento Fc. El engarce puede unirse al terminal N- o C de la subunidad β de FSH.

El segundo aspecto de la presente divulgación se refiere a una proteína heterodimérica formada por ensamblaje de una cadena de proteína de fusión de acuerdo con cualquier realización del primer aspecto de la presente divulgación con una cadena de Fc de un anticuerpo, en la que la cadena de Fc de un anticuerpo se asocia al fragmento Fc en la proteína de fusión por asociación química.

En una realización de la presente divulgación, la proteína heterodimérica comprende cadenas de tres péptidos de la siguiente fórmula:

αXXX@(3XXX-L-Fc:Fc,

en la que, "XXX" se refiere a FSH, LH, HCG o TSH; "α" se refiere a subunidad α; "@" representa la correlación entre la cadena de la subunidad α y la cadena de la subunidad β, es decir, la interacción intermolecular; "β" se refiere a subunidad β; "L" representa la unión entre la subunidad β y Fc, es decir, la unión directa o la unión indirecta a través de un engarce; "Fc" se refiere al fragmento Fc de una inmunoglobulina; y los dos puntos (:) se refieren a la asociación química entre la cadena de βXXX-L-Fc y la cadena de Fc en la proteína de fusión.

En una realización de la presente divulgación, la proteína heterodimérica tiene la siguiente fórmula:

Ta-αXXX@βXXX-L-Fc:Fc o Ta-Fc:Fc-L-βXXX@αXXX, preferentemente Ta-αXXX@βXXX-L-Fc:Fc,

en la que, "XXX" se refiere a FSH, LH, HCG o TSH; "α" se refiere a subunidad α; "@" representa la correlación entre la cadena de la subunidad α y la cadena de la subunidad β, es decir, la interacción intermolecular; "β" se refiere a subunidad β; "L" representa la unión entre la subunidad β y Fc, es decir, la unión directa o la unión indirecta a través de un engarce; "Fc" se refiere al fragmento Fc de una inmunoglobulina; los dos puntos (:) se refieren a la asociación química entre la cadena βXXX-L-Fc y la cadena de Fc en la proteína de fusión; y "Ta" se refiere una proteína activa adicional para facilitar la purificación de la proteína heterodimérica, p.ej., una etiqueta FLAG, una etiqueta histidina, una etiqueta GST, o una etiqueta de proteína de unión a maltosa.

En una realización de la presente divulgación, la proteína heterodimérica es una proteína heterodimérica de FSH de la siguiente fórmula:

αFSH@βFSH-L-Fc:Fc

en la que, "αFSH" se refiere a la subunidad α de FSH; "@" representa la correlación entre la cadena de la subunidad α y la cadena de la subunidad β de FSH, es decir, la interacción intermolecular; "βFSH" se refiere a la subunidad β de FSH; "L" representa la unión entre la subunidad β de FSH y Fc, es decir, la unión directa o la unión indirecta a través de un engarce; "Fc" se refiere al fragmento Fc de una inmunoglobulina; y los dos puntos (:) se refieren a la asociación química entre la cadena βFSH-L-Fc y la cadena de Fc en la proteína de fusión.

En una realización de la presente divulgación, la proteína heterodimérica de FSH es tal como se presenta en la Figura 1a.

El tercer aspecto de la presente divulgación se refiere a una proteína homodimérica formando un complejo de dos proteínas de fusión de acuerdo con cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la presente divulgación, en la que los fragmentos Fc de las dos proteínas de fusión se unen entre sí por asociación química.

En una realización de la presente divulgación, la proteína homodimérica tiene la siguiente fórmula:

αXXX@βXXX-L-Fc: αXXX@βXXX-L-Fc,

en las que, "XXX" se refiere a FSH, LH, HCG o TSH; "α" se refiere a subunidad α; "@" representa la correlación entre la cadena de la subunidad α y la cadena de la subunidad β, es decir, la interacción intermolecular; "β" se refiere a subunidad β; "L" representa la unión entre la subunidad β y Fc, es decir, la unión directa o la unión indirecta a través de un engarce; "Fc" se refiere al fragmento Fc de una inmunoglobulina; y los dos puntos (:) se refieren a la asociación química entre las dos proteínas de fusión αXXX@βXXX-L-Fc.

En una realización de la presente divulgación, la proteína homodimérica tiene la siguiente fórmula:

Ta-αXXX@βXXX-L-Fc: Ta-αXXX@βXXX-L-Fc,

en la que, "XXX" se refiere a FSH, LH, HCG o TSH; "α" se refiere a subunidad α; "@" representa la correlación entre la cadena de la subunidad α y la cadena de la subunidad β, es decir, la interacción intermolecular; "β" se refiere a la subunidad β; "L" representa la unión entre la subunidad β y Fc, es decir, la unión directa o la unión indirecta a través de un engarce; "Fc" se refiere al fragmento Fc de una inmunoglobulina; los dos puntos (:) se refieren a la asociación química entre las dos proteínas de fusión αXXX@βXXX-L-Fc; y "Ta" es una proteína activa adicional o una etiqueta para facilitar la purificación de la proteína homodimérica, p.ej., una etiqueta FLAG, una etiqueta histidina, una etiqueta GST o una etiqueta de proteína de unión a maltosa.

En una realización de la presente divulgación, la proteína homodimérica es una proteína homodimérica de FSH de la siguiente fórmula:

αFSH@βFSH-L-Fc: αFSH@βFSH-L-Fc

en la que, "αFSH" se refiere la subunidad α de FSH; "@" representa la correlación entre la cadena de la subunidad α y la cadena de la subunidad β de FSH, es decir, la interacción intermolecular; "βFSH" se refiere a la subunidad β de FSH; "L" representa la unión entre la subunidad β de FSH y Fc, es decir, la unión directa o la unión indirecta a través de un engarce; "Fc" se refiere a el fragmento Fc de una inmunoglobulina; y los dos puntos (:) se refieren a la asociación química entre las dos proteínas de fusión αFSH@βFSH-L-Fc.

En una realización de la presente divulgación, la proteína homodimérica de FSH es tal como se presenta en la Figura 1b.

El cuarto aspecto de la presente divulgación se refiere a una mezcla que comprende la proteína heterodimérica de acuerdo con cualquier realización del segundo aspecto de la presente divulgación y la proteína homodimérica de acuerdo con cualquier realización del tercer aspecto de la presente divulgación.

El quinto aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición que comprende la proteína de fusión de acuerdo con cualquier realización del primer aspecto de la presente divulgación, la proteína de acuerdo con cualquier realización del segundo el tercer aspecto de la presente divulgación, o la mezcla de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente divulgación y, opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización de la presente divulgación, la composición es una composición farmacéutica.

El sexto aspecto de la presente divulgación se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad α de una proteína de hormona trófica, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión formada por la subunidad β de la proteína de hormona trófica y un fragmento Fc de un anticuerpo, y una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento Fc de un anticuerpo, en la que cada una de las cadenas de proteína se transcribe independientemente, y la hormona trófica se selecciona del grupo que consiste en hormona luteotrópica, hormona estimulante del folículo, gonadotropina coriónica y hormona estimulante de la tiroides.

En una realización de la presente divulgación, la hormona trófica es FSH.

En una realización de la presente divulgación, la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad α de la proteína de hormona trófica es tal como se expone en SEQ ID NO: 2.

En una realización de la presente divulgación, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión formada por la subunidad β de la proteína de hormona trófica y el fragmento Fc de un anticuerpo es tal como se expone en SEQ ID NO: 4.

En una realización de la presente divulgación, la secuencia de nucleótidos que codifica el fragmento Fc de un anticuerpo es tal como se expone en SEQ ID NO: 6.

El séptimo aspecto de la presente divulgación se refiere a una célula recombinante que comprende el vector de expresión recombinante de acuerdo con cualquier realización del sexto aspecto de la presente divulgación.

En la presente divulgación, la célula es una célula de expresión eucariota, p.ej., una célula de levadura o una célula de mamífero. En una realización de la presente divulgación, la célula es una célula de mamífero (p.ej., una célula HEK293 o una célula CHO).

La presente divulgación se refiere también a un método para preparar la mezcla de acuerdo con cualquier realización del cuarto aspecto de la presente divulgación, que comprende la etapa expresar una proteína con el vector de expresión recombinante de acuerdo con cualquier realización del sexto aspecto de la presente divulgación o con la célula recombinante de acuerdo con cualquier realización del séptimo aspecto de la presente divulgación.

La presente divulgación se refiere también a un método para preparar un heterodímero de acuerdo con cualquier realización del segundo aspecto de la presente divulgación, que comprende la etapa de aislar y purificar la mezcla de acuerdo con cualquier realización del cuarto aspecto de la presente divulgación para obtener el heterodímero de acuerdo con cualquier realización del segundo aspecto de la presente divulgación.

En una realización de la presente divulgación, el método para la separación y la purificación comprende purificación de afinidad FcRn seguida de cromatografía de aniones fuerte de alta resolución para obtener la proteína heterodimérica con una pureza relativamente alta.

La presente divulgación se refiere también al uso de la proteína de fusión de acuerdo con cualquier realización del primer aspecto, la proteína de acuerdo con cualquier realización del segundo o tercer aspecto, la mezcla de acuerdo con cualquier realización del cuarto aspecto, o la composición de acuerdo con cualquier realización del quinto aspecto de la presente divulgación para preparar una formulación farmacéutica de hormona trófica con una semivida prolongada, en la que la hormona trófica se selecciona del grupo que consiste en hormona luteotrópica, hormona estimulante del folículo, gonadotropina coriónica y hormona estimulante de la tiroides.

En una realización de la presente divulgación, la hormona trófica es FSH.

La presente divulgación se refiere también al uso de la proteína de fusión de acuerdo con cualquier realización del primer aspecto, la proteína de acuerdo con cualquier realización del segundo o tercer aspecto, la mezcla de acuerdo con cualquier realización del cuarto aspecto o la composición de acuerdo con cualquier realización del quinto aspecto de la presente divulgación en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar varias indicaciones asociadas a hormonas tróficas.

La presente divulgación se refiere también a dichas proteínas y composiciones de proteína para su uso en un método para prevenir o tratar varias indicaciones asociadas a hormonas tróficas, que comprende la etapa de administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad eficaz de la proteína de fusión de acuerdo con cualquier realización del primer aspecto, la proteína de acuerdo con cualquier realización del segundo o tercer aspecto, la mezcla de acuerdo con cualquier realización del cuarto aspecto o la composición de acuerdo con cualquier realización del quinto aspecto.

En la presente divulgación, las varias indicaciones asociadas a hormonas tróficas son perfectamente conocidas en la especialidad. Se puede utilizar FSH para proporcionar efectos beneficiosos (p.ej., una mayor fertilidad) a los sujetos que padecen dichas anomalías, curar la anomalía o disgenesia de FSH. Se puede utilizar por ejemplo en combinación con inducción de ovulación o una técnica de reproducción asistida (ART) para estimular la foliculogénesis. Se puede utilizar asimismo para inducir la generación de un solo folículo durante la inducción de ovulación (OI) o la generación de un reducido número de folículos durante la inseminación intrauterina (IUI), para inseminación interna. Además, se puede utilizar también para hiperestimulación ovárica controlada (COH).

HCG se puede utilizar para infertilidad femenina, insuficiencia del cuerpo lúteo, hemorragia uterina funcional, criptorquidismo, hipogonadismo masculino, amenaza de aborto, aborto espontáneo, y similares.

LH se puede utilizar para promover la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo. Para hombres, puede utilizarse para estimular las células de Leydig, para que secreten testosterona, se puede utilizar para analizar las funciones de las células de Leydig y para promover la espermatogénesis cuando se administra a largo plazo.

TSH se puede utilizar para inhibir y eliminar el tejido canceroso residual postoperatorio en pacientes con cáncer de tiroides.

En la presente divulgación, un mamífero es por ejemplo un ser humano, un mono, un ratón, una rata, una oveja, un cerdo, un caballo o similar.

En la presente divulgación, el fragmento Fc de un anticuerpo se refiere a la región constante de una cadena de inmunoglobulina humana, en particular, el extremo carboxilo de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma. Por ejemplo, la región Fc de una inmunoglobulina puede comprender dos o más dominios de cadena pesada CH1, CH2, CH3 y CH4 y, opcionalmente, una región bisagra de inmunoglobulina. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada, las

inmunoglobulinas se pueden dividir en categorías diferentes y principalmente hay 5 clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, algunas de las cuales se dividen además en varias subclases (isotipos), p.ej., IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, IgA-1 y IgA-2. La selección de una región Fc de inmunoglobulina en particular a partir de una clase o subclase específica de inmunoglobulinas entra dentro del conocimiento de las personas especializadas en la materia.

En una realización específica de la presente divulgación, el fragmento Fc de un anticuerpo se refiere al fragmento Fc de una inmunoglobulina humana, que comprende al menos una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 de la inmunoglobulina. Específicamente, puede ser IgG1 Fc.

En la presente divulgación, puede hacerse referencia a las interacciones intermoleculares entre la cadena de la subunidad α y la cadena de la subunidad β, por ejemplo, como interacción iónica, interacción hidrófoba, interacción hidrófila, interacción de van der Waals y unión de hidrógeno.

En la presente divulgación, la asociación química, es decir, (:), es un enlace covalente o un enlace no covalente, p.ej., al menos un enlace no péptido. En ciertas realizaciones, la asociación química es un enlace covalente, p.ej., un enlace disulfuro. En otras realizaciones, la asociación química es un enlace no covalente, p.ej., interacción iónica, interacción hidrófoba, interacción hidrófila, interacción de van der Waals y unión de hidrógeno. En una realización de la presente divulgación en particular, la asociación química se refiere una interacción entre las dos cadenas de Fc.

En la presente divulgación, la subunidad β está unida al fragmento Fc a través de un engarce (denominado también elemento de unión). El engarce es opcional, y se puede insertar entre la molécula bioactiva y la región constante de inmunoglobulina. Los métodos para designar la secuencia del engarce son muy conocidos dentro de la técnica. Se puede unir el engarce al terminal N- o C- del fragmento Fc. Se puede unir el engarce al terminal N- o C- de la subunidad β de FSH.

En los mamíferos de sexo femenino, el principal efecto fisiológico de FSH es estimular el desarrollo de folículos y ovulación. La FSH, tal como se describe en la presente divulgación es preferentemente FSH humana. De acuerdo con la homología de secuencia entre FSH humana y las FSH de otros animales, como por ejemplo murinos, cerdos, ovejas, etc. (véase Figura 2), FSH también tiene una muy alta homología en otros animales. Por lo tanto, la FSH, tal como se describe en el presente documento, también puede ser una FSH de otros animales, como murinos, cerdos, ovejas, etc., La conservación de las hormonas LH, HCG y TSH es similar a la de FSH.

En la presente divulgación, pueden introducirse varias alteraciones en la secuencia de aminoácidos de cada una de las proteínas de la proteína compleja o la secuencia de codificación de ADN de la misma, sin reducir significativamente la actividad, función o efecto de la proteína compleja de la presente divulgación. Los derivados, análogos o mutantes que resultan de dichas alteraciones, así como los usos de dichos derivados, entran dentro del alcance de la presente invención, que ha de interpretarse con referencia a las reivindicaciones.

La proteína de fusión de hormona trófica en relación con la presente divulgación puede purificarse de células hospedadoras a través de experimentos de rutina. Por ejemplo, dado que la proteína de fusión FSH-Fc comprende un Fc, la proteína se puede purificar utilizando Proteína A. Los métodos de purificación incluyen, sin limitarse a ellos, tecnologías de cromatografía, como cromatografía por exclusión de tamaño, intercambio de iones, afinidad y ultrafiltración. Los métodos para aislar y purificar la proteína de fusión en relación con la presente divulgación incluyen también combinaciones apropiadas de los diversos métodos descritos.

La proteína de fusión de hormona trófica comprende Fc, preferentemente Fc de inmunoglobulina humana. En general, El polipéptido de la región CH3 de Fc de la región de inmunoglobulina humana se deriva de una región de Fc de inmunoglobulina humana de tipo silvestre. Fc de inmunoglobulina humana de tipo silvestre se refiere a una secuencia de aminoácidos presente en la población humana y habría de forma natural algunas diferencias en las secuencias de Fc entre un individuo y otro. El Fc de inmunoglobulina humana de la presente invención comprende también ciertas modificaciones de aminoácido de la secuencia de Fc de inmunoglobulina humana de tipo silvestre, p.ej., alteraciones de ciertos aminoácidos en la región Fc, incluyendo, por ejemplo, mutaciones del aminoácido en uno o más sitios de glucosilación, u otras mutaciones silentes y alteraciones de aminoácido que son el resultado de la mutación de acuerdo con el modelo “botón en ojal”.

Las células hospedadoras de mamífero en relación con la presente divulgación incluyen, sin limitarse a ellas, células CHO, 293 y de mieloma. Las células hospedadoras también pueden ser levaduras o células procariotas, como *E. coli.*

En realizaciones específicas de la presente divulgación, se construyó una proteína de fusión FSH-Fc en la que es posible sustituir FSH por LH, TSH, HCG u otra hormona trófica. FSH, junto con la hormona luteotrópica (LH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica humana (HCG) secretadas de la placenta constituyen una familia de glucoproteínas. Consisten todas ellas en la subunidad α y la subunidad β, mientras las subunidades α son iguales para todas las hormonas, las subunidades β tienen características específicas con respecto a cada hormona. Dichas subunidades β tienen una muy alta homología con la subunidad β de FSH (Figura

3), y las interfaces de contacto entre las subunidades α y las subunidades β de los ligandos y sus receptores son similares (las áreas grises en la Figura 3), todas localizadas en los terminales C de la subunidad α y la subunidad β.

De acuerdo con el diseño de la presente divulgación, con el aislamiento de la subunidad α y su unión con la subunidad β a través de interacciones intermoleculares se supera el problema de la pérdida de afinidad tras la unión de una subunidad α con una subunidad β a través de un engarce.

En un aspecto relacionado de la presente divulgación, se utiliza la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de hormona trófica, como por ejemplo, la proteína de fusión FSH-Fc según el presente documento como fármaco para tratar una enfermedad, un trastorno o una afección. En otro aspecto, el polipéptido o composición farmacéutica de la presente invención se utiliza en un método para tratar a un mamífero, en particular, un ser humano, que comprende la administración del polipéptido o composición farmacéutica al mamífero que lo necesita.

Las personas especializadas en la técnica deben apreciar que la cantidad eficaz del polipéptido, formulación farmacéutica o composición de la presente invención depende del tipo de enfermedad, la dosis, la pauta posológica, de si el polipéptido, formulación o composición se administra en solitario o en combinación con otros agentes terapéuticos, de la semivida en suero de la composición y de las condiciones en general del paciente. En general, la cantidad eficaz de la formulación o composición de la presente invención puede asegurar conseguir el efecto terapéutico.

La proteína de fusión de hormona trófica de acuerdo con la presente divulgación puede formularse en una composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo, agente tampón, estabilizante u otro material farmacéuticamente aceptable conocido entre las personas especializadas en la técnica. Dichos materiales no deberán ser tóxicos ni interferirán con la eficacia de los principios activos. Dichos materiales pueden incluir por ejemplo cualquiera o todos entre disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes para retardar la absorción, sustancias fisiológicamente compatibles, entre otros. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser por ejemplo agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, glucosa, glicerol, etanol o similares, o una combinación de los mismos. En algunos casos, la composición farmacéutica puede comprender un agente isotónico, por ejemplo, un azúcar, un poliol, como manitol y sorbitol o, preferentemente, cloruro sódico. Las sustancias farmacéuticamente aceptables pueden ser también humectantes o una pequeña cantidad de sustancias auxiliares, como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o agentes tampón, que aumentan la vida útil o la eficacia del anticuerpo. Las propiedades exactas de los vehículos u otros materiales dependerán de la ruta de administración, que puede ser oral, tópica o por inhalación o inyección, por ejemplo intravenosa. En una realización preferente, se administra la composición farmacéutica por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferente, se administra la composición farmacéutica por inyección intramuscular o subcutánea.

Una composición farmacéutica para administración oral puede presentarse en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido, que puede comprender por ejemplo un excipiente inerte o un vehículo comestible asimilable. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido como gelatina o un adyuvante. Una composición farmacéutica líquida comprende normalmente un vehículo líquido como agua, petróleo, aceite animal o vegetal, aceite mineral o aceite sintético; y puede comprender una solución salina fisiológica, una solución de glucosa u otros sacáridos o un glicol como etilen glicol, propilen glicol o polietilen glicol. Puede encapsularse también un elemento de unión específico (cuando está presente, así como otros ingredientes) en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en un comprimido o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para administración oral, se puede mezclar el principio activo con un excipiente y utilizarse después en la forma de un comprimido absorbible, un comprimido bucal, grajea, cápsula, elixir, suspensión, jarabe, oblea o similar. Para administrar el compuesto de la presente divulgación a través de otras rutas distintas a la administración parenteral, puede ser necesario revestir el compuesto con un material que evite su inactivación o administrar conjuntamente el compuesto y el material.

Para la inyección intravenosa o la inyección en un sitio sensible, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que puede estar desprovista de pirógenos y puede tener un pK, isotonicidad y estabilidad adecuados. Las personas especializadas en la técnica podrán preparar fácilmente una solución adecuada, por ejemplo, utilizando un vehículo isotónico, como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, o solución de Ringer de lactato. Si se desea, puede incluirse un conservante, estabilizante, agente de tampón, antioxidante y/u otros aditivos.

Se puede formular una composición farmacéutica de la presente divulgación en forma de un líquido, semisólido o sólido, por ejemplo una solución líquida (p.ej., una solución para infusión e inyectable), dispersión o suspensión, comprimido, píldora, polvo, liposoma y supositorio. Las formas preferentes dependen de la forma de administración deseada, la aplicación terapéutica, las propiedades físicas y químicas y la manera en que se suministre la molécula. La formulación puede comprender un excipiente o una combinación de excipientes, como por ejemplo, un hidrato de carbono, aminoácido y tensioactivo. Una formulación líquida puede comprender un amplio intervalo de concentración de proteínas y valores de pH. Puede producirse una formulación sólida, por ejemplo, por liofilización, secado por pulverización, o secado por tecnología de fluidos supercrítica.

Las composiciones farmacéuticas serán por lo general estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Puede formularse una composición farmacéutica como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mezclando un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, una composición o una molécula de ácido nucleico aislada de la presente divulgación en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de los ingredientes antes enumerados, según sea apropiado, seguido de la esterilización por filtración. Generalmente, se preparan las dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que puede contener el medio de dispersión básico y otros ingredientes entre los enumerados, según sea apropiado. Para un polvo esterilizado utilizado para preparar una solución inyectable estéril, entre los métodos de preparación preferentes se incluyen secado al vacío y liofilización, que pueden producir un polvo que comprende el principio activo y cualquier ingrediente adicional necesario para una solución filtrada por esterilización previamente. Puede mantenerse una fluidez apropiada por ejemplo utilizando un revestimiento como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y con el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en las composiciones un agente que retarde la absorción, p.ej., sales monoestearato y gelatina.

En ciertas realizaciones, pueden prepararse las composiciones farmacéuticas, tal como se describen en la presente divulgación, con vehículos que protejan el principio activo frente a una liberación rápida, por ejemplo en forma de una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables, biocompatibles, como acetato de etilen vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Están patentados muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones o son conocidos entre las personas especializadas en la técnica de forma general. Véase por ejemplo Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978).

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse en solitario o en combinación con otras terapias, simultáneamente o secuencialmente, dependiendo de la afección tratada.

La composición farmacéutica puede utilizarse en combinación con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden mezclar en la composición farmacéutica como parte de ella, pueden administrarse con el polipéptido por separado y simultáneamente o se pueden utilizar de acuerdo con otros regímenes de tratamiento aceptables. Por otra parte, el polipéptido, la formulación o la composición farmacéutica pueden utilizarse como adyuvante para otros medicamentos.

La gama de tratamientos relacionados con la presente divulgación está asociada a los efectos terapéuticos de las hormonas tróficas. La proteína de fusión, la proteína heterodimérica o la composición farmacéutica que comprende las proteínas citadas de la presente divulgación puede utilizarse para tratar cualquier indicación correspondiente relacionada con hormonas tróficas incluyendo por ejemplo, para reducir la gravedad de cualquier trastorno o patología reproductiva que responda al tratamiento con la composición farmacéutica; para prevenir uno o más de los síntomas asociados a estos trastornos o patologías; para reducir el curso de tratamiento de una anomalía de FSH; para proporcionar a los sujetos que padecen estas anomalías efectos beneficiosos (p.ej., una mayor fertilidad); para curar anomalías de FSH o trastornos relacionados con la reproducción; para estimular foliculogénesis, por ejemplo, cuando se utiliza en combinación con inducción de la ovulación o técnicas de reproducción asistida (ART); para inducir la generación de un único folículo durante la inducción de ovulación (OI) o un reducido número de folículos durante la inseminación intrauterina (IUI) para inseminación interna o para su utilización para hiperestimulación ovárica controlada (COH). La presente divulgación proporciona un método de fusión de FSH-fragmento Fc para aumentar la semivida *in vivo* de la FSH sin pérdida de su actividad *in vivo*. Específicamente, se fusiona una subunidad β de FSH con un fragmento Fc, y se transcribe y se traduce la subunidad α de la FSH por separado aprovechando la asociación entre las subunidades subunidad α- y β de FSH. La presente divulgación proporcionará parte o todos los efectos asociados al tratamiento con FSH, puede administrarse con menor frecuencia que los productos de FSH existentes y puede proporcionar una actividad de FSH más estable en comparación con la que se puede conseguir con las terapias existentes.

La gama de tratamientos relacionados con la presente divulgación incluye también el tratamiento de infertilidad femenina, insuficiencia de cuerpo lúteo, hemorragia uterina funcional, criptorquidismo, hipogonadismo masculino, amenaza de aborto, aborto espontáneo y similares, por ejemplo, para promover la ovulación y desarrollo del cuerpo lúteo y para estimular células de Leydig de hombres para que secreten testosterona, para analizar las funciones de células de Leydig y para promover la espermatogénesis cuando se administran a largo plazo. La gama de tratamientos relacionados con la presente divulgación también incluye la inhibición y eliminación de tejido canceroso residual postoperatorio en pacientes con cáncer de tiroides.

Efectos beneficiosos

En comparación con la patente US20050186662, en la presente divulgación, se aísla la subunidad α de gonadotropina o la hormona estimulante de la tiroides y se une a la subunidad β a través de interacciones intermoleculares entre ellas, de manera que la gonadotropina o la hormona estimulante de la tiroides pueden unirse

a sus receptores correspondientes normalmente, reteniendo así la actividad *in vivo* de las mismas en gran medida al mismo tiempo que aumenta su semivida *in vivo.*

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático en el que se ilustra un heterodímero de proteína de fusión FSH-Fc y un homodímero de proteína de fusión FSH-Fc.

La Figura 2 presenta un alineamiento de secuencia múltiple de FSHα (panel A) y FSHβ (panel B) derivado de diferentes especies. Las secuencias se obtienen del NCBI GenBank. Humano (V00518, NM000510, NM000894), ganado bovino (X00050, M14853, M10077), ovino (X16977, X15493, X52488), porcino (D00768, AF134151, D00579), rata (V01252, M36804, D00576) y ratones (J00643, NM00804, AF33067).

La Figura 3 presenta un alineamiento de secuencia múltiple entre cadenas β de FSH, CG, LH y TSH humanas, en las que están resaltados en gris los aminoácidos enterrados y las regiones de unión receptor-ligando de FSHβ.

La Figura 4 ilustra un plásmido recombinante para homodímero FSH-Fc.

Figura 5 ilustra un plásmido recombinante para heterodímero FSH-Fc/Fc.

La Figura 6 ilustra electroforetogramas SDS-PAGE de un homodímero FSH-Fc y un heterodímero FSH-Fc/Fc tras una purificación en una etapa. A: electroforetograma SDS-PAGE del homodímero FSH-Fc; B: electroforetograma SDS-PAGE del heterodímero FSH-Fc/Fc.

La Figura 7 es un gráfico en el que se muestra la curva de concentración-tiempo de FSH-Fc/Fc en suero de ratas SD que reciben una única dosis subcutánea de 30 µg/kg de un heterodímero FSH-Fc/Fc.

La Figura 8 es un electroforetograma SDS-PAGE de reducción de FSH-Fc/Fc sujeto a transferencia de western.

La Figura 9 es un electroforetograma SDS-PAGE de heterodímero FSH-Fc/Fc finamente purificado.

La Figura 10 ilustra la comparación de curvas de relación dosis-efecto entre un heterodímero FSH-Fc/Fc y Gonal-F- el nivel de cAMP producido por mediación de FSHR exógena tras la estimulación *in vitro*.

La Figura 11 ilustra la comparación de curvas de concentración tiempo de FSH-Fc/Fc en suero de ratas SD que reciben una sola dosis subcutánea de 38 µg/kg de heterodímero FSH-Fc/Fc y los de FSH en suero de ratas SD que reciben una única dosis subcutánea de 3,8 µg/kg de Gonal-F.

La Figura 12 es un gráfico en el que se muestran las curvas de concentración-tiempo de FSH-Fc/Fc en suero de monos cinomolgos después de (A) una única dosis subcutánea de 3,8 y 38 µg/kg del heterodímero FSH-Fc/Fc y (B) una sola dosis intravenosa de 38 µg/kg del heterodímero FSH-Fc/Fc. Cada curva corresponde a un mono.

La Figura 13 es un gráfico en el que se muestran las curvas de peso ovárico-dosis de ratas SD hembra de 21 días de vida que recibieron una sola dosis subcutánea del heterodímero FSH-Fc/Fc y que recibieron Gonal-F dos veces al día. Se pesaron los ovarios 72 horas después de la administración.

La Figura 14 (A) es un histograma en el que se muestra el número de ovocitos en ratas SD hembra de 26 días de vida que recibieron una sola dosis subcutánea a una dosis de 3 pmoles del heterodímero FSH-Fc/Fc, y de Gonal-F dos veces al día (Nx) y una vez (1x) al día; (B) es un histograma en el que se muestra el número de ovocitos frente a la dosis en ratas SD hembra de 26 días de vida que recibieron una sola dosis subcutánea del heterodímero FSH-Fc/Fc. Se inyectó hCG 72 horas después de la administración y 24 horas después, se llevó a cabo el recuento de folículos.

Descripción detallada de la invención

A continuación, se describirán realizaciones de la presente divulgación haciendo referencia a los ejemplos. Sin embargo, las personas especializadas en la técnica podrán apreciar que los ejemplos que se exponen a continuación sirven para ilustrar la presente invención únicamente y no deberá interpretarse que limitan el alcance de la invención. Los ejemplos en los que no se especifican unas condiciones concretas se llevaron a cabo de acuerdo con las condiciones convencionales o según las condiciones recomendadas por el fabricante. Todos los reactivos o instrumentos en los que no se especifican los fabricantes son productos convencionales o están disponibles en el mercado.

Ejemplo 1. Construcción de plásmidos para homodímero FSH-Fc y heterodímero FSH-Fc/Fc

1. Construcción del plásmido para homodímero FSH-Fc

Modificación de vector de expresión de célula de mamífero comercial pcDNA4/myc-HisA. El vector comercial pcDNA4/myc-HisA (Invitrogen, V863-20) comprende dos sitios de restricción *Pvu* II, localizados a aproximadamente 1.411 pb y 3.160 pb, respectivamente. Se sometió el plásmido a mutagénesis dirigida a sitio, de manera que mutó la base localizada a 3.106 pb de C a G para eliminar el sitio de restricción *Pvu* II en esta posición, reteniendo solamente un sitio de restricción en aproximadamente 1.411pb. El nuevo vector fue designado pcDNA4m.

De acuerdo con la secuencia de genes de la subunidad α de FSH humana (Genebank No. NP_000726.1) sacada del Genebank, se añadieron los sitios de restricción *Hind* III y *EcoR*I correspondientes a ambos extremos del gen para sintetizar el gen que codifica FSHα-proteína humana. Se subclonó el gen FSHα sintetizado en el vector pcDNA4m modificado por doble digestión con *Hind* III y *EcoR* I, ambos adquiridos de Takara. Se verificó el plásmido así construido por secuenciación y se designó el ADN de plásmido recombinante pcDNA4m-FSHα.

La secuencia de FSHα humana se expone en SEQ ID NO: 1, la secuencia del péptido de señal se expone en SEQ ID NO: 2, y la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia FSHα se expone en SEQ ID NO: 3.

De acuerdo con la secuencia génica de subunidad β de FSH humana (Genebank No. NP_000501.1) sacada del Genebank y la secuencia génica del fragmento Fc de IgG1 humana (bisagra-CH2-CH3), se sintetizó el gen que codifica la proteína de fusión FSHβ-Fc humana. Se añadieron los correspondientes sitios de restricción *Hind* III y *EcoR*I a ambos extremos de la secuencia génica sintetizada. Se subclonó el gen FSHβ-Fc sintetizado en el vector modificado pcDNA4m por digestión doble con *Hind* III y *EcoR*I, ambos adquiridos de Takara. Se verificó el plásmido así construido por secuenciación y se designó el ADN recombinante del plásmido obtenido pcDNA4m-FSHβ-Fc.

La secuencia de proteína de fusión FSHβ-Fc humana se expone en SEQ ID NO: 4, la secuencia del péptido de señal se expone en SEQ ID NO: 5, y la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia FSHβ se expone en SEQ ID NO: 6. La secuencia de aminoácidos del fragmento Fc de IgG1 humana se expone en SEQ ID NO: 7, y la secuencia de nucleótidos codificante se expone en SEQ ID NO: 8.

Se digirió doblemente el vector de expresión de gen único pcDNA4m-FSHα construido con éxito en el paso anterior con *Bgl* II y *Pvu* II, ambos adquiridos de Takara. Se separaron los productos de digestión y se purificaron por electroforesis con gel de agarosa al 0,8 % y se recuperó el fragmento de ADN de aproximadamente 1,6 kb que comprendía el gen FSHα. Se digirió doblemente pcDNA4m-FSHβ-Fc con *Bgl* II y *Nru* I y se recuperó el fragmento de ADN de aproximadamente 6 kb que comprendía el gen FSHβ-Fc. A continuación, se ligaron los fragmentos de ADN digeridos y se integraron los elementos de expresión de gen exógenos FSHα y FSHβ-Fc en un vector de expresión para obtener el plásmido recombinante pcDNA4m-FSH-Fc, es decir, el plásmido recombinante para el homodímero FSH-Fc (véase Figura 4).

2. Construcción del plásmido para heterodímero FSH-Fc/Fc

Se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando los cebadores designados con pcDNA4m-FSHβ-Fc como matriz para obtener el gen Fc. Se añadió el péptido de señal AnIgG1 (5'METDTLILWRLLLWVPGSTLGSA3') al terminal N del gen con el uso de cebadores de PCR, y se añadieron sitios de restricción *Hind* III y *EcoR* I a ambos extremos del gen, respectivamente. Se subclonó el producto de PCR en el vector pcDNA4m modificado por doble digestión para obtener el plásmido recombinante pcDNA4m-Fc. Se digirió doblemente el plásmido recombinante con *Nru*I y *Pvu*II, ambos adquiridos de Takara. Se separaron los productos de digestión y se purificaron por electroforesis con gel de agarosa al 0,8 % y se recuperó un fragmento de ADN con contenido de Fc de aproximadamente 1,8 kb. Se ligó el fragmento de ADN introduciéndolo en el plásmido pcDNA4m-FSH-Fc que se sometió a digestión simple con *Nru* I y se desfosforiló por CIAP por ligación de extremo romo, para obtener el plásmido recombinante pcDNA4m-FSH mono, es decir, el plásmido recombinante para el heterodímero FSH-Fc/Fc. El mapa de plásmido se muestra en la Figura 5. Se construyeron los genes FSHα, FSHβ-Fc y Fc en el mismo plásmido a una relación molar de 1:1:1, y las proteinasa FSH-Fc y Fc finalmente expresadas estuvieron presentes en tres formas: homodímero FSH-Fc, heterodímero FSH-Fc/Fc y homodímero Fc, con una relación molar teórica de 1:2:1.

Se obtuvieron los plásmidos recombinantes pcDNA4m-FSH-Fc y pcDNA4m-FSH mono en los que se había eliminado la endotoxina utilizando un kit Qiagen Midi de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 2. Expresión y purificación de proteínas homodiméricas FSH-Fc y heterodiméricas FSH-Fc/Fc

1. Expresión transitoria de proteínas homodiméricas FSH-Fc y heterodiméricas FSH-Fc/Fc

Dos días antes de la transfección, se prepararon 500 ml de células HEK293 (ATCC, CRL-1573™) aclimatadas en suspensión para transfección transitoria y se sembraron a una densidad de 0,8 x 10^6 células/ml. Dos días después, se hizo el recuento de las células para su transfección en la suspensión y la densidad de células fue 3,5-4 x 10^6

células/ml. Se centrifugó la suspensión de células a 1000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 100 ml de medio Freestyle293 nuevo y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos otra vez. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron 293 células en 500 ml de medio Freestyle293. Se diluyeron 250 µg de plásmidos mono pcDNA4m-FSH-Fc y 250 µg de pcDNA4m-FSH con 2,5 ml de medio Freestyle293, respectivamente, y se diluyeron 1,5 ml de PEI (polietilenimina) con 5 ml de medio Freestyle293. Se mezclaron uniformemente 2,5 ml de cada plásmido con 2,5 ml de PEI durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron mezclas de plásmido/PEI respectivamente a 250 ml de la suspensión de células y se incubó a 37 ºC bajo CO_2 al 10 % al mismo tiempo que se agitaba a 90 rpm; mientras tanto, se suplementaron 50 µg/l IGF-1 (factor 1 de crecimiento de insulina). Cuatro horas más tarde, se suplementaron 250 ml de medio EX293, 2 mM Glutamina y 50 µg/l IGF-1 respectivamente para incubación a 135 rpm. Al cabo de 24 horas, se añadieron 3,8 mM VPA (valproato de sodio). Tras la incubación durante 5-6 días, se recogieron 500 ml de los sobrenadantes que contenían el homodímero FSH-Fc y el heterodímero FSH-Fc/Fc para purificación.

2. Purificación de proteínas homodiméricas FSH-Fc y las heterodiméricas FSH-Fc/Fc

En primer lugar, se reticuló proteína FcRn murina (receptor neonatal) (Uniprot No.: Q61559) para resina de agarosa activada con NHS (Thermo). Se centrifugó el cultivo celular y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,22 µl y a continuación, se cargó en una columna de FcRn. A continuación, se aclaró la columna con 20 mM PB, 50 mMNaCl, pH 6,2. Finalmente, se eluyó la proteína diana con 20 mM PB, 50 mMNaCl, pH 7,4. Los resultados de SDS-PAGE después de purificación en una etapa se muestran en la Figura 6. La unión de la proteína de fusión Fc tiene lugar a través de enlaces disulfuro entre los Fc. En el caso del gel no reductor, es decir, sin la adición de reductor de DTT (ditiotreitol) concentrado, no se destruyen los enlaces disulfuro que unen los Fc, de manera que la proteína de fusión está presente en forma de un dímero. Las dos subunidades del FSH, es decir, la subunidad α y la subunidad β, se unen a través de un enlace no covalente. En el caso en el que la muestra no se sometió a ebullición y no se utilizó gel no reductor, no se destruyó el enlace no covalente; en cambio en el caso en el que se sometió a ebullición la muestra y se utilizó un gel no reductor, se rompió el enlace no covalente entre las dos subunidades. Por tanto, se llevó a cabo la electroforesis con muestras en ebullición y sin ebullición en las condiciones de reducción y no reducción, respectivamente. Tras la purificación en una etapa, la pureza de la proteína homodimérica FSH-Fc alcanzó más de un 90 %.Las proteínas expresadas desde el plásmido recombinante para el heterodímero FSH-Fc/Fc estuvieron presentes en forma de una mezcla que comprendía el homodímero FSH-Fc, el heterodímero FSH-Fc/Fc y el homodímero Fc en una relación molar de aproximadamente 1:2:1, conforme al resultado teórico esperado (véase Figura 6).

Ejemplo 3. Estudio farmacodinámico *in vivo* preliminar de una mezcla de homodímero FSH-Fc y heterodímero FSH-Fc/Fc en ratas

Se llevó a cabo un estudio farmacodinámico *in vivo* preliminar para la proteína homodimérica FSH-Fc y la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc aislada y preparada en el Ejemplo 2, y se utilizó la ganancia de peso ovárico de la rata como modelo de evaluación. Se administraron por vía subcutánea FSH o moléculas con actividad FSH a ratas hembra inmaduras de 21 días de vida para desencadenar el crecimiento de folículos. Dicho crecimiento se puede detectar fácilmente midiendo el peso ovárico del último estadio. Este método se lleva utilizando décadas para calibrar la actividad de FSH para productos químicos, puede medir los efectos fisiológicos relevantes de FSH y guarda una clara correlación con los comportamientos de productos clínicos.

Se seleccionaron ratas Sprague-Dawley hembra de calidad y sanas de 21 días de vida y se llevaron a cabo los estudios animales *in vivo* en cuanto a la proteína homodimérica FSH-Fc y la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc de acuerdo con el protocolo experimental descrito en el Apéndice 121, volumen II de la Farmacopea china (Edición 2010). Se dividieron las dosis de las muestras en tres grupos: alta, media y baja (2,5 U, 1,25 U y 0,5 U, respectivamente. Se administró el control Gonal-F (adquirido de Serono) (con una actividad específica estimada de 10.000 U/ml) una vez al día, mientras que las muestras de proteína homodimérica FSH-Fc y proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc (ambas con una actividad específica estimada de 1.000 U/µg) una vez solamente. Al cabo de 72 horas, se pesaron los ovarios y se realizó el cálculo según el programa "NIFDC Pharmacopoeia Bioassay Statistics Program BS2000 Versión.3". Los resultados demostraron que Gonal-F tenía una actividad específica de 11.000 UI/µg, la muestra de proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc tenía una actividad específica de 1.300 UI/µg y la muestra de proteína homodimérica FSH-Fc tenía una actividad específica de 1.000 UI/µg. Los resultados indicaron que en comparación con la administración de Gonal-F una vez al día, durante tres días consecutivos, la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc presentó todavía cierta actividad FSH cuando se administró una vez solamente. De acuerdo con las especificaciones del producto de Gonal-F, la dosis clínica recomendada es 75 UI, de lo que se puede deducir que la dosis clínica de la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc es aproximadamente 17 microgramos, que entra dentro del intervalo de dosis esperada.

Ejemplo 4. Estudio farmacocinético *in vivo* preliminar sobre heterodímero FSH-Fc/Fc en ratas

Se llevó a cabo un estudio farmacocinético *in vivo* sobre la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc activa (véase Ejemplo 2 para los detalles de la preparación de la muestra) en ratas. El protocolo específico fue el siguiente: ratas Sprague-Dawley hembra de aproximadamente 6 semanas de vida recibieron una inyección intravenosa de la

proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc (véase Ejemplo 2 para los detalles de la preparación de la muestra) a una dosis de 30 µg/kg. Se recogió sangre postorbitalmente transcurridas 0, 1, 2, 4, 12, 24, 48, 72, 96, 144 y horas desde la administración con un volumen de recogida de 100 µl cada vez, y se congeló el suero obtenido tras la centrifugación a -80 °C para análisis ELISA. Se llevó a cabo un ensayo ELISA sándwich con un anticuerpo de revestimiento anti-FSH (Fitzgerald Industries, No. catálogo 10-F20A) y anticuerpo de detección anti-Fc acoplado a peroxidasa de rábano rusticano (Lakepharma, No. de catálogo 203150), y en la Figura 7 se muestran los resultados. La semivida de la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc fue 30-40 horas, mientras que la semivida *in vivo* de Gonal-F administrado por vía intravenosa fue aproximadamente 5 h en ratas, lo que indica que el heterodímero FSH-Fc/Fc tiene una semivida más prolongada que Gonal-F; concretamente, su semivida es 6-8 veces más prolongada que la de Gonal-F.

Ejemplo 5. Obtención de una línea celular estable de expresión superior de heterodímero FSH-Fc/Fc

De acuerdo con los resultados de experimentos previos, la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc tuvo una actividad FSH decente y presentó una semivida *in vivo* de aproximadamente 30-40 horas en ratas, más de 3 veces más que la del control Gonal-F, y por tanto tiene potencial para su aplicación clínica. Por consiguiente, se realizaron tentativas para obtener una línea celular que expresara establemente el heterodímero FSH-Fc/Fc para un posterior desarrollo del proceso y comercialización. El protocolo específico para obtener una línea celular estable es la siguiente: se sembraron células HEK293 (ATCC, CRL-1573™) en fase de crecimiento logarítmico en una placa de 24 pocillos de 1 x 10^5 células pocillo y se cultivaron en un medio completo (DMEM que contenía 10 % de suero bovino fetal) durante 24 horas, de manera que las células alcanzaron una confluencia de 75-85 % al día siguiente. Se transfirió el plásmido recombinante con pcDNA4m-FSH utilizando reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen, P/N52887). Al cabo de 5 horas de la transfección, se hizo el intercambio de medio y se añadieron 400 µl de medio completo por pocillo. Al cabo de 24 horas, se pasaron las células en una relación de 1:5 en un disco de cultivo de células que contenía 10 ml de medio completo nuevo. Transcurridas 24 horas, se reemplazó el medio por medio de selección (el medio completo que contenía 200 µg/ml de zeocina) y se cambió el medio de selección cada 3-4 días. Al cabo de 4-6 semanas, se recogieron clones únicos y se pasaron a una placa de 24 pocillos. Se llevó a cabo el tamizaje monoclonal cuando las células alcanzaron 80-100 % de confluencia, al cabo de aproximadamente 4-5 días. La estrategia para el tamizaje monoclonal fue la siguiente: se utilizó un equipo de detección ELISA Fc para la primera ronda de detección y se exploraron un total de 309 clones. De acuerdo con los resultados de ELISA y teniendo en cuenta el tamaño de colonia, se seleccionaron 102 clones que tenían un nivel relativamente alto de expresión Fc y se pasaron a una placa de 6 pocillos. Se utilizó un kit FSH ELISA (DRG, E1A-1288) para medir el nivel de expresión de FSH para seleccionar clones positivos. Se seleccionaron clones que tenían un nivel relativamente alto de expresión de FSH para electroforesis SDS-PAGE sin reducción.

Tal como se ha mencionado antes, se construyeron los genes FSHα, FSHβ-Fc y Fc en el plásmido mono pcDNA4m-FSHFc en una relación molar de 1:1:1, y las proteínas FSH-Fc y Fc expresadas finalmente estuvieron presentes en tres formas: homodímero FSH-Fc, heterodímero FSH-Fc/Fc y homodímero Fc, generalmente con una relación molar de 1:2:1. El producto diana final de la invención es la proteína FSH-Fc/Fc que tiene una actividad FSH y una semivida *in vivo* 3-4 veces más prolongada que la FSH en ratas. Por otra parte, en lo que respecta al proceso de purificación de proteína posterior, la separación de la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc de la proteína homodimérica Fc es mucho más fácil que desde la proteína homodimérica FSH-Fc. Por lo tanto, los criterios de tamizaje evaluados por electroforesis de proteína fueron que la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc es dominante mientras está presente un mínimo de homodímero FSH-Fc. El electroforetograma SDS-PAGE no reductor de parte de los clones finalmente seleccionados se presenta en la Figura 8. De acuerdo con el perfil electroforético, se seleccionaron los clones de las calles 2, 3, 6 y 9 para subclonación y desarrollo del proceso de purificación. Conviene mencionar que para el clon de la calle 6, el producto de expresión estuvo presente sustancialmente en forma del heterodímero FSH-Fc/Fc, y la cantidad de proteínas homodiméricas FSH-Fc fue muy reducida, lo cual hizo que el desarrollo del proceso de purificación de proteína posterior fuera bastante simple. Se mantuvieron los clones en las calles 2, 3, 6 y 9 como líneas celulares: se recogió un clon de la placa de 6 pocillos, y se expandió en un matraz en agitación de 125 ml. Cuando la densidad de células fue 2-3 x 10^6 células/ml y la viabilidad de célula fue más de un 90 %, se centrifugó el cultivo y se añadió medio completo y 7,5% DMSO (sulfóxido de dimetilo) a un aglomerado de células y se mezcló uniformemente por pipeteado moderado para obtener una densidad de células de 1 x 10^7 células/ml. Se repartió en partes alícuotas la suspensión de células en tubos Cryo de 1 ml/tubo.

Ejemplo 6. Expresión y purificación de la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc

Se expandieron las líneas celulares estables en un matraz de cultivo celular T75 y se transfirieron a un matraz en agitación para la suspensión del cultivo en medio CD Opti CHO (Invitrogen, No. de catálogo 81-011), después de que las células alcanzaran una confluencia de aproximadamente 90 %. Después de 3 semanas de aclimatación, las células crecieron normalmente, es decir, se completó la aclimatación. Se expandieron las células completamente aclimatizadas a 1 l y se recogió el sobrenadante del cultivo. Dado que se co-expresaron FSHα, FSHβ-Fc y Fc, la solución recogida finalmente comprendió una mezcla del homodímero FSH-Fc, heterodímero FSH-Fc/Fc y homodímero Fc.

Se llevó a cabo la purificación preliminar por cromatografía de afinidad de FcRn, tal como se ha descrito en el

Ejemplo 2. Tras la elución, se extrajeron una pequeña cantidad del homodímero FSH-Fc residual y todos los homodímeros Fc según Source Q (GE healthcare, No. de catálogo17-0947-20). Se trató primero la columna de cromatografía Source Q con una solución de regeneración (10 mM Tris, 1 mM NaCl, pH 8,0) y una solución de equilibrio (10 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0). Se ajustó la muestra eluida con RcRn a un pH 8,0 y a continuación, se cargó directamente en la columna. Se reequilibró la columna con la solución en equilibrio para eliminar el homodímero Fc residual y se eluyó el heterodímero FSH-Fc/Fc con una solución de elución (10 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8,0). Finalmente, se aclaró la columna con una solución de regeneración para eliminar el homodímero FSH-Fc residual. Tras la cromatografía de afinidad de FcRn y la cromatografía de intercambio de iones Source Q, el heterodímero FSH-Fc/Fc tenía una muy alta pureza y el electroforetograma SDS-PAGE se muestra en la Figura 9.

Ejemplo 7. Función *in vitro* de heterodímero FSH-Fc/Fc

Se llevó a cabo un ensayo de la actividad biológica *in vitro* para el heterodímero purificado FSH-Fc/Fc aislado y preparado en el Ejemplo 6, para determinar la capacidad del heterodímero FSH-Fc/Fc de estimular células CHO que expresan recombinantemente receptores de FSH humana para producir adenosina monofosfato cíclico (cAMP). Se mantuvieron las células CHO- receptor FSH (CHO-FSHR) en medio de crecimiento FSHR (medio mínimo (DMEM) + 10 % de suero bovino fetal). Se sembraron células CHO-FSHR en una placa de 96 pocillos a 2 x 10^4 células/pocillo, 100 µl/pocillo, se incubó a 37 ºC durante 24 horas antes de la detección y se determinó la actividad cuando las células alcanzaron al menos 70 % de confluencia. Se diluyeron en serie la muestra y el control Gonal F 1:3 desde 67,5 mM en el medio de detección (medio mínimo (DMEM) + 10 % de suero bovino fetal + 0,1 mM IBMX (Sigma, 15879-100µg)). Se extrajo el medio de crecimiento del disco de detección y se añadieron 25 µl de medio de detección. Se recuperó el disco de cultivo y se incubó a 37 ºC durante 15 minutos. Se añadió la muestra de ensayo a los pocillos a 25 µl/pocillo y se mezcló. Una vez recuperado el disco de cultivo e incubado a 37 ºC durante 1 hora, se extrajeron de los pocillos la muestra y el medio. A continuación, se añadieron 25 µl de tampón de lisis normal a cada pocillo y se cubrió el disco de cultivo con una tapa y se agitó durante 5 minutos. Tras la lisis y la incubación durante 5 minutos, se transfirieron 25 µl de lisado celular al disco de cultivo cAMP y se cultivó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron a cada cultivo 25 µl de composición de cAMP-fosfatasa alcalina, seguido de 25 µl de anticuerpo anti-cAMP y se cubrió el disco de cultivo con una tapa y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavó el disco 6 veces con tampón de lavado a 350 µl/pocillo. Después, se añadieron 100 µl de potenciador de sustrato a cada pocillo y se cubrió el disco de cultivo con una tapa y se incubó en la oscuridad a 25 ºC durante 30 minutos. A continuación, se realizó la lectura de cada pocillo en el disco de cultivo durante 1 segundo, en la que los pocillos con una baja concentración de cAMP presentaron señales altas. y los pocillos con concentración alta de cAMP presentaron señales bajas. Las curvas de relación dosis-efecto de la muestra de heterodímero FSH-Fc/Fc y el control Gonal-F se muestran en la Figura 10. Se calculó la concentración efectiva media (EC_{50}). Los resultados demostraron que la EC_{50} de Gonal F fue 0,1037 nmoles/l y la EC_{50} de FSH-Fc/Fc fue 0,2039 nmoles/l, lo que indica que la actividad biológica *in vitro* de FSH-Fc/Fc fue aproximadamente 50 % de la de Gonal-F.

Ejemplo 8. Estudio farmacocinético *in vivo* para heterodímero FSH-Fc/Fc en ratas

Se llevó a cabo un estudio farmacocinético *in vivo* para el heterodímero FSH-Fc/Fc purificado, aislado y preparado en el Ejemplo 6 en ratas. El protocolo específico fue el siguiente: ratas Sprague-Dawley hembra de aproximadamente 6 semanas de vida recibieron administración subcutánea de las siguientes dosis: 38 µg/kg para la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc; 3,8 µg/kg (equivalente a 50 IU/kg) para el control Gonal-F. Se recogió sangre postorbitalmente 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 144 y 192 horas después de la administración con un volumen de recogida de 100 µl cada vez, y se congeló el suero después de la centrifugación a -80 ºC para análisis ELISA. Se llevó a cabo el ensayo ELISA sándwich con un anticuerpo de revestimiento anti-FSH (Fitzgerald Industries, No. catálogo 10-F20A) y anticuerpo de detección anti-Fc acoplado a peroxidasa de rábano rusticano (Lakepharma, No. catálogo 203150), y los resultados se muestran en la Figura 11. Al comparar con el control Gonal F, la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc alcanzó el máximo con más lentitud y tuvo una semivida más prolongada. La proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc presentó una semivida *in vivo* de aproximadamente 84 horas y un T_{max} de aproximadamente 48 horas en ratas; mientras que Gonal-F presentó una semivida de aproximadamente 7 horas y un T_{max} de aproximadamente 5 horas. Los resultados sugieren que la semivida *in vivo* del heterodímero FSH-Fc/Fc en ratas fue más de 10 veces más prolongada que la de Gonal-F. En vista de los resultados del ensayo farmacocinético preliminar para el heterodímero FSH-Fc/Fc en el Ejemplo 4 (la semivida *in vivo* del heterodímero FSH-Fc/Fc fue aproximadamente 6-8 veces más prolongada que la de Gonal-F en ratas), esto indica que el heterodímero FSH-Fc/Fc así aislado y purificado presentó una semivida *in vivo* significativamente mayor en las ratas.

Ejemplo *9.* Estudio farmacocinético *in vivo* para heterodímero FSH-Fc/Fc en monos cinomolgos

Se llevó a cabo un estudio farmacocinético *in vivo* para el heterodímero FSH-Fc/Fc purificado, aislado y preparado en el Ejemplo 6 en monos cinomolgos. El protocolo específico fue el siguiente: monas cinomolgas hembra de 3-4 años de vida recibieron la administración por las siguientes rutas: inyección subcutánea e intravenosa; las dosis para administración subcutánea: 3,8 µg/kg y 38 µg/kg de la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc; la dosis para inyección intravenosa: 38 µg/kg. Se recogió sangre postorbitalmente al cabo de 0, 2, 8, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 168, 216,

264, 336, 408, 504, 600 y 672 horas de la administración subcutánea, con un volumen de recogida de 100 µl cada vez, y se congeló el suero obtenido tras centrifugación a -80 ºC para análisis ELISA. Se recogió sangre al cabo de 0.25, 1, 4, 8, 24, 48, 96, 120, 168, 216, 264, 336, 408, 504, 600 y 672 horas tras la administración intravenosa y se trató de acuerdo con el método para análisis ELISA antes descrito. Se llevó a cabo el ensayo ELISA sándwich con anticuerpo de revestimiento anti-FSH (Fitzgerald Industries, No catálogo. 10-F20A) y un anticuerpo de detección anti-Fc acoplado a peroxidasa de rábano rusticano (Lakepharma, No. catálogo 203150), y los resultados se muestran en la Figura 12. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos clave según el modelo sin compartimento (NCA) utilizando WinNonlin (V6.2), y los resultados demostraron que la proteína heterodimérica FSH-Fc/Fc presentaba una semi-vida de más de 200 horas en monos cinomolgos cuando se administró por inyección subcutánea. El fármaco se absorbió suficientemente y la biodisponibilidad absoluta promedio (el área bajo la curva para una administración subcutánea desde 0 a 672 horas/ área bajo la curva para administración intravenosa desde 0 a 672 horas (%)) fue próxima a 100 % cuando se inyectó el fármaco por vía subcutánea a 38 µg/kg; dado que el fármaco fue absorbido con relativa rapidez y completamente, no se observó ninguna caída repentina de la concentración del fármaco en plasma al cabo de 28 días tras la administración, lo que señala que no se produjo ningún anticuerpo contra el fármaco al cabo de 28 días tras una inyección subcutánea de una sola dosis; cuando se inyectó el fármaco por vía subcutánea (3,8 – 38 µg/kg) la cantidad de exposición de fármaco en plasma guardó una correlación positiva con la dosis, lo que satisface sustancialmente las características cinéticas lineales.

Ejemplo 10. Estudio farmacocinético *in vivo* para heterodímero FSH-Fc/Fc: ensayo de peso ovárico en ratas

Se llevó a cabo un ensayo de peso ovárico para el heterodímero FSH-Fc/Fc purificado, aislado y preparado en el Ejemplo 6 en ratas. Se seleccionaron ratas Sprague-Dawley hembra, de calidad, sanas de 21 días de vida aproximadamente. Las dosis para las muestras y el control Gonal F fueron 0, 3, 6 y 12 pmoles (equivalente a 0, 1,25, 2,5, y 5 IU para Gonal-F), respectivamente; se administró la muestra solo una vez por vía subcutánea, mientras que el control Gonal-F se administró dos veces al día. Se pesaron los ovarios al cabo de 72 horas y en la Figura 13 se muestran los resultados. Al comparar con el control Gonal-F, dentro del intervalo de dosis de 0 a 6 pmoles (equivalente a 0-2,5 IU para Gonal-F), la misma cantidad molar de la muestra condujo a aumentos comparables en el peso ovárico; y la dosis del heterodímero FSH-Fc/Fc guarda una correlación positiva con el aumento del peso ovárico.

Ejemplo 11. Estudio farmacocinético *in vivo* para el heterodímero FSH-Fc/Fc: ensayo de ovulación en ratas

Se llevó a cabo un estudio del ensayo de ovulación pare el heterodímero FSH-Fc/Fc purificado, aislado y preparado en el Ejemplo 6 en ratas, la relación entre diferentes dosis del heterodímero FSH-Fc/Fc y se investigó el efecto en la ovulación; se compararon también los efectos de la ovulación entre las mismas dosis molares del heterodímero FSH-Fc/Fc y el control Gonal-F. El protocolo específico fue el siguiente: se seleccionaron ratas Sprague-Dawley hembra, de calidad sanas, de 26-28 días de vida aproximadamente. Se administró la muestra por vía subcutánea en dosis de 3, 6, 12 o 24 pmoles solo una vez, mientras que se administró el control Gonal-F en una dosis de 3 pmoles (equivalente a 1,25 IU) dos veces al día (Nx) o solamente una vez (1x). Se administraron 13,3 IU HCG (gonadotropina coriónica humana) al cabo de 72 horas. Se sacrificó a las ratas 24 horas después de la administración de hCG y se llevó a cabo el recuento de ovocitos. Los resultados se compendian en la Figura 14. Cuando la dosis fue 3 pmoles, el número de ovocitos producidos tras la administración por administración del heterodímero FSH-Fc/Fc solamente una vez fue incluso más que la producida tras la estimulación por administración de Gonal-F dos veces al día. El número de ovocitos producido tras la estimulación con el heterodímero FSH-Fc/Fc dependió de la dosis en cierta medida. Cuando la dosis está dentro de 6 pmoles, la dosis del heterodímero FSH-Fc/Fc guardó una correlación positiva con el número de ovocitos y el número de óvulos alcanzó un nivel estable a una dosis de 6 pmoles y disminuyó posteriormente con un aumento de la dosis.

Si bien se han demostrado y descrito las realizaciones específicas de la presente divulgación con detalle, las personas especializadas en la técnica apreciarán que es posible introducir numerosas modificaciones y sustituciones de dichos detalles de acuerdo con las directrices generales divulgadas en el presente documento y todos estos cambios entran dentro del ámbito de la presente invención. Se pretende que el ámbito de la presente invención se defina según las reivindicaciones adjuntas y cualquier equivalente de los mismos según se proporciona en el Artículo 2 del Protocolo sobre la interpretación del Artículo 69 EPC.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SuZhou Alphamab Co., Ltd

<120> Proteína de fusión de hormona trófica, método de preparación y aplicación de la misma

<130> SMK/FP7124795

<140> EP 13856451.3
<141> 22-11-2013

<150> PCT/CN2013/087676
<151> 22-11-2013

<150> CN 201210476665.0
<151> 22-11-2012

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 116
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Tyr His Lys Ser
        115
```

<210> 2
<211> 24
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

Val Phe Leu His Val Leu His Ser
            20
```

<210> 3
<211> 351
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

```
atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctggtca cattgtcggt gtttctgcat      60
gttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca     120
ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcatgg gctgctgctt ctctagagca     180
tatcccactc cactaaggtc caagaagacg atgttggtcc aaaagaacgt cacctcagag     240
tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatgggggg tttcaaagtg     300
gagaaccaca cggcgtgcca ctgcagtact tgttattatc acaaatctta a              351
```

<210> 4
<211> 129
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```
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> 5
<211> 18
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

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

Cys Cys
```

<210> 6
<211> 387
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```
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 tggtatacga aacagtgaga     240

gtgcccggct gtgctcacca tgcagattcc ttgtatacat acccagtggc cacccagtgt     300

cactgtggca agtgtgacag cgacagcact gattgtactg tgcgaggcct ggggcccagc     360

tactgctcct ttggtgaaat gaaagaa                                         387
```

<210> 7
<211> 227
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                   10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30
```

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 8
<211> 681
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

```
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gctccggaac tcctgggcgg accgtcagtc      60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca     120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac     180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac     240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag     300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa     360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag     420
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag     480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc     540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg     600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc     660
ctctccctgt ctccgggtaa a                                               681
```

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende una proteína de hormona trófica y un fragmento Fc de un anticuerpo, en la que la subunidad β de la proteína de hormona trófica está ligada al fragmento Fc directamente o indirectamente a través de un engarce
y la subunidad α de la proteína de hormona trófica se une a la subunidad β a través de interacciones intermoleculares entre la subunidad α- y la subunidad β,
y en la que la subunidad α de la hormona trófica no está covalentemente unida al fragmento Fc,
y en la que la hormona trófica se selecciona del grupo que consiste en hormona luteotrópica, hormona estimulante del folículo, gonadotropina coriónica y hormona estimulante de la tiroides, preferentemente, hormona estimulante del folículo.

2. Una proteína heterodimérica formada por ensamblaje de una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 con una cadena de Fc, en la que la cadena de Fc está asociada al fragmento Fc en la proteína de fusión a través de una asociación química.

3. La proteína heterodimérica de la reivindicación 2, que tiene la fórmula:

αXXX@βXXX-L-Fc:Fc, en la que XXX es una proteína de hormona trófica seleccionada del grupo que consiste en hormona luteotrópica, hormona estimulante del folículo, gonadotropina coriónica y hormona estimulante de la tiroides, preferentemente, hormona estimulante del folículo; α se refiere a subunidad α de la proteína de hormona trófica; @ representa la interacción intermolecular entre la subunidad α y la subunidad β; β se refiere a la subunidad β de la proteína de hormona trófica; L representa la unión entre la subunidad β y Fc; Fc se refiere al fragmento Fc de una inmunoglobulina; y los dos puntos (:) se refieren a la asociación química entre la cadena βXXX-L-Fc y la cadena de Fc en la proteína de fusión.

4. La proteína heterodimérica de la reivindicación 3 que tiene la fórmula:

Ta-αXXX@βXXX-L-Fc:Fc, en la que Ta se refiere a una proteína activa adicional o a una etiqueta para facilitar la purificación de la proteína heterodimérica.

5. La proteína heterodimérica de la reivindicación 3 que tiene la fórmula:

Ta-Fc:Fc-L-βXXX@αXXX, en la que Ta se refiere a una proteína activa adicional o a una etiqueta para facilitar la purificación de la proteína heterodimérica.

6. Una proteína homodimérica formada por ensamblaje de dos proteínas de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los fragmentos Fc en las dos proteínas de fusión están asociados entre sí a través de una asociación química.

7. La proteína homodimérica de la reivindicación 6, que tiene la fórmula:

αXXX@βXXX-L-Fc: αXXX@βXXX-L-Fc, en la que XXX es una proteína de hormona trófica seleccionada del grupo que consiste en hormona luteotrópica, hormona estimulante del folículo, gonadotropina coriónica y hormona estimulante de la tiroides, preferentemente, hormona estimulante del folículo; α se refiere a subunidad α de la proteína de hormona trófica; @ representa la interacción intermolecular entre la subunidad α y la subunidad β; β se refiere a la subunidad β de la proteína de hormona trófica; L representa la unión entre la subunidad β y Fc; Fc se refiere al fragmento Fc de una inmunoglobulina; y los dos puntos (:) se refieren a la asociación química entre las proteínas de fusión αXXX@βXXX-L-Fc.

8. La proteína homodimérica de la reivindicación 7 que tiene la fórmula:

Ta-αXXX@βXXX-L-Fc: Ta-αXXX@βXXX-L-Fc, en la que Ta se refiere a una proteína activa adicional o a una etiqueta para facilitar la purificación de la proteína de fusión.

9. Una mezcla que comprende la proteína heterodimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y la proteína homodimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.

10. Una composición que comprende la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, la proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 o la mezcla de acuerdo con la reivindicación 9 y, opcionalmente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

11. Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad α de una proteína de hormona trófica, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende la subunidad β de la proteína de hormona trófica y un fragmento Fc de un anticuerpo, y una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento Fc de un anticuerpo, en donde cada una de la proteínas se transcribe y se

traduce independientemente y la hormona trófica se selecciona del grupo que consiste en hormona luteotrópica, hormona estimulante del folículo, gonadotropina coriónica y hormona estimulante de la tiroides.

12. Una célula recombinante que comprende el vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 11.

13. Un método para preparar la mezcla de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende la etapa de expresión de una proteína empleando el vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 11 o la célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 12.

14. Un método para preparar la proteína heterodimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, que comprende la etapa de aislamiento y purificación de la mezcla de acuerdo con la reivindicación 9 para obtener la proteína heterodimérica.

15. Uso de la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, la proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, la mezcla de acuerdo con la reivindicación 9 o la composición de acuerdo con la reivindicación 10 para preparar una formulación farmacéutica de hormona trófica con una semivida prolongada, en donde la hormona trófica se selecciona del grupo que consiste en hormona luteotrópica, hormona estimulante del folículo, gonadotropina coriónica y hormona estimulante de la tiroides.

16. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, la proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, la mezcla de acuerdo con la reivindicación 9 o la composición de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en un método de prevención o tratamiento de indicaciones asociadas a hormonas tróficas.

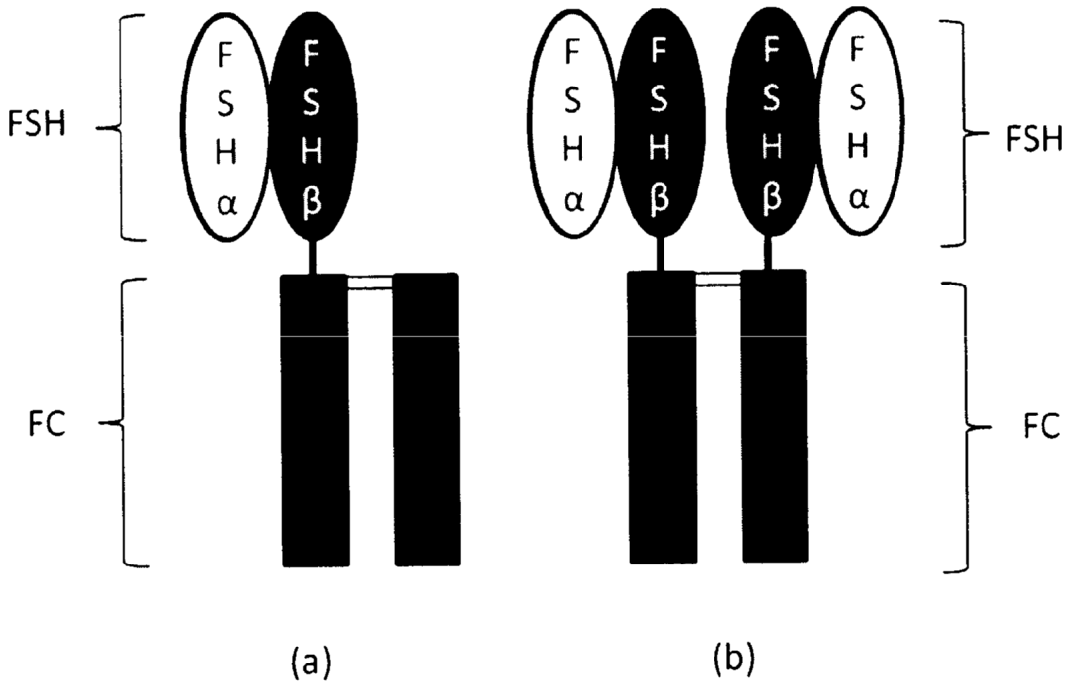


Figura 1

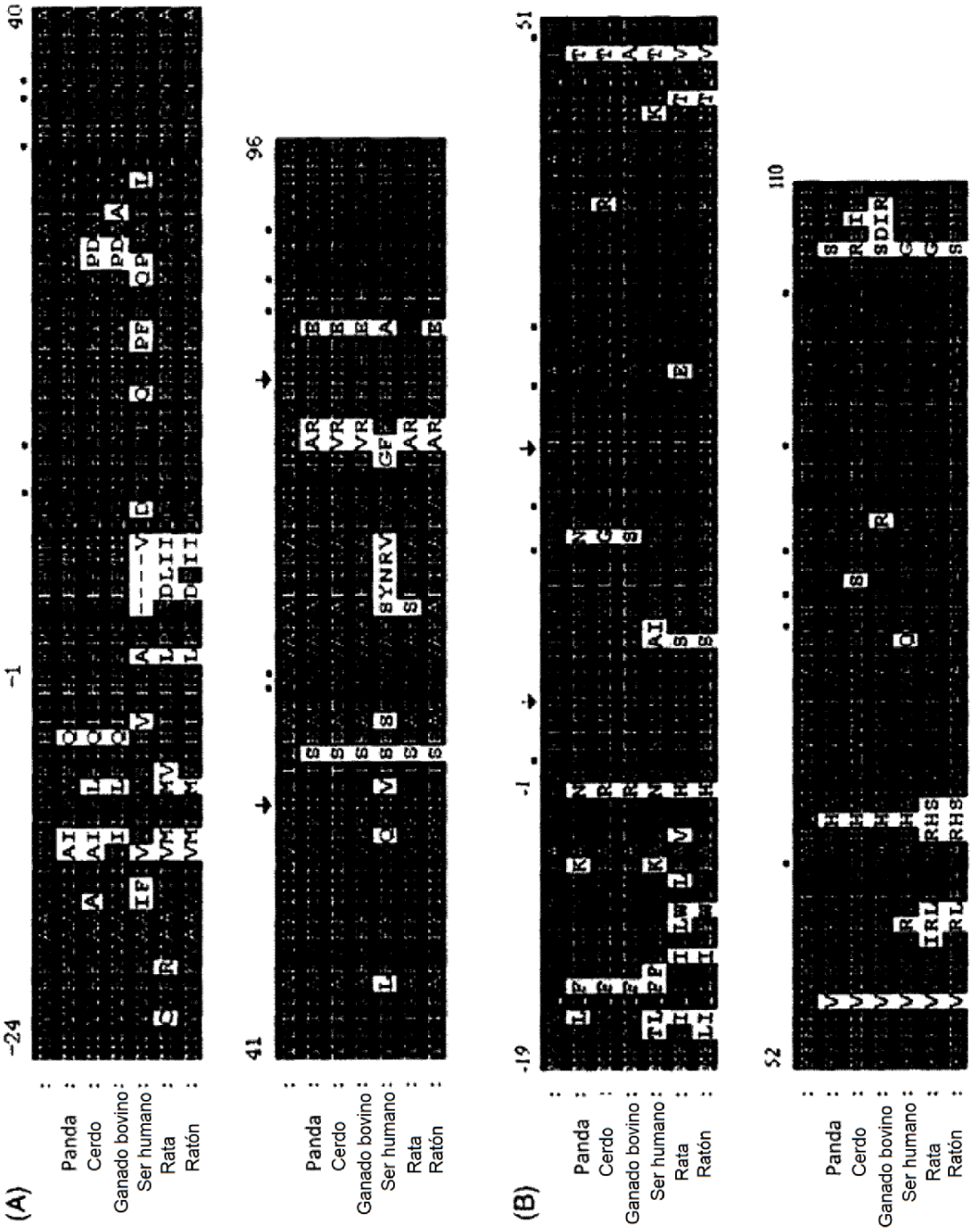

(A)
Panda
Cerdo
Ganado bovino
Ser humano
Rata
Ratón
-24
-1
40
41
96
(B)
-19
-1
51
52
110

Figura 2

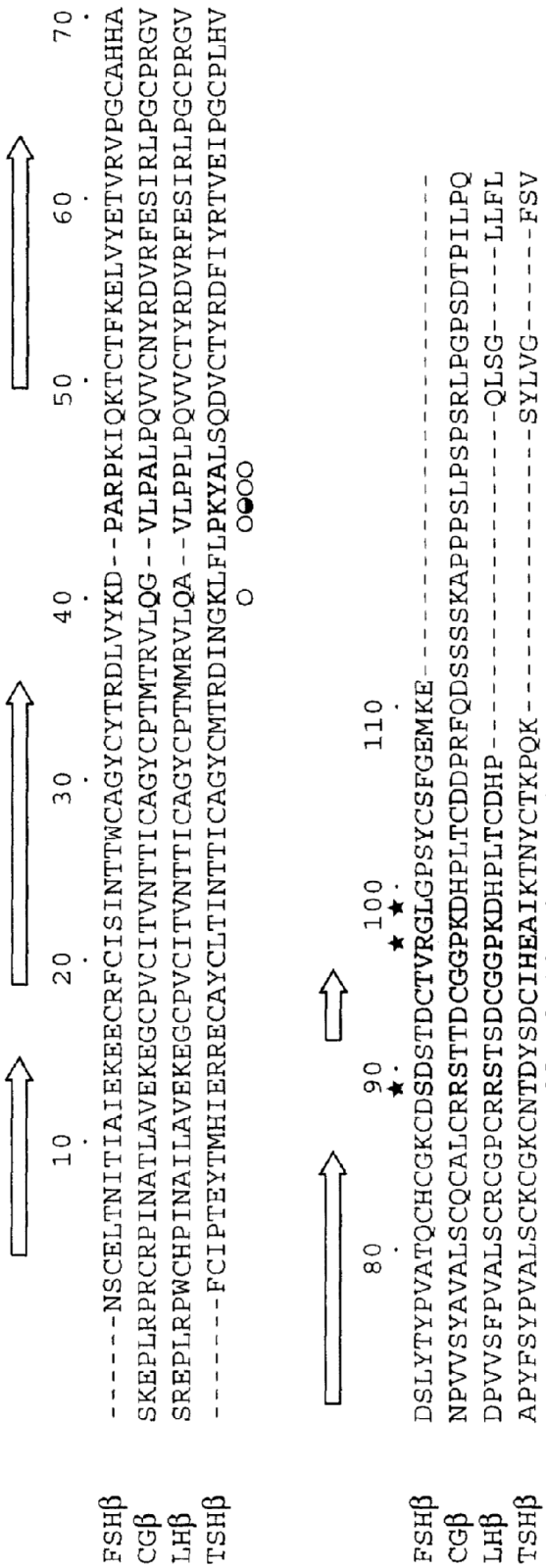

FSHβ ------NSCELTNITIAIEKEECRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKD--PARPKIQKTCTFKELVYETVRVPGCAHHA
CGβ SKEPLRPRCRPINATLAVEKEGCPVCITVNTTICAGYCPTMTRVLQG--VLPALPQVVCNYRDVRFESIRLPGCPRGV
LHβ SREPLRPWCHPINAILAVEKEGCPVCITVNTTICAGYCPTMMRVLQA--VLPPLPQVVCTYRDVRFESIRLPGCPRGV
TSHβ -------FCIPTEYTMHIERRECAYCLTINTTICAGYCMTRDINGKLFLPKYALSQDVCTYRDFIYRTVEIPGCPLHV
10 20 30 40 50 60 70
FSHβ DSLYTYPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEMKE----------
CGβ NPVVSYAVALSCQCALCRRSTTDCGGPKDHPLTCDDPRFQDSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ
LHβ DPVVSFPVALSCRCGPCRRSTSDCGGPKDHPLTCDHP----------QLSG----LLFL
TSHβ APYFSYPVALSCKCGKCNTDYSDCIHEAIKTNYCTKPQK----------SYLVG-----FSV
80 90 100 110

Figura 3

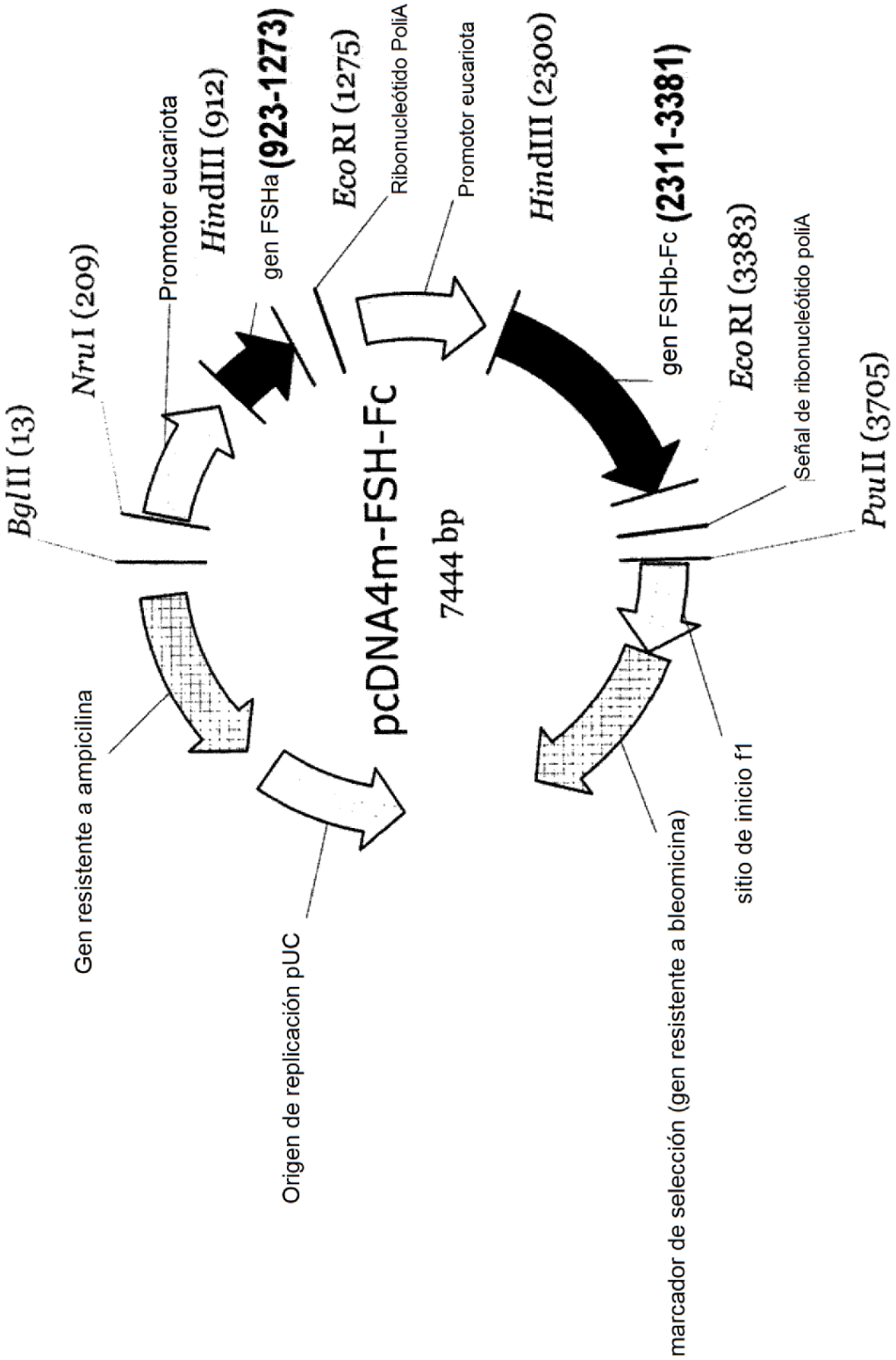

BglII (13)
NruI (209)
Promotor eucariota
HindIII (912)
gen FSHa (923-1273)
EcoRI (1275)
Ribonucleótido PoliA
Promotor eucariota
HindIII (2300)
gen FSHb-Fc (2311-3381)
EcoRI (3383)
Señal de ribonucleótido poliA
PvuII (3705)
pcDNA4m-FSH-Fc
7444 bp
Gen resistente a ampicilina
Origen de replicación pUC
marcador de selección (gen resistente a bleomicina)
sitio de inicio f1

Figura 4

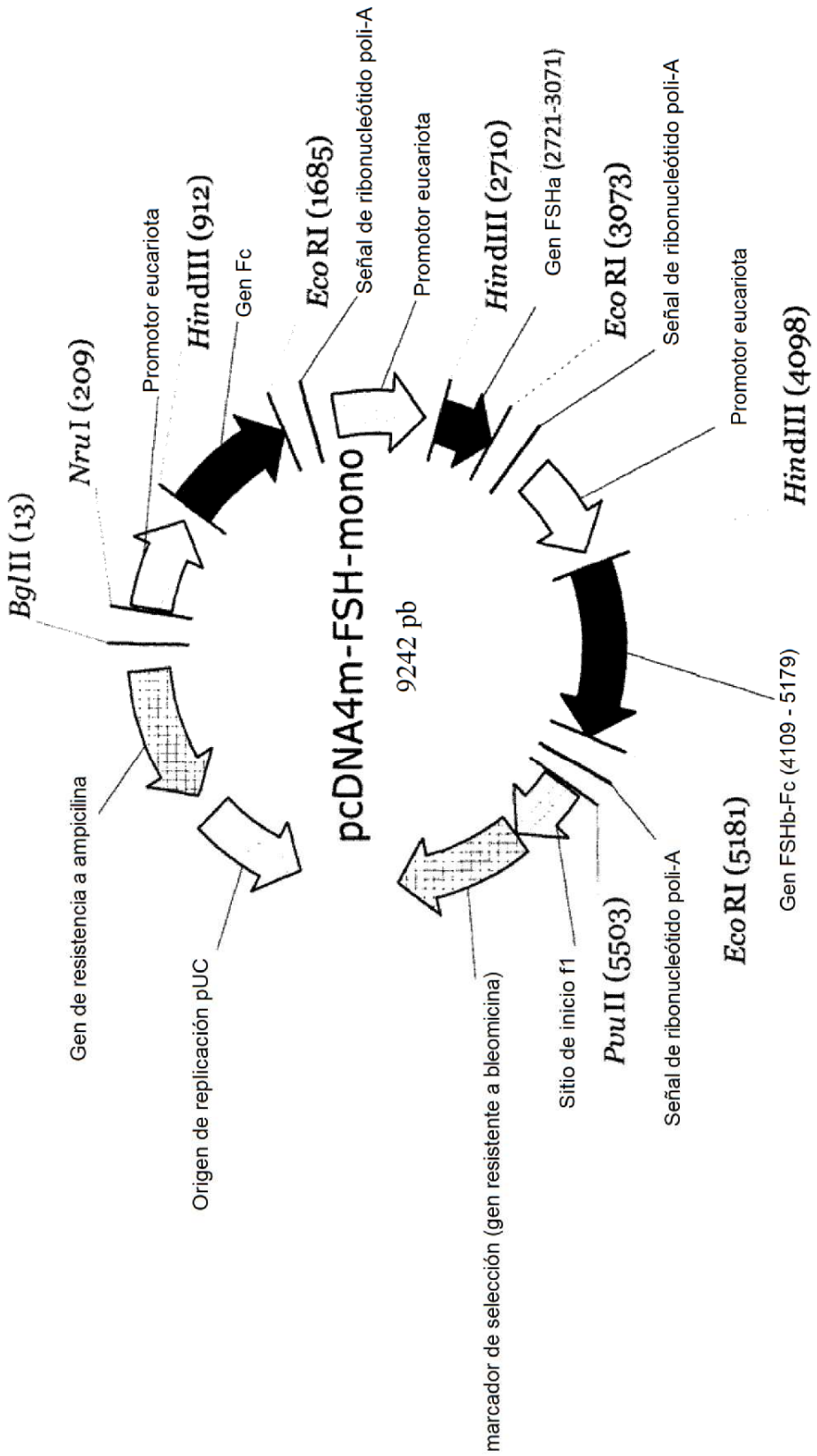

pcDNA4m-FSH-mono
9242 pb
BglII (13)
NruI (209)
Promotor eucariota
HindIII (912)
Gen Fc
EcoRI (1685)
Señal de ribonucleótido poli-A
Promotor eucariota
HindIII (2710)
Gen FSHa (2721-3071)
EcoRI (3073)
Señal de ribonucleótido poli-A
Promotor eucariota
HindIII (4098)
Gen FSHb-Fc (4109 - 5179)
EcoRI (5181)
Señal de ribonucleótido poli-A
PvuII (5503)
Sitio de inicio f1
marcador de selección (gen resistente a bleomicina)
Origen de replicación pUC
Gen de resistencia a ampicilina

Figura 5

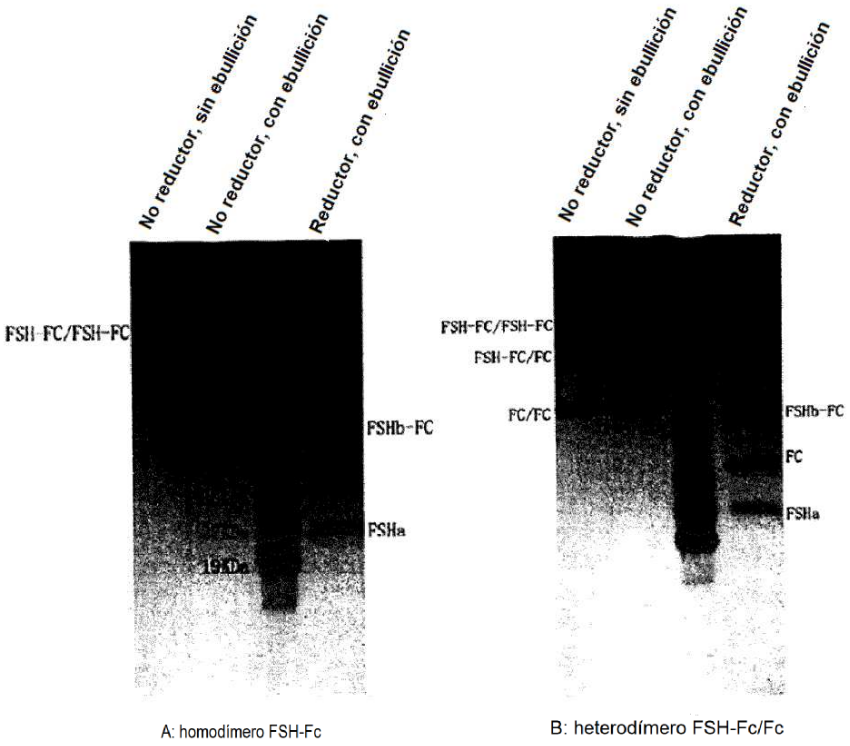


Figura 6

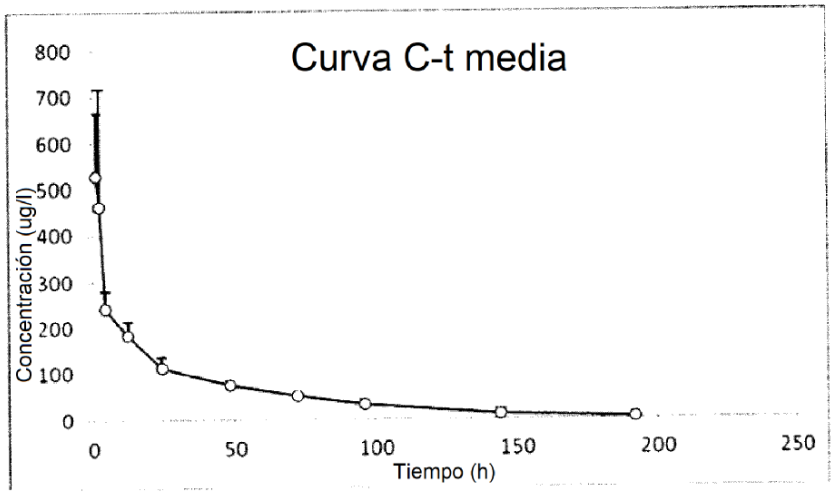


Figura 7

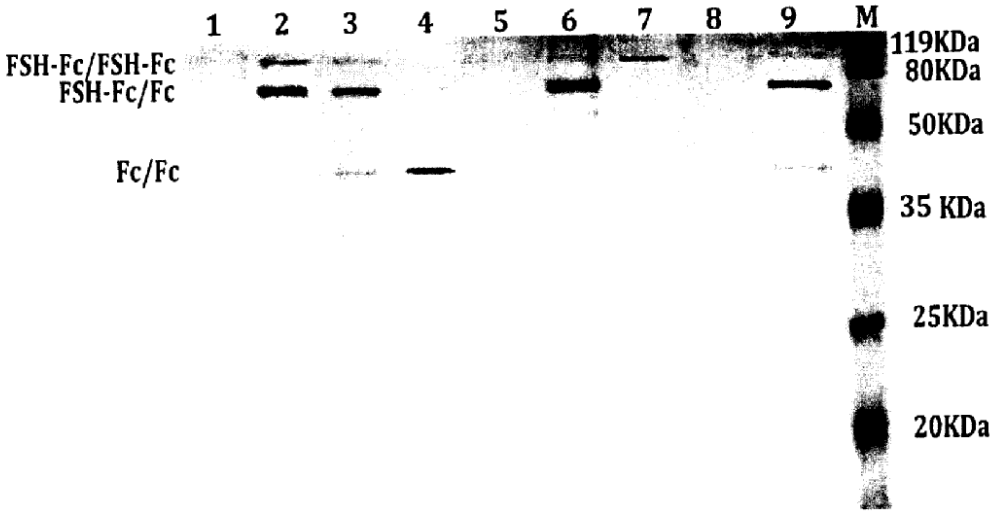


Figura 8

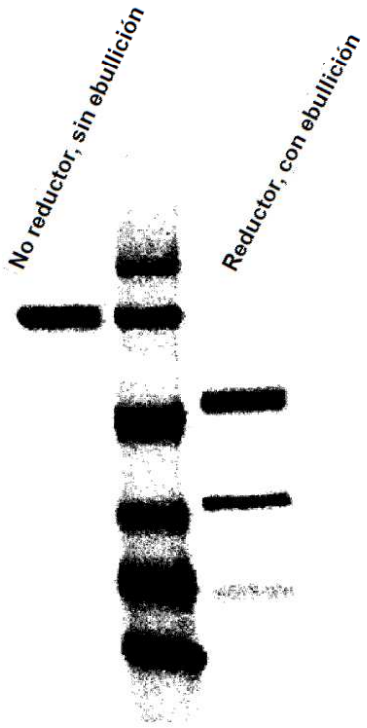
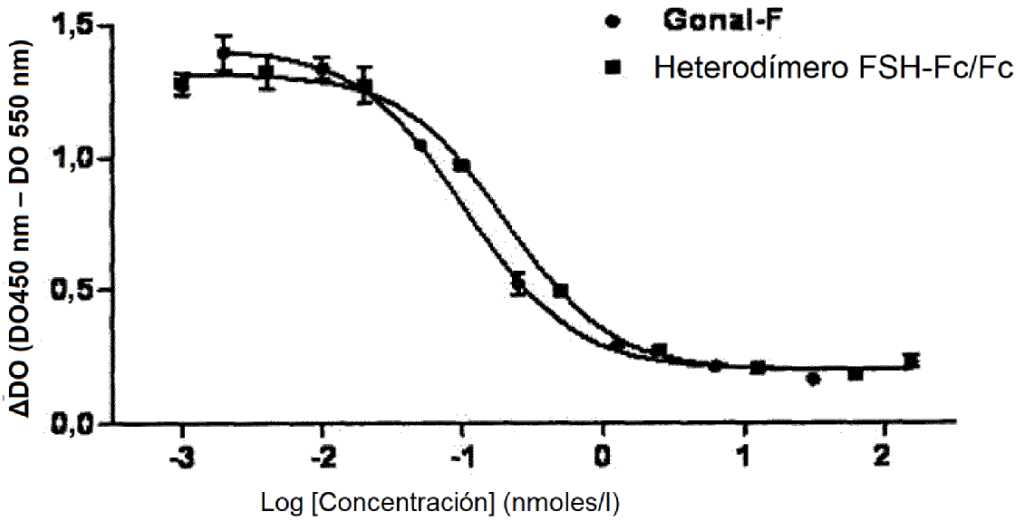


Figura 9



	Gonal-F	Heterodímero FSH-Fc/Fc
EC50	0,1037	0,2039

Figura 10

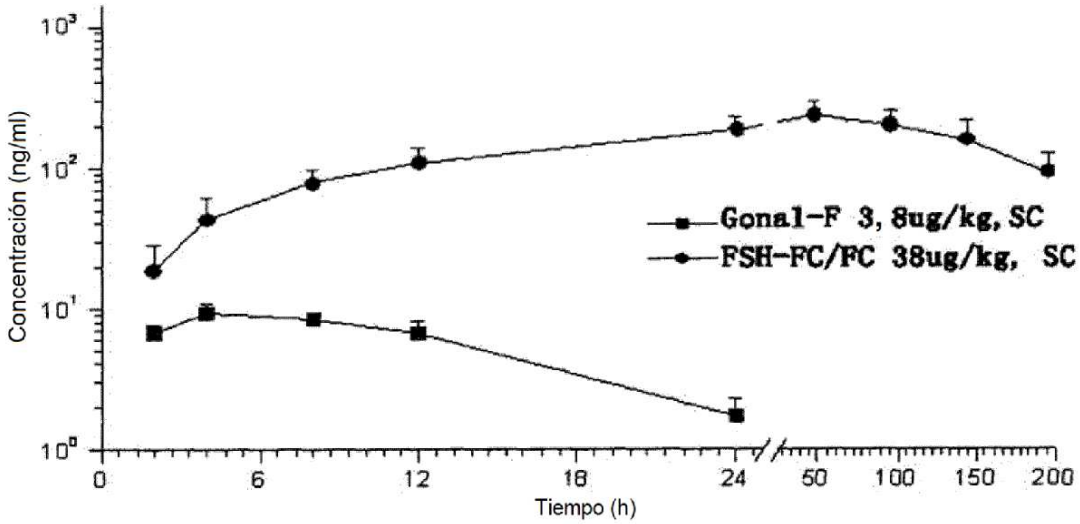
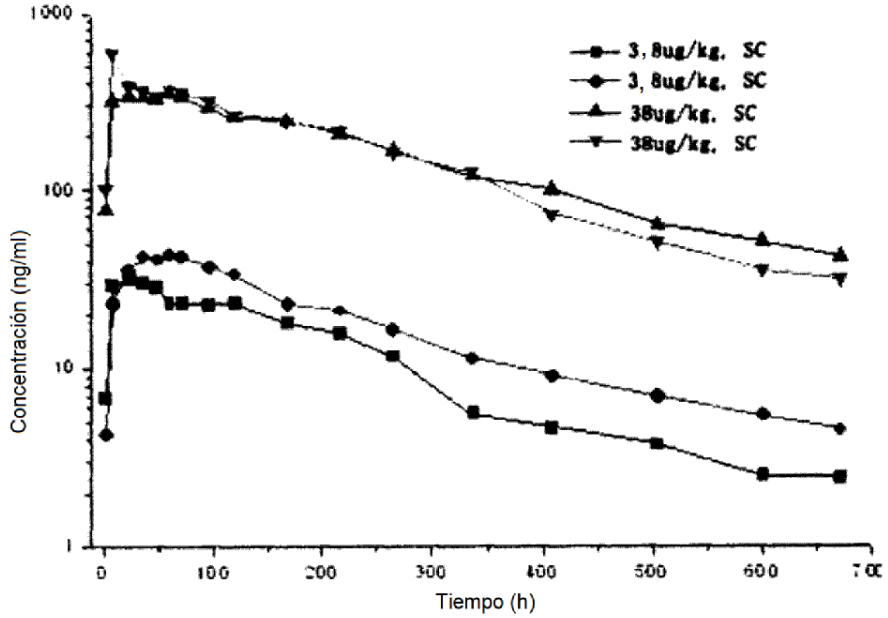


Figura 11

(A)


3, 8ug/kg. SC
3, 8ug/kg. SC
38ug/kg. SC
38ug/kg. SC
Concentración (ng/ml)
1000
100
10
1
0
100
200
300
400
500
600
700
Tiempo (h)

(B)

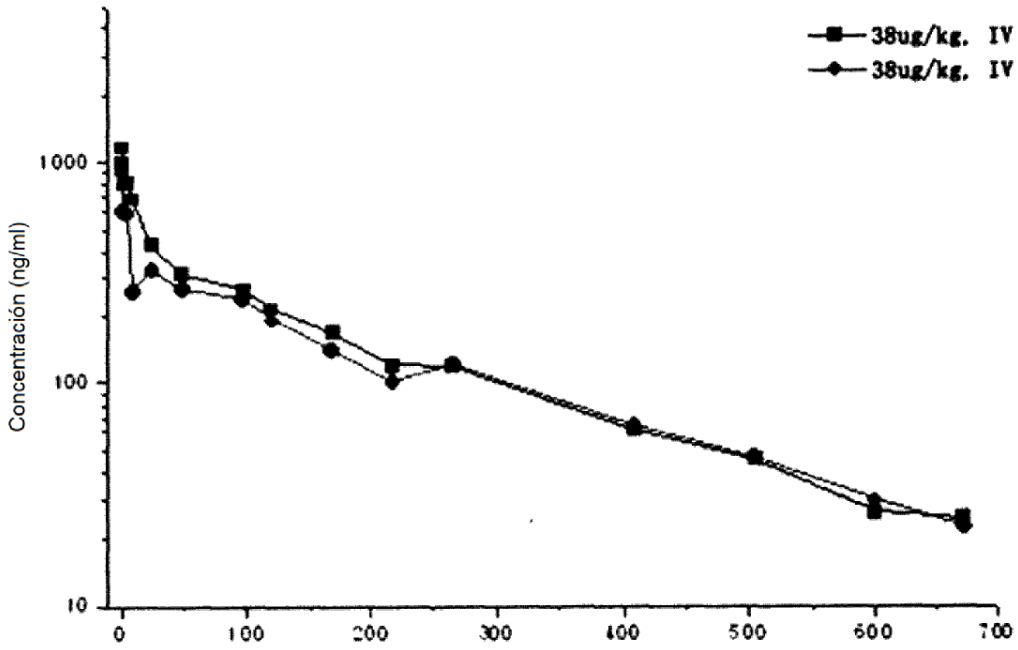

38ug/kg. IV
38ug/kg. IV
Concentración (ng/ml)
1000
100
10
0
100
200
300
400
500
600
700

Figura 12

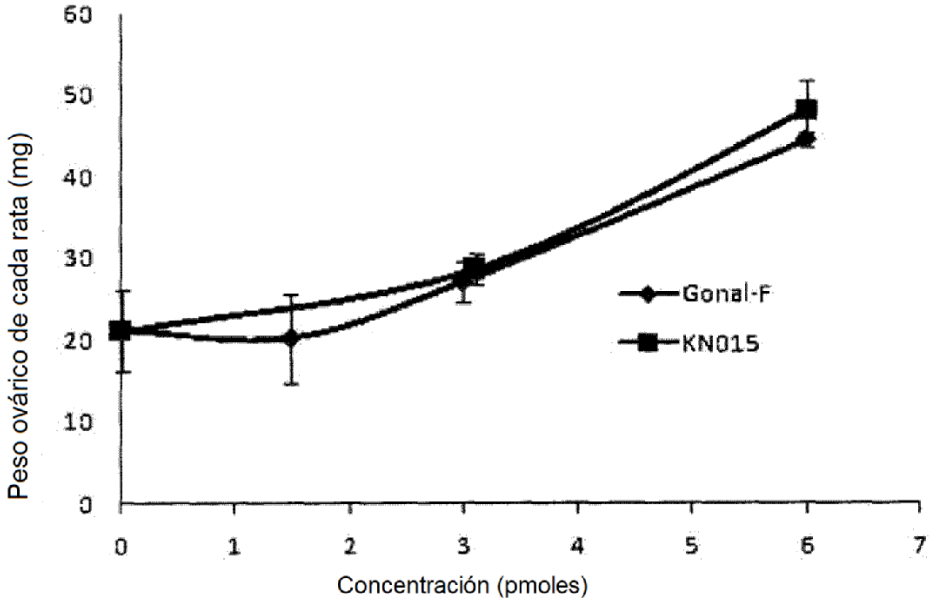


Figura 13

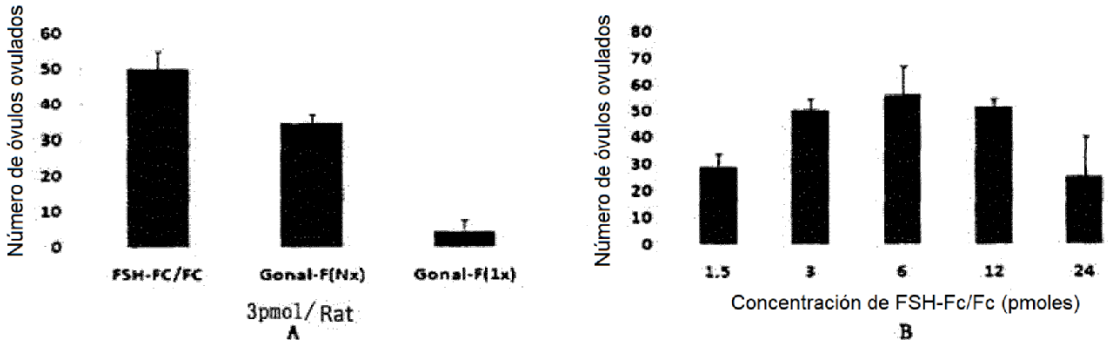


Figura 14