

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 774**

51 Int. Cl.:

A61K 38/24 (2006.01)

A61P 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2012 E 17154031 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 3195875**

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

30 Prioridad:

08.08.2011 EP 11176803

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

05.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ARCE, JOAN-CARLES

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 692 774 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para estimulación ovárica controlada

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

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

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

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

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

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

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

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

La glicosilación de FSH natural es sumamente compleja. Los glicanos en FSH hipofisaria derivada de manera natural pueden contener una amplia variedad de estructuras que pueden incluir combinaciones de glicanos mono-, bi-, tri- y tetra-antennarios (Pierce y Parsons, 1981. Ryan *et al.*, 1987. Baenziger y Green, 1988). Los glicanos pueden portar modificaciones adicionales: fucosilación central, glucosamina bisectriz, cadenas extendidas con acetil-lactosamina, sialilación parcial o completa, sialilación con uniones $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$, y galactosamina sulfatada sustituida

por galactosa (Dalpathado *et al.*, 2006). Además, existen diferencias entre las distribuciones de estructuras de glicano en los sitios de glicosilación individuales. Se ha encontrado un nivel comparable de complejidad de glicanos en FSH derivada del suero de individuos y de la orina de las mujeres posmenopáusicas (Wide *et al.*, 2007).

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

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

30 Se ha documentado la semivida circulatoria de FSH para materiales procedentes de una variedad de fuentes. Algunos de estos materiales se han fraccionado basándose en la carga molecular global, tal como se caracteriza por su pI, en el que más ácido es igual a una mayor carga negativa. Tal como se estableció previamente, el principal factor contribuyente a la carga molecular global es el contenido de ácido siálico total de cada molécula de FSH. Por ejemplo, rFSH (Organon) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 8 mol/mol, mientras que la FSH derivada de orina tiene un mayor contenido de ácido siálico (de Leeuw *et al.* 1996). Las tasas de aclaramiento plasmático correspondientes en la rata son de 0,34 y 0,14 ml/min (Ulloa-Aguirre *et al.* 2003). En otro ejemplo en el que se dividió una muestra de FSH recombinante en fracciones de alto y bajo pI, disminuyó la potencia *in vivo* de la fracción de alto pI (menor contenido de ácido siálico) y tuvo una semivida plasmática más corta (D'Antonio *et al.* 1999). También se ha notificado que la FSH más básica circulante durante las etapas posteriores del ciclo de ovulación se debe a la regulación por disminución de α 2,3 sialil-transferasa en la hipófisis anterior que está provocada por niveles crecientes de estradiol (Damian-Matsumara *et al.* 1999. Ulloa-Aguirre *et al.* 2001). No se han notificado resultados para la α 2,6 sialil-transferasa.

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

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

“antenas”; los glicanos con 1, 2, 3 o 4 restos de azúcar terminales o “antenas” se denominan respectivamente estructuras mono-antenarias, di-antenarias, tri-antenarias o tetra-antenarias. Los glicanos pueden tener la presencia de sialilación en estructuras mono-antenarias y/o di-antenarias y/o tri-antenarias y/o tetra-antenarias. Una rFSH a modo de ejemplo dada a conocer en la solicitud de patente internacional n.º PCT/GB2009/000978 incluía estructuras de glicano mono-sialiladas, di-sialiladas, tri-sialiladas y tetra-sialiladas con las siguientes cantidades relativas: el 9-15% de mono-sialiladas; el 27-30% de di-sialiladas; el 3-36% de tri-sialiladas y el 25-29% de tetrasialiladas. Tal como se conoce bien, una estructura de glicano mono-sialilada porta un resto de ácido siálico; una estructura de glicano di-sialilada porta dos restos de ácido siálico; una estructura de glicano tri-sialilada porta tres restos de ácido siálico; y una estructura de glicano tetra-sialilada porta cuatro restos de ácido siálico. En el presente documento, terminología tal como “X% de mono-sialiladas”, “X% de di-sialiladas”, “X% de tri-sialiladas” o “X% de tetra-sialiladas” se refiere al número de estructuras de glicano en FSH que están mono-, di, tri o tetra-sialiladas (respectivamente), expresadas como porcentaje (X%) del número total de estructuras de glicano en la FSH que están sialiladas de algún modo (portan ácido siálico). Por tanto, la expresión “el 30-36% de estructuras de glicano tri-sialiladas” significa que, del número total de estructuras de glicano en la FSH que portan restos de ácido siálico (es decir, están sialiladas), del 30 al 36% de estas estructuras de glicano están tri-sialiladas (portan tres restos de ácido siálico). Los solicitantes han encontrado sorprendentemente que FSH que tiene una cantidad específica de estructuras de glicano tetra-sialiladas (que es diferente a la del producto de rFSH a modo de ejemplo dado a conocer en el documento PCT/GB2009/000978 mencionado anteriormente) es notablemente más potente que productos de FSH recombinante que están actualmente en el mercado. La secuencia de aminoácidos de los productos del solicitante es la secuencia nativa y es idéntica a FSH humana natural y productos de rFSH derivados de células CHO existentes. Sin embargo, los presentes solicitantes han encontrado que productos de FSH recombinante derivada de ser humano (es decir, FSH recombinante producida o expresada en una línea celular humana por ejemplo preparada mediante modificación por ingeniería genética de una línea celular humana) que tienen una mezcla de ácido siálico con uniones tanto α 2,3 como α 2,6 y/o una cantidad específica de estructuras de glicano tetra-sialiladas pueden ser particularmente eficaces cuando se usan en protocolos de COS (por ejemplo, individualizados).

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

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

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

Según la invención, en un aspecto adicional, se proporciona un producto (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende FSH para su uso en el tratamiento de la esterilidad en un sujeto que está en riesgo de OHSS y que tiene un nivel de AMH en suero \geq 15 pmol/l, en el que el producto va a administrarse a una dosis, o equivalente a, de 0,09 a 0,19 μ g (por ejemplo 0,09 a 0,17 μ g) de FSH recombinante derivada de una línea celular humana por kilogramo de peso corporal de la paciente al día, en donde la FSH incluye α 2,3- y α 2,6-sialilación, en el que del 1% al 99% de la sialilación total es α 2,6-sialilación. Preferentemente el tratamiento de la esterilidad comprende una etapa de determinación (por ejemplo, medida) del nivel de AMH en suero de la paciente, y administración de la dosis a una paciente que tiene el nivel de AMH en suero de \geq 15 pmol/l. En una realización, el producto es para su uso en el tratamiento de esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 15 a 24,9 pmol/l, y el producto va a administrarse a una dosis diaria, o dosis equivalente a, de 0,14 a 0,19 μ g de FSH recombinante derivada de un ser humano (preferentemente de 0,15 a 0,16 μ g de FSH recombinante derivada de un ser humano) por kg de peso corporal de la paciente al día. En esta realización, el tratamiento de la esterilidad puede comprender una etapa de determinación (por ejemplo, medición) del nivel de AMH en suero de la paciente, y administración de la dosis a una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 15 a 24,9 pmol/l. En otra realización, el producto es para su uso en el tratamiento de esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 25 a 34,9 pmol/l, y el producto va a administrarse a una dosis diaria, o dosis equivalente a, de 0,11 a 0,14 μ g de FSH (preferentemente de 0,12 a 0,13 μ g de FSH recombinante derivada de un ser humano) derivada de un ser humano por kg de peso corporal de la paciente al día. En esta realización, el tratamiento de la esterilidad puede comprender un paso para determinar (por ejemplo, medir) el nivel de AMH en suero del paciente, y administrar la

dosis a una paciente con un nivel de AMH en suero de 25 a 34.9 pmol/L. En una realización adicional más, el producto es para uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente con un nivel de AMH en suero de > 35 pmol/L, y el producto se debe administrar a una dosis diaria o dosis equivalente a 0.10 a 0.11 μg de FSH recombinante derivada de un ser humano, por kg de peso corporal de la paciente. En esta realización, el tratamiento de la esterilidad puede comprender una etapa de determinación (por ejemplo, medición) del nivel de AMH en suero de la paciente, y administración de la dosis a una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de ≥ 35 pmol/l. Preferentemente, la FSH es una FSH recombinante ("rFSH" o "recFSH"). Preferentemente, la FSH es una FSH recombinante derivada de línea celular humana. Las dosis proporcionan una respuesta eficaz a la vez que se minimiza el riesgo de desarrollar OHSS.

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

Preferentemente, la rFSH (por ejemplo, FSH recombinante derivada de línea celular humana) incluye $\alpha 2,3$ - y $\alpha 2,6$ -sialilación. La FSH (rFSH) puede tener del 1% al 99% de la sialilación total que es $\alpha 2,3$ -sialilación. La FSH (rFSH) tiene del 5% al 99% de la sialilación total que es $\alpha 2,6$ -sialilación. Preferentemente, del 50 al 70%, por ejemplo, del 60 al 69%, por ejemplo, aproximadamente el 65%, de la sialilación total es $\alpha 2,3$ -sialilación. Preferentemente, del 25 al 50%, por ejemplo, del 30 al 50%, por ejemplo, del 31 al 38%, por ejemplo, aproximadamente el 35%, de la sialilación total es $\alpha 2,6$ -sialilación.

Preferentemente, la rFSH (por ejemplo, FSH recombinante derivada de línea celular humana) incluye estructuras de glicano mono-, di-, tri- y tetra-sialiladas, en las que el 15-24%, por ejemplo, el 17-23% de las estructuras de glicano sialiladas son estructuras de glicano tetrasialiladas (por ejemplo, tal como se muestra mediante análisis por WAX de glicanos cargados, tal como se expone en los ejemplos a continuación). La FSH comprende glicanos (unidos a las glicoproteínas de FSH). Se conoce bien que los glicanos en FSH pueden contener una amplia variedad de estructuras. Estas pueden incluir combinaciones de glicanos mono, bi, tri y tetra-antenarios. En el presente documento, terminología tal como "X% de las estructuras de glicano sialiladas son estructuras de glicano tetrasialiladas" se refiere al número de estructuras de glicano en la FSH que están tetra-sialiladas, es decir portan cuatro restos de ácido siálico, expresadas como porcentaje (X%) del número total de estructuras de glicano en la FSH que están sialiladas de algún modo (portan ácido siálico). Por tanto, la expresión "el 15-24% de las estructuras de glicano sialiladas son estructuras de glicano tetrasialiladas" significa que, del número total de estructuras de glicano en FSH que portan restos de ácido siálico (es decir, están sialiladas), del 15 al 24% de estas estructuras de glicano están tetra-sialiladas (portan cuatro restos de ácido siálico).

La rFSH puede estar presente como una única isoforma o como una mezcla de isoformas.

Los solicitantes han concebido protocolos de COS "individualizados" en los que se usan dosis específicas de FSH recombinante que tienen características específicas para tratar pacientes basándose en sus niveles de AMH específicos, aumentando de ese modo la probabilidad de una respuesta adecuada a la estimulación (por ejemplo, en pacientes que tienen un bajo potencial de respuesta), y/o un riesgo disminuido de desarrollar OHSS (por ejemplo, en pacientes que se clasificaron como de potencial de respuesta alto o excesivo).

El nivel de AMH en suero puede determinarse (por ejemplo, medirse) mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferentemente, el nivel de AMH en suero se mide usando el kit del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas AMH Gen-II (Beckman Coulter, Inc., Webster, Texas). Este ensayo puede detectar concentraciones de AMH mayores de 0,57 pmol/l con un límite de cuantificación mínimo de 1,1 pmol/l. Pueden usarse otros ensayos.

En el presente documento, los valores de AMH en suero se citan generalmente en términos de pmol/l. Esto puede convertirse a ng/ml usando la ecuación de conversión: 1 ng/ml de AMH = 7,1 pmol/l de AMH.

En el presente documento, los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente.

El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) comprende preferentemente una dosis diaria de, o una dosis diaria equivalente a, las cantidades de rFSH derivada de ser humano definidas anteriormente, en el presente documento, y en las reivindicaciones. La dosis (diaria) puede ser una dosis inicial (es decir, puede reducirse, aumentarse o mantenerse durante el tratamiento).

El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) puede ser para la administración (diaria) de FSH empezando en el día uno de tratamiento y continuando por siete a trece días, por ejemplo, de nueve a trece días, por ejemplo, de 10 a 13 días, por ejemplo, de 10 a 11 días. El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) puede ser para la administración de 12 a 16, por ejemplo, de 13 a 15, por ejemplo 14 días tras la administración de (por ejemplo, tras el inicio de la administración de, por ejemplo, tras el inicio de la administración diaria de) un agonista de GnRH (por ejemplo, Synarel, Lupron, Decapeptyl). El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) puede ser para la administración con un agonista de GnRH. El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) puede

ser para la administración antes de la administración de un antagonista de GnRH (por ejemplo, ganirelix, cetrorelix), por ejemplo, para la administración cinco o seis días antes de la administración de un antagonista de GnRH. El producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) puede ser para la administración con un antagonista de GnRH. Preferentemente, el producto (por ejemplo, la composición farmacéutica) es para la administración antes de la administración de una dosis alta (ovulatoria) de hCG (por ejemplo, de 4.000 a 11.000 UI de hCG, por ejemplo 5.000 UI de hCG, 10.000 UI de hCG etc.; o de 150 a 350 microgramos de hCG recombinante, por ejemplo 250 microgramos de hCG recombinante) para inducir la maduración folicular final.

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

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

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

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

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

La rFSH puede tener un contenido de ácido siálico [expresado en cuanto a la razón de moles de ácido siálico con respecto a moles de proteína] de 6 mol/mol o mayor, por ejemplo entre 6 mol/mol y 15 mol/mol, por ejemplo entre 8 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo entre 10 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo entre 11 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo entre 12 mol/mol y 14 mol/mol, por ejemplo entre 12 mol/mol y 13 mol/mol. La rFSH puede producirse o expresarse en una línea celular humana.

La FSH (rFSH) para su uso según la invención puede tener del 1% al 99% de la sialilación total que es α 2,3-sialilación. La rFSH puede tener el 10% o más de la sialilación total que es α 2,3-sialilación. Por ejemplo, el 20, 30,40, 50, el 60, el 70, el 80 o el 90% o más de la sialilación total puede ser α 2,3-sialilación. La rFSH puede incluir Preferentemente α 2,3-sialilación en una cantidad que es de desde el 50 hasta el 70% de la sialilación total, por ejemplo, desde el 60 hasta el 69% de la sialilación total, por ejemplo, desde el 63 hasta el 67%, por ejemplo, aproximadamente el 65% de la sialilación total. La FSH (rFSH) para su uso según la invención puede tener del 1% al

99% de la sialilación total que es α 2,6-sialilación. La rFSH (o preparación de rFSH) de la invención puede tener el 5% o más, por ejemplo, del 5% al 99%, de la sialilación total que es α 2,6-sialilación. La rFSH puede tener el 50% o menos de la sialilación total que es α 2,6-sialilación. La rFSH puede incluir Preferentemente α 2,6-sialilación en una cantidad que es de desde el 25 hasta el 50% de la sialilación total, por ejemplo, desde el 30 hasta el 50% de la sialilación total, por ejemplo, desde el 31 hasta el 38%, por ejemplo, aproximadamente el 35% de la sialilación total. Por sialilación, quiere decirse la cantidad de restos de ácido siálico presentes en las estructuras de hidrato de carbono de la FSH. α 2,3-Sialilación significa sialilación en la posición 2,3 (tal como se conoce bien en la técnica) y α 2,6-sialilación en la posición 2,6 (también se conoce bien en la técnica). Por tanto “% de la sialilación total puede ser α 2,3 sialilación” se refiere al % del número total de restos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,3. El término “% de la sialilación total que es α 2,6-sialilación” se refiere al % del número total de restos de ácido siálico presentes en la FSH que están sialilados en la posición 2,6.

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

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

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

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

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

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

Parece que la disponibilidad de la unión α 2,6 aumenta el número de estructuras tetra-sialiladas, en comparación con productos derivados de células CHO que tienen sólo la unión α 2,3 disponible. Los solicitantes también han encontrado que su rFSH se distingue con respecto a otros productos aprobados debido a la composición de azúcares: incluye, o puede incluir, una cantidad específica de GalNAc. Esto puede vincularse con la tetrasialilación y potencia porque la 2,6-sialilación está asociada con GalNAc. En otras palabras, los presentes solicitantes han desarrollado un producto de rFSH que incluye características específicas (sitios de grupo de unión 2,6, GalNAc) que proporcionan rFSH con un alto grado de sialilación, lo que parece conducir a una potencia mejorada *in vivo*.

La rFSH (o preparación de rFSH) puede tener del 16 al 24% de los glicanos que comprenden 1-fucosa-Lewis (por ejemplo, terminal), por ejemplo, del 16,5 al 18% de los glicanos que comprenden 1-fucosa-Lewis (por ejemplo, terminal). La rFSH (o preparación de rFSH) puede tener del 1,5 al 4,5%, por ejemplo, del 2 al 4%, por ejemplo, el 3,7%, de los glicanos que comprenden 2-fucosa-Lewis (por ejemplo, terminal). El contenido de fucosa-Lewis puede

tener un efecto sobre la potencia.

La rFSH puede producirse o expresarse en una línea celular humana, por ejemplo, una línea celular Per.C6, una línea celular HEK293, una línea celular HT1080, etc. Esto puede simplificar (y hacer más eficaz) el método de producción porque la manipulación y el control de, por ejemplo, el medio de crecimiento celular para conservar la sialilación pueden ser menos críticos que con procedimientos conocidos. El método también puede ser más eficaz porque se produce poca cantidad de rFSH básica en comparación con la producción de productos de rFSH conocidos; se produce más rFSH ácida y la separación/retirada de FSH básica es menos problemática. La rFSH puede producirse o expresarse en una línea celular PER.C6®, una línea celular derivada de PER.C6® o una línea celular PER.C6® modificada. rFSH que se produce o se expresa en una línea celular humana (por ejemplo, línea celular PER.C6®, la línea celular HEK293, línea celular HT1080, etc.) incluirá cierta cantidad de ácidos siálicos con uniones α 2,6 (α 2,6-sialilación) proporcionados por actividad sialil transferasa endógena [de la línea celular] e incluirá cierta cantidad de ácidos siálicos con uniones α 2,3 (α 2,3-sialilación) proporcionados por actividad sialil transferasa endógena. La línea celular puede modificarse usando α 2,3-sialiltransferasa. La línea celular puede modificarse usando α 2,6-sialiltransferasa. Alternativa o adicionalmente, la rFSH puede incluir ácidos siálicos con uniones α 2,6 (α 2,6-sialilación) proporcionados por actividad sialil transferasa endógena [de la línea celular]. En el presente documento, el término "FSH recombinante derivada de ser humano" significa FSH recombinante que se produce o se expresa en una línea celular humana (por ejemplo, FSH recombinante preparada mediante modificación por ingeniería genética de una línea celular humana).

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

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

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

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

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

En algunos casos, para realizar una acción prolongada, es deseable ralentizar la absorción de FSH (y otros principios activos, si están presentes) a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con escasa solubilidad en agua. La velocidad de absorción de FSH depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño de cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de combinación de FSH administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo la combinación de FSH en un vehículo aceitoso. Pueden prepararse formas de depósito inyectables formando matrices de microencapsulación de la FSH (y otros agentes, si están presentes) en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la razón de FSH con respecto a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación de FSH. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen polivinilpirrolidona, poliortoésteres, polianhídridos, etc. También se preparan formulaciones inyectables de depósito atrapando la FSH

en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

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

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

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

El producto o la composición puede ser una formulación (por ejemplo, formulación inyectable) que incluye FSH (opcionalmente con hCG, LH, actividad LH etc.) La actividad LH, si está presente, puede originarse a partir de LH o gonadotropina coriónica humana, hCG. Si hay más de un principio activo (es decir, FSH y por ejemplo hCG o LH) estos pueden ser adecuados para la administración por separado o conjuntamente. Si se administran por separado, la administración puede ser secuencial. El producto puede suministrarse en cualquier envase apropiado. Por ejemplo, un producto puede incluir varios recipientes (por ejemplo, jeringas precargadas o viales) que contienen o bien FSH o bien hCG, o una combinación (o combinación) tanto de FSH como de hCG. La hCG puede ser hCG recombinante o hCG de orina. Si el producto incluye varios recipientes (por ejemplo, jeringas precargadas o viales) que contienen FSH, por ejemplo, FSH recombinante, cada recipiente puede incluir la misma cantidad de FSH. Uno o más recipientes pueden incluir diferentes cantidades de FSH. Las jeringas o los viales pueden envasarse en un envase de tipo blíster u otros medios para mantener la esterilidad. Cualquier producto puede contener opcionalmente instrucciones para el uso de las formulaciones de FSH (y por ejemplo hCG si está presente). El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según la práctica de rutina en este campo. Véase GOODMAN and GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7ª ed. En una realización preferida, las composiciones de la invención se suministran como composiciones para su administración parenteral. En la técnica se conocen métodos generales para la preparación de las formulaciones parenterales y se describen en REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, citado anteriormente, en las páginas 780-820. Las composiciones parenterales pueden suministrarse en formulación líquida o como sólido que se mezclará con un medio inyectable estéril justo antes de la administración. En una realización especialmente preferida, las composiciones parenterales se suministran en forma de dosificación unitaria por su facilidad de administración y uniformidad de dosificación.

Descripción detallada de la invención

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

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

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

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

la figura 4 muestra el % de abundancia de la distribución de ácido siálico de ejemplos de FSH recombinante producida por células PER.C6® que expresan de manera estable FSH tras la modificación por ingeniería genética con α 2,3-sialiltransferasa;

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

la figura 6 muestra una comparación de la concentración de inhibina-B tras la administración de 225 UI de Gonal f (línea inferior, línea discontinua) y 225 UI del ejemplo (línea superior, línea continua) de la invención;

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

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

Selección de secuencias

FSH humana

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

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

Sialiltransferasa

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

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

Ejemplos

Ejemplo 1 Construcción del vector de expresión de FSH

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

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

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

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

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

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

Se usó el ADN de vector para transformar la cepa DH5 α de *E. coli*. Se escogieron colonias para amplificación. Se seleccionaron las colonias que contenían el vector que contenía tanto FSH alfa como beta para la secuenciación y todas contenían las secuencias correctas según SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Se seleccionó el plásmido pFSH A+Bnn^o17 para la transfección (figura 1).

Ejemplo 2 Construcción del vector de expresión de ST3

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

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

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

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

Ejemplo 3 Construcción del vector de expresión de ST6

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

2,6STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGATTCACACCAACCTGAAG-3' (SEQ ID NO: 15)
2,6STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTTAGCAGTGAATGGTCCGG-3' (SEQ ID NO: 16)

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

Ejemplo 4 Expresión estable de pFSH $\alpha+\beta$ en células PER.C6®. Transfección, aislamiento y examen de clones.

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 6 Visión general de la producción y purificación

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 8a

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

Se liberaron N-glicanos de las muestras usando PNGasa F en condiciones desnaturalizantes y entonces se marcaron con 2-aminobenzamida. Entonces se separaron las formas de glicano liberadas y se analizaron mediante una columna de intercambio aniónico débil (WAX) para la determinación de la distribución de carga. se analizaron

adicionalmente mediante una columna para WAX glicanos marcados tratados con 2,3,6,8-sialidasa para la determinación de ácido siálico total y 2,3-sialidasa para la determinación de ácido 2,3-siálico (véase el ejemplo 8). El análisis permite el cálculo de ácido α 2,6-siálico.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Población de estudio

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

Resultados de seguridad

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

Resultados farmacocinéticos

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

Resultados farmacodinámicos

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

10 El ejemplo 9 demuestra que FSH que tiene una cantidad específica (el 17-23%) de estructuras de glicano tetra-sialiladas y, por ejemplo, cantidades específicas de α 2,3-sialilación y α 2,6-sialilación es notablemente más potente que los productos de FSH recombinante que están actualmente en el mercado.

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

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

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

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

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

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

Tabla 1

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

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

Para prevenir un aumento de LH prematuro, puede iniciarse el tratamiento con un antagonista de GnRH (acetato de ganirelix, ORGALUTRAN, MSD/Schering-Plough) en el día de estimulación 6 a una dosis diaria de 0,25 mg y continuarse en la totalidad del periodo de estimulación. Se realiza la inducción de la maduración folicular final en el día en el que se observan ≥ 3 folículos con un diámetro ≥ 17 mm. Si hay < 25 folículos con un diámetro ≥ 12 mm, se administran 250 μg de hCG recombinante (coriogonadotropina alfa, OVITRELLE, Merck Serono/EMD Serono). Si hay 25-35 folículos con un diámetro ≥ 12 mm, se administran 0,2 mg de agonista de GnRH (acetato de triptorelina, DECAPEPTYL / GONAPEPTYL, Ferring Pharmaceuticals). En caso de respuesta ovárica excesiva, definida como > 35 folículos con un diámetro ≥ 12 mm, se cancela el tratamiento. En caso de escasa respuesta ovárica, definida como < 3 folículos con un diámetro ≥ 10 mm observados en el día de estimulación 10, podría cancelarse el ciclo.

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

Resultados

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

Tabla 2

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

Los datos son la media (D.E.)

Se cumplió el objetivo primario: se estableció una relación dosis-respuesta significativa para FE 999049 con respecto al número de ovocitos recuperados. Se observó este hallazgo no sólo para la población de ensayo global, sino también para cada uno de los dos estratos de AMH usados en la aleatorización. Se demostró una relación dosis-respuesta significativa para FE 999049 para todos los parámetros farmacodinámicos objetivo clave, por ejemplo, estradiol, inhibina B e inhibina A. A un nivel de dosis de microgramos similar, las respuestas farmacodinámicas con FE 999049 fueron mayores que con GONAL-F (no se muestran estos resultados).

Las concentraciones de FSH en suero tras la exposición a FE 999049 fueron significativamente mayores que para GONAL-F. Los resultados confirman que el perfil PK de FE 999049 difiere del de GONAL-F. Las tasas de fecundación, el desarrollo de blastocistos y las tasas de embarazos en pacientes sometidas a IVF/ICSI tratadas con FE 999049 estuvieron dentro de las expectativas. No hubo problemas de seguridad con el uso de FE 999049. Se documentó una buena tolerancia local.

Análisis adicional

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

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

5 Los solicitantes también investigaron el impacto del peso corporal. Si es relevante, se convierte la dosis en µg/kg para un sujeto medio. Se evalúa este valor de µg/kg y ± 0,01 µg/kg en un modelo con respecto a la distribución de ovocitos recuperados, así como al perfil de seguridad, y se identifica la dosis óptima.

Estratos con bajo nivel de AMH

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

15 **Tabla 3**

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

Los datos son el % de sujetos

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

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

Tabla 4

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

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

Por tanto, los solicitantes han encontrado que una dosis, o dosis equivalente a, de 6 a 18 µg, por ejemplo de 9 a 14 µg, por ejemplo 12 µg de FSH recombinante derivada de ser humano es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero <15 pmol/l, por ejemplo de 0,05-14,9 pmol/l por ejemplo de 5,0-14,9 pmol/l. La dosis proporciona una respuesta eficaz a la vez que se minimiza el riesgo de desarrollar OHSS.

Estratos con alto nivel de AMH

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

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

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

Tabla 5a

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

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

Tabla 5b

FE 999049					
	5,2 µg	6,9 µg	8,6 µg	10,3 µg	12,1 µg
OHSS ^{***} , cancelación debida a respuesta excesiva o inducción con agonista ^{****}					
15-24 pmol/l	0	0	0	0	0
25-34 pmol/l	0	0	0	1 ^{***}	1 ^{***}
35-45 pmol/l	0	1 ^{***}	0	1 ^{***}	0

5

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

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

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

10

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

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

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

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

15

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

4 categorías de nivel de AMH		3 categorías de nivel de AMH		2 categorías de nivel de AMH		Una dosis	
AMH	Dosis	AMH	Dosis	AMH	Dosis	AMH	Dosis
< 15	12 µg	< 15	12 µg	< 15	12 µg	-	9,3 µg o 10 µg
15-24	9,3-10 µg	15-24	9,3-10 µg	≥ 15	8,7 µg		

4 categorías de nivel de AMH		3 categorías de nivel de AMH		2 categorías de nivel de AMH		Una dosis	
AMH	Dosis	AMH	Dosis	AMH	Dosis	AMH	Dosis
25-34	7,3-8 µg	≥ 25	7,3 µg				
≥ 35	6,3-7 µg						

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

La dosis proporciona una respuesta eficaz a la vez que se minimiza el riesgo de desarrollar OHSS.

Los solicitantes han encontrado que una dosis (por ejemplo, diaria), o dosis equivalente a, de 0,09 a 0,19 µg de FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de ≥15 pmol/l. Los solicitantes han encontrado que una dosis (por ejemplo, diaria), o dosis equivalente a, de 0,14 a 0,19 µg de FSH recombinante derivada de ser humano (preferentemente de 0,15 a 0,16 µg de FSH recombinante derivada de ser humano) por kg de peso corporal de la paciente es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 15 a 24,9 pmol/l. Los solicitantes han encontrado que una dosis (por ejemplo, diaria), o dosis equivalente a, de 0,11 a 0,14 µg de FSH recombinante derivada de ser humano (preferentemente de 0,12 a 0,13 µg de FSH recombinante derivada de ser humano) por kg de peso corporal de la paciente es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de 25 a 34,9 pmol/l. Los solicitantes han encontrado que una dosis (por ejemplo, diaria), o dosis equivalente a, de 0,10 a 0,11 µg de FSH recombinante derivada de ser humano por kg de peso corporal de la paciente es adecuada para su uso en el tratamiento de la esterilidad en una paciente que tiene un nivel de AMH en suero de ≥ 35 pmol/l. Estas dosis proporcionan una respuesta eficaz a la vez que se minimiza el riesgo de desarrollar OHSS.

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

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

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

Ejemplo 11 - Protocolos de COS individualizados.

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

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

El protocolo de COS avanza de la manera habitual aparte de la administración de la dosis inicial de FE 999049 según el nivel de AMH en la selección en línea con la siguiente tabla. Por tanto, a una paciente con un nivel de AMH de 5-14,8 pmol/l se le administraría 180 UI de FSH en forma de aproximadamente 8-11 µg de FE 999049, un producto de FSH recombinante derivada de ser humano fabricado según el método del ejemplo 6. A una paciente con un nivel de AMH de 30-44,9 pmol/l se le administraría 120 UI de FSH en forma de aproximadamente 4-7 µg de FE 999049, un producto de FSH recombinante derivada de ser humano fabricado según el método del ejemplo 6. Si

el nivel de AMH no está disponible, a la paciente recombinante se le administrarían 120-180 UI de FSH en forma de aproximadamente 6-11 µg de FE 999049, un producto de FSH recombinante derivada de ser humano fabricado según el método del ejemplo 6.

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

5

Bibliografía

- Andersen CY, Westergaard LG y van Wely M. (2004). FSH isoform composition of commercial gonadotrophin preparations: a neglected aspect? *Reprod Biomed Online*. **9(2)**, 231-236.
- 10 Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A y Lopez FJ. (1997) Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol*. **11(5)**, 517-526.
- 15 Baenziger JU y Green ED. (1988). Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta*. **947(2)**, 287-306.
- 20 Bassett RM y Driebergen R. (2005). Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. *Reprod Biomed Online*. **10(2)**, 169-177.
- Damián-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sánchez-Hernández C, Timossi C y Ulloa-Aguirre A. (1999). Oestrogens regulate pituitary alpha 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol*. **23(2)**, 153-165.
- 25 D'Antonio M., Borrelli F., Datola A., Bucci R., Mascia M., Polletta P., Piscitelli D. y Papoian R. (1999) Biological characterization of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms. *Human Reproduction* **14**, 1160-1167
- 30 Dalpathado DS, Irungu J, Go EP, Butnev VY, Norton K, Bousfield GR y Desaire H. (2006). Comparative glycomics of the glycoprotein follicle stimulating hormone: glycopeptide analysis of isolates from two mammalian species. *Biochemistry*. **45(28)**, 8665-8673. Sin copia
- Dias JA, Van Roey P. (2001). Structural biology of human follitropin and its receptor. *Arch Med Res*. **32(6)**, 510-519
- 35 Fiddes, J. C. y Goodman, H. M. (1979) Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 281, 351-356.
- 40 Flack, M.R., Bennet, A.P., Froehlich, J. Anasti, JN y Nisula, B. (1994). Increased biological activity due to basic isoforms in recombinant human follicle-stimulating hormone produced in a human cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 756-760
- Fox KM, Dias JA y Van Roey P. (2001). Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol*. **15(3)**, 378-89
- 45 Grabenhorst E, Hoffmann A, Nimitz M, Zettlmeissl G y Conradt HS. (1995). Construction of stable BHK-21 cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal(beta 1-4)GlcNAc-R alpha 2,6-sialyltransferase alpha 2,6-linked NeuAc is preferentially attached to the Gal(beta 1-4)GlcNAc(beta 1-2)Man(alpha 1-3)-branch of diantennary oligosaccharides from secreted recombinant beta-trace protein. *Eur J Biochem*. **232(3)**, 718-25.
- 50 Green ED y Baenziger JU. (1988). Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem*. **263(1)**, 36-44.
- 55 Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T. y Zettlmeissl, G. (1990). Complete cDNA sequence encoding human betagalactoside alpha-2,6-sialyltransferase. *G Nucleic Acids Res*. **18(3)**, 667
- Howles, C.M. (1996). Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Hum Reprod. Update*, **2**, 172-191.

- Kagawa Y, Takasaki S, Utsumi J, Hosoi K, Shimizu H, Kochibe N y Kobata A. (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human interferon-beta 1 and recombinant human interferon-beta 1 produced by three different mammalian cells. *J Biol Chem.* **263(33)**, 17508-17515.
- 5 Keene, J.L., Matzuk, M.M., Otani, T., Fauser, B, C, J, M., Galway, A.B., Hsueh, A.J.W. y Boime, I. (1989). Expression of Biologically active Human Follitropin in Chinese Hamster Ovary Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **264(9)**, 4769-4775.
- 10 Kitagawa, H. y Paulson, J.C (1994) Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J. Biol. Chem.* **269(2)**, 1394-1401.
- Lee EU, Roth J y Paulson JC (1989) Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem.* **264(23)**, 13848-13855.
- 15 de Leeuw, R., Mulders, J., Voortman, G. Rombout, F. Damm, J. y Kloosterboer, L. (1996) Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Mol. Hum. Reprod.*, **2**, 361-369.
- 20 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193(1)**, 265-75.
- Lowry, PJ, McLean, C, Jones RL y Satgunasingam N. (1976) Purification of anterior pituitary and hypothalamic hormones *Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)*. **7**, 16-21.
- 25 Olivennes F, Howles CM, Borini A, Germond M, Trew G, Wikland M, Zegers-Hochschild F, Saunders H (2009) Individualizing FSH dose for assisted reproduction using a novel algorithm: the CONSORT study. *Reprod Biomed Online*. Febrero de 2009; **18(2)**:195-204.
- 30 Pierce JG y Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function *Annu Rev Biochem.* **50**, 465-495.
- Pricer WE Jr y Ashwell G. (1971). The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem.* **246(15)**, 4825-33.
- 35 Rathnam P y Saxena BB. (1975). Primary amino acid sequence of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit. *J Biol Chem.*; **250(17)**:6735-6746.
- Regoezci E, Debanne MT, Hatton MC y Koj A. (1978) Elimination of asialofetuin and asialoorosomucoid by the intact rat. Quantitative aspects of the hepatic clearance mechanism. *Biochim Biophys Acta.* **541(3)**, 372-84.
- 40 Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA y Rudd PM (2006) *Methods in Molecular Biology*, ed I Brockhausen-Schutzbach (Humana Press), 347: Glycobiology protocols, 125-144.
- Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Calvo FO y Vutyavanich T. (1987). Structure-function relationships of gonadotropins. *Recent Prog Horm Res.*; **43**:383-429.
- 45 Saxena BB y Rathnam P. (1976) Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. *J Biol Chem.* **251(4)**, 993-1005
- 50 Steelman SL y Pohley FM. (1953) Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* **53(6)**, 604-616.
- Steer CJ y Ashwell G. (1980) Studies on a mammalian hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins. Evidence for receptor recycling in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* **255(7)**, 3008-13.
- 55 Svensson EC, Soreghan B y Paulson JC. (1990) Organization of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation. *J Biol Chem.* **265(34)**:20863-20868.
- 60 Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N y Kobata A (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* **263(8)**, 3657-3663.
- Timossi CM, Barrios de Tomasi J, Zambrano E, González R, Ulloa-Aguirre A. (1998). A naturally occurring basically charged human follicle-stimulating hormone (FSH) variant inhibits FSH-induced androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator enzyme activity in vitro. *Neuroendocrinology.* **67(3)**, 153-163.
- 65 Timossi CM, Barrios-de-Tomasi J, González-Suárez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM y Ulloa-Aguirre A.

(2000). Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol.* **165(2)**, 193-205.

5 Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damian-Matsumura, P. y Chappel, S.C. (1988) Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum. Reprod.* **3**, 491-501.

10 Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damián-Matsumura, P. Jimenez, M, Zambrano, E y Diaz-Sanchez, V. (1992) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.* **7**, 23-30.

15 Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr, Beitins IZ y Padmanabhan V. (1995). Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev.* **16(6)**, 765-787.

20 Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P y Timossi C (2001). Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res.* **32(6)**, 520-532.

25 Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A y Nayudu P. (2003). Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *Biol Reprod.* **69(2)**, 379-389.

30 Van Lenten L y Ashwell G. (1972) The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. Development of a quantitative inhibition assay. *J Biol Chem.* **247(14)**, 4633-40.

35 Wide, L. y Albertsson-Wikland, K. (1990) Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 271-276.

Wide, L. y Bakos, O. (1993). More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 885-889.

40 Wide L, Naessén T, Sundström-Poromaa I, Eriksson K. (2007) Sulfonation and sialylation of gonadotropins in women during the menstrual cycle, after menopause, and with polycystic ovarian syndrome and in men. *J Clin Endocrinol Metab.*; **92(11)**, 4410-4417.

45 Zambrano E, Zariñán T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J y Ulloa-Aguirre A. (1999). Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants. *Endocrine.* **10(2)**, 113-121.

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

SEQ ID NO: 1

45 Polipéptido de hormona estimulante del folículo alfa

Número de registro AH007338

Secuencia de nucleótidos de FSH alfa

1 ATGGATTACT ACAGAAAATA TGCAGCTATC TTTCTGGTCA CATTGTCGGT GTTTCTGCAT
 61 GTTCTCCATT CCGCTCCTGA TGTGCAGGAT TGCCAGAAAT GCACGCTACA GGAAACCCA
 121 TTCTTCTCCC AGCCGGGTGC CCCAATACTT CAGTGCATGG GCTGCTGCTT CTCTAGAGCA
 181 TATCCCCTC CACTAAGGTC CAAGAAGACG ATGTTGGTCC AAAAGAACGT CACCTCAGAG
 241 TCCACTTGCT GTGTAGCTAA ATCATATAAC AGGGTCACAG TAATGGGGGG TTTCAAAGTG
 50 301 GAGAACCACA CGGCGTGCCA CTGCAGTACT TGTTATTATC ACAAATCTTA A

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

1 MDYYRKYAAI FLVTLVFLH VLHSAPDVQD CPECTLQENP FFSQPGAPIL QCMGCCFSRA
 61 YPTPLRSKKT MLVQKNVTSE STCCVAKSYN RVTVMGGFKV ENHTACHCST CYYHKS

55

SEQ ID NO: 2

Polipéptido de hormona estimulante del folículo beta

5 Número de registro NM_000510

Secuencia de nucleótidos de FSH beta

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

10

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

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

15 **SEQ ID NO: 3**

Beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 4

Número de registro L23767

20

Secuencia de nucleótidos de ST3GAL4

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

25

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

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

5 **SEQ ID NO: 4**

Beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1

Número de registro NM_003032

10

Secuencia de nucleótidos de ST6GAL1

1 ATGATTCACA CCAACCTGAA GAAAAAGTTC AGCTGCTGCG TCCTGGTCTT TCTTCTGTTT
 61 GCAGTCATCT GTGTGTGGAA GGAAAAGAAG AAAGGGAGTT ACTATGATTC CTTTAAATTG
 121 CAAACCAAGG AATTCCAGGT GTTAAAGAGT CTGGGGAAAT TGGCCATGGG GTCTGATTCC
 181 CAGTCTGTAT CCTCAAGCAG CACCCAGGAC CCCACAGGG GCCGCCAGAC CCTCGGCAGT
 241 CTCAGAGGCC TAGCCAAGGC CAAACCAGAG GCCTCCTTCC AGGTGTGGAA CAAGGACAGC
 301 TCTTCCAAAA ACCTTATCCC TAGGCTGCAA AAGATCTGGA AGAATTACCT AAGCATGAAC
 361 AAGTACAAAG TGTCTACAA GGGGCCAGGA CCAGGCATCA AGTTCAGTGC AGAGGCCCTG
 421 CGCTGCCACC TCCGGGACCA TGTGAATGTA TCCATGGTAG AGGTCACAGA TTTTCCCTTC
 481 AATACCTCTG AATGGGAGGG TTATCTGCCC AAGGAGAGCA TTAGGACCAA GGCTGGGCCT
 541 TGGGGCAGGT GTGCTGTTGT GTCGTCAGCG GGATCTCTGA AGTCCTCCCA ACTAGGCAGA
 601 GAAATCGATG ATCATGACGC AGTCCTGAGG TTTAATGGGG CACCCACAGC CAACTTCCAA
 661 CAAGATGTGG GCACAAAAC TACCATTCGC CTGATGAACT CTCAGTTGGT TACCACAGAG
 721 AAGCGCTTCC TCAAAGACAG TTTGTACAAT GAAGGAATCC TAATTGTATG GGACCCATCT
 781 GTATACCACT CAGATATCCC AAAGTGGTAC CAGAATCCGG ATTATAATTT CTTTAAACAAC
 841 TACAAGACTT ATCGTAAGCT GCACCCCAAT CAGCCCTTTT ACATCCTCAA GCCCCAGATG
 901 CCTTGGGAGC TATGGGACAT TCTTCAAGAA ATCTCCCCAG AAGAGATTCA GCCAAACCCC
 961 CCATCTCTG GGATGCTTGG TATCATCATC ATGATGACGC TGTGTGACCA GGTGGATATT
 1021 TATGAGTTCC TCCCATCCAA GCGCAAGACT GACGTGTGCT ACTACTACCA GAAGTTCTTC
 1081 GATAGTGCCT GCACGATGGG TGCCTACCAC CCGCTGCTCT ATGAGAAGAA TTTGGTGAAG
 1141 CATCTCAACC AGGGCACAGA TGAGGACATC TACCTGCTTG GAAAAGCCAC ACTGCCTGGC
 1201 TTCCGGACCA TTCACTGCTA A

Op-

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> **Ferring BV**

5 <120> Composición para la estimulación ovárica controlada
 <130> **P/66643.EP01**

<150> **EP 11176803.2**
 <151> 08-08-2011
 <160> **16**

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> **1**
 <211> **351**
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> **1**

atggattact	acagaaaata	tcgagctatc	tttctgggtca	cattgtcggt	gtttctgcat	60
gttctccatt	cgcctcctga	tgtgcaggat	tgcccagaat	gcacgctaca	ggaaaaccca	120
ttcttctccc	agccgggtgc	cccaatactt	cagtgcattg	gctgctgctt	ctctagagca	180
tatcccactc	cactaaggtc	caagaagacg	atggtgggtcc	aaaagaacgt	cacctcagag	240
tccacttgct	gtgtagctaa	atcatataac	agggtcacag	taatgggggg	tttcaaagtg	300
gagaaccaca	cggcgtgcc	ctgcagtact	tgttattatc	acaaatctta	a	351

<210> **2**
 <211> **390**
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> **2**

atgaagacac	tccagttttt	cttccttttc	tggtgctgga	aagcaatctg	ctgcaatagc	60
tgtgagctga	ccaacatcac	cattgcaata	gagaaagaag	aatgtcgttt	ctgcataagc	120
atcaacacca	cttgggtgtc	tggtactgct	tacaccaggg	atctggtgta	taaggaccca	180
gccaggccca	aatccagaa	aacatgtacc	ttcaaggaac	tggtatatga	aacagtgaga	240
gtgcccggct	gtgctcacca	tcgagattcc	ttgtatacat	accagtggtc	caccagtggt	300
cactgtggca	agtgtgacag	cgacagcact	gattgtactg	tgcgaggcct	ggggcccagc	360
tactgctcct	ttggtgaaat	gaaagaataa				390

25 <210> **3**
 <211> **999**
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> **3**

atgtgtcctg	caggctggaa	gtcctggcc	atggtggctc	tggtcctggt	cgtcatggtg	60
------------	------------	-----------	------------	------------	------------	----

ES 2 692 774 T3

tggattcca tctcccggga agacaggtac atcgagcttt tttatthttcc catcccagag 120
 aagaaggagc cgtgcctcca gggtaggca gagagcaagg cctctaagct ctttggcaac 180
 tactcccggg atcagcccat cttcctgagg cttgaggatt atttctgggt caagacgcca 240
 tctgcttacg agctgcctca tgggaccaag gggagtggag atctgctcct ccgggtgcta 300
 gccatcacca gctcctccat cccaagaac atccagagcc tcaggtgccg ccgctgtgtg 360
 gtcgtgggga acgggcaccg gctgcggaac agctcactgg gagatgcat caacaagtac 420
 gatgtggtca tcagattgaa caatgccccca gtggctggct atgagggtga cgtgggctcc 480
 aagaccacca tgcgtctctt ctaccctgaa tctgccact tcgaccccaa agtagaaaac 540
 aaccagaca cactcctcgt cctggtagct ttcaaggcaa tggacttcca ctggattgag 600
 accatcctga gtgataagaa ggggtgcca aagggtttct ggaaacagcc tcccctcctc 660
 tgggatgtca atcctaaaca gattcggatt ctcaaccct tcttcatgga gattgcagct 720
 gacaaactgc tgagcctgcc aatgcaacag ccacggaaga ttaagcagaa gccaccacg 780
 ggctgttgg ccatcacgct ggcctccac ctctgtgact tggtgacat tgccggcttt 840
 ggctaccag acgcctacaa caagaagcag accattcact actatgagca gatcacgctc 900
 aagtccatgg cggggctcagg ccataatgtc tcccagagg ccctggccat taagcggatg 960
 ctggagatgg gagctatcaa gaacctcacg tccttctga 999

<210> 4
 <211> 1221
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4
 atgattcaca ccaacctgaa gaaaaagttc agctgctgag tcctggtctt tcttctgttt 60
 gcagtcatct gtgtgtggaa ggaaaagaag aaaggagtt actatgattc ctttaaattg 120
 caaaccaagg aattccaggt gttaaagagt ctggggaat tggccatggg gtctgattcc 180
 cagtctgtat cctcaagcag caccaggac cccacaggg gccgccagac cctcggcagt 240
 ctgagaggcc tagccaaggc caaaccagag gcctccttcc aggtgtggaa caaggacagc 300
 tcttcaaaa accttatccc taggctgcaa aagatctgga agaattacct aagcatgaac 360
 aagtacaaag tgcctacaa ggggccagga ccaggcatca agttcagtgc agaggccctg 420
 cgctgccacc tccgggacca tgtgaatgta tccatggtag aggtcacaga ttttcccttc 480
 aatacctctg aatgggaggg ttatctgccc aaggagagca ttaggaccaa ggctgggcct 540
 tggggcaggc gtgctgttgt gtcgtcagcg ggatctctga agtcctccca actaggcaga 600
 gaaatcgatg atcatgacgc agtcctgagg ttaatgggg caccacagc caacttccaa 660
 caagatgtgg gcacaaaaac taccattcgc ctgatgaact ctgattggt taccacagag 720

ES 2 692 774 T3

aagcgcttcc tcaaagacag tttgtacaat gaaggaatcc taattgtatg ggacccatct 780
 gtataccact cagatatccc aaagtggtag cagaatccgg attataattt ctttaacaac 840
 tacaagactt atcgtaaact gcacoccaat cagccctttt acatcctcaa gcccagatg 900
 ccttgggagc tatgggacat tcttcaagaa atctccccag aagagattca gccaaacccc 960
 ccatcctctg ggatgcttgg tatcatcatc atgatgacgc tgtgtgacca ggtggatatt 1020
 tatgagttcc tcccatccaa gcgcaagact gacgtgtgct actactacca gaagttcttc 1080
 gatagtgcct gcacgatggg tgcctaccac ccgctgctct atgagaagaa tttggtgaag 1140
 catctcaacc agggcacaga tgaggacatc tacctgcttg gaaaagccac actgctgggc 1200
 ttccggacca ttcactgcta a 1221

<210> 5
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

5

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
 20 25 30
 Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
 35 40 45
 Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
 50 55 60
 Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
 65 70 75 80
 Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
 85 90 95
 Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
 100 105 110
 Tyr His Lys Ser
 115

<210> 6
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

ES 2 692 774 T3

<400> 6

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile
 1 5 10 15
 Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys
 20 25 30
 Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
 35 40 45
 Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys
 50 55 60
 Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg
 65 70 75 80
 Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
 85 90 95
 Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
 100 105 110
 Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys
 115 120 125

Glu

<210> 7
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

5

Met Cys Pro Ala Gly Trp Lys Leu Leu Ala Met Leu Ala Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Val Val Met Val Trp Tyr Ser Ile Ser Arg Glu Asp Arg Tyr Ile Glu
 20 25 30
 Leu Phe Tyr Phe Pro Ile Pro Glu Lys Lys Glu Pro Cys Leu Gln Gly
 35 40 45
 Glu Ala Glu Ser Lys Ala Ser Lys Leu Phe Gly Asn Tyr Ser Arg Asp
 50 55 60
 Gln Pro Ile Phe Leu Arg Leu Glu Asp Tyr Phe Trp Val Lys Thr Pro
 65 70 75 80

ES 2 692 774 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 692 774 T3

<210> 8
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Leu Arg Phe Asn Gly Ala Pro Thr Ala Asn Phe Gln Gln Asp Val Gly

ES 2 692 774 T3

210 215 220

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

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

Trp Asp Pro Ser Val Tyr His Ser Asp Ile Pro Lys Trp Tyr Gln Asn
 260 265 270

Pro Asp Tyr Asn Phe Phe Asn Asn Tyr Lys Thr Tyr Arg Lys Leu His
 275 280 285

Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile Leu Lys Pro Gln Met Pro Trp Glu Leu
 290 295 300

Trp Asp Ile Leu Gln Glu Ile Ser Pro Glu Glu Ile Gln Pro Asn Pro
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Gly Met Leu Gly Ile Ile Ile Met Met Thr Leu Cys Asp
 325 330 335

Gln Val Asp Ile Tyr Glu Phe Leu Pro Ser Lys Arg Lys Thr Asp Val
 340 345 350

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

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

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

Phe Arg Thr Ile His Cys
 405

<210> 9

<211> 39

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR FSHa-fw

<400> 9

10 ccaggatccg ccaccatgga ttactacaga aaaatatgc

39

<210> 10

<211> 31

<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR FSHa-rev	
5		
	<400> 10	
	ggatggctag cttaagattt gtgataataa c	31
	<210> 11	
	<211> 35	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR FSHb-fw	
15		
	<400> 11	
	ccaggcgcgc caccatgaag aactccagt ttttc	35
	<210> 12	
	<211> 36	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR FSHb-rev	
25		
	<400> 12	
	ccgggttaac ttattattot ttcatttcac caaagg	36
	<210> 13	
	<211> 37	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR 2,3STfw	
35		
	<400> 13	
	ccaggatccg ccaccatgtg tctgcaggc tggaagc	37
	<210> 14	
	<211> 35	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR 2,3STrev	
45		
	<400> 14	
	tttttttctt aagtcagaag gacgtgaggt tcttg	35
	<210> 15	
	<211> 36	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR 2,6STfw	
55		
	<400> 15	
	ccaggatccg ccaccatgat tcacaccaac ctgaag	36

<210> 16
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Cebador de PCR 2,6STrev

<400> 16
tttttttctt aagttagcag tgaatggtcc gg

32

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto que comprende FSH para su uso en el tratamiento de la esterilidad en un sujeto que está en riesgo de OHSS y que tiene un nivel de AMH en suero de ≥ 15 pmol/l, en el que el producto va a administrarse a una dosis de, o dosis equivalente a, 0,09 a 0,19 μg de FSH recombinante derivada de línea celular de un ser humano por kilogramo de peso corporal del paciente por día, en donde la FSH incluye $\alpha 2,3$ - y $\alpha 2,6$ -sialilación, en el que del 1% al 99% de la sialilación total es $\alpha 2,6$ -sialilación.
- 10 2. Un producto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se trata la esterilidad mediante estimulación ovárica controlada.
3. Un producto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el tratamiento de la esterilidad incluye una etapa para determinar el nivel de AMH en suero de la paciente.

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

Figura 1. Vector de expresión de FSH

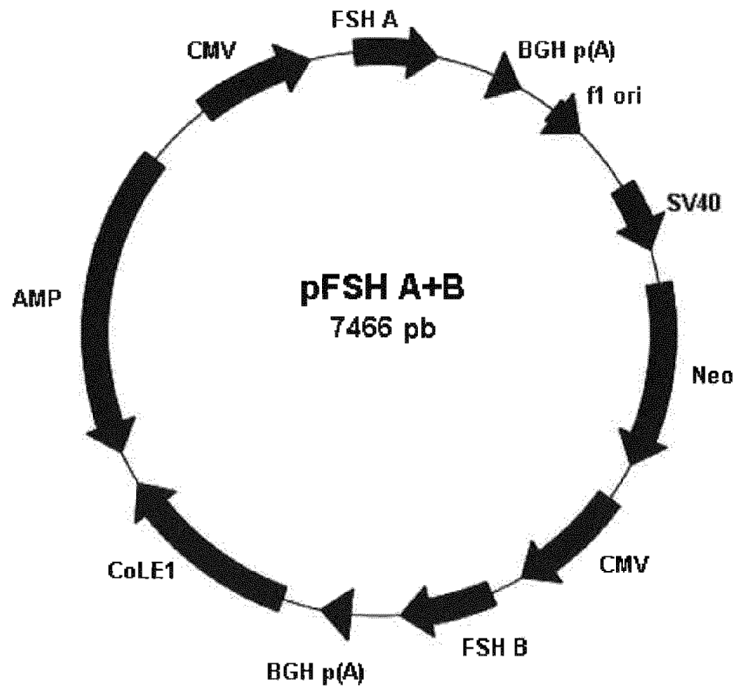


Figura 2. Vector de expresión de α 2,3-sialiltransferasa (ST3GAL4)

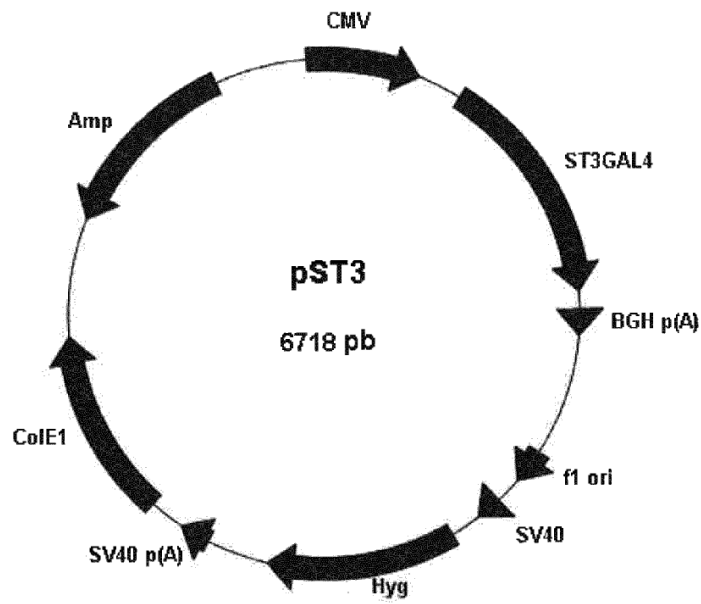


Figura 3. Vector de expresión α 2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1)

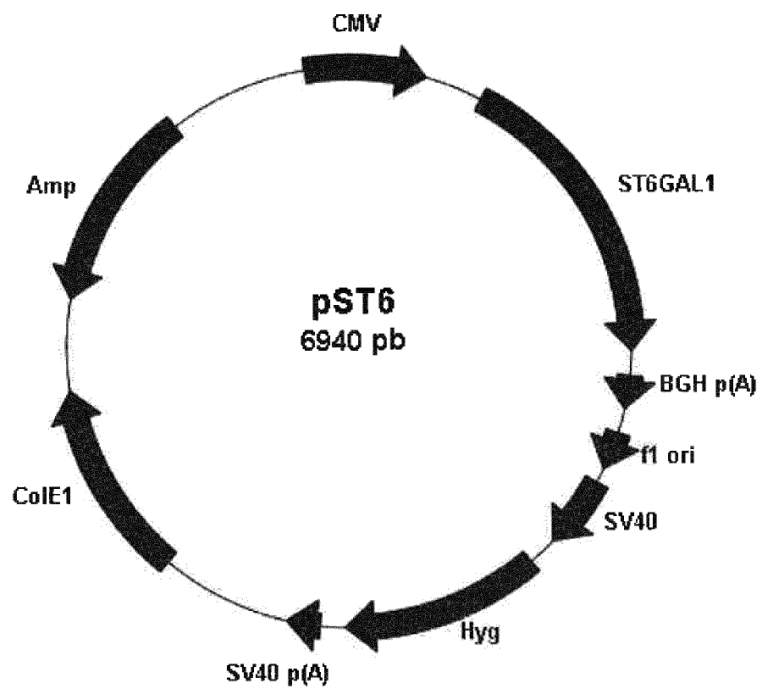
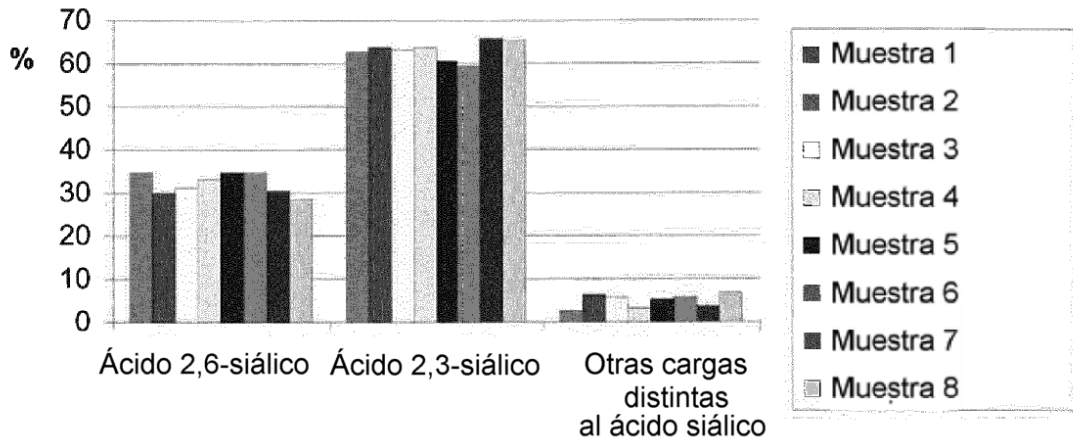
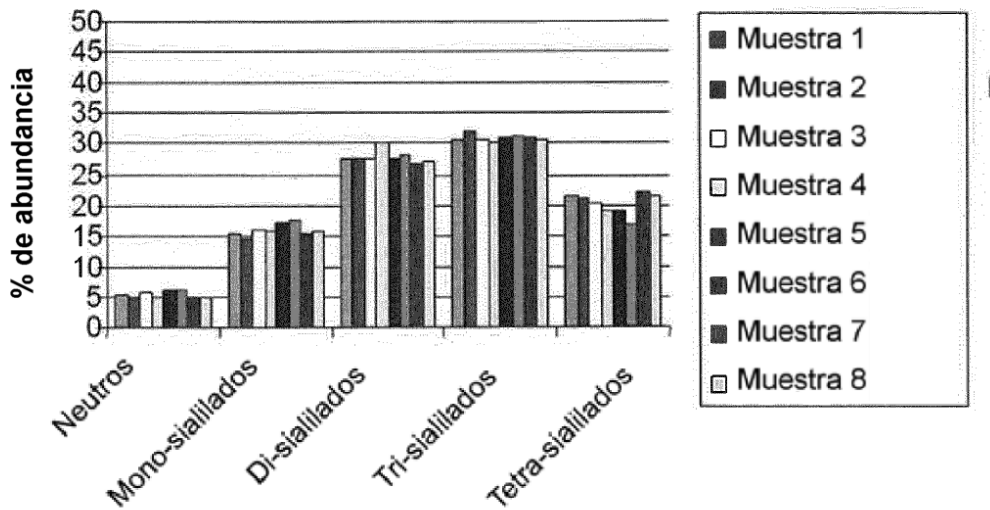


Fig 4 % de abundancia (eje y) de la distribución de ácido siálico



% de abundancia de la distribución de ácido siálico

Fig 5 % de abundancia (eje y) de la distribución de carga de glicanos de rFSH



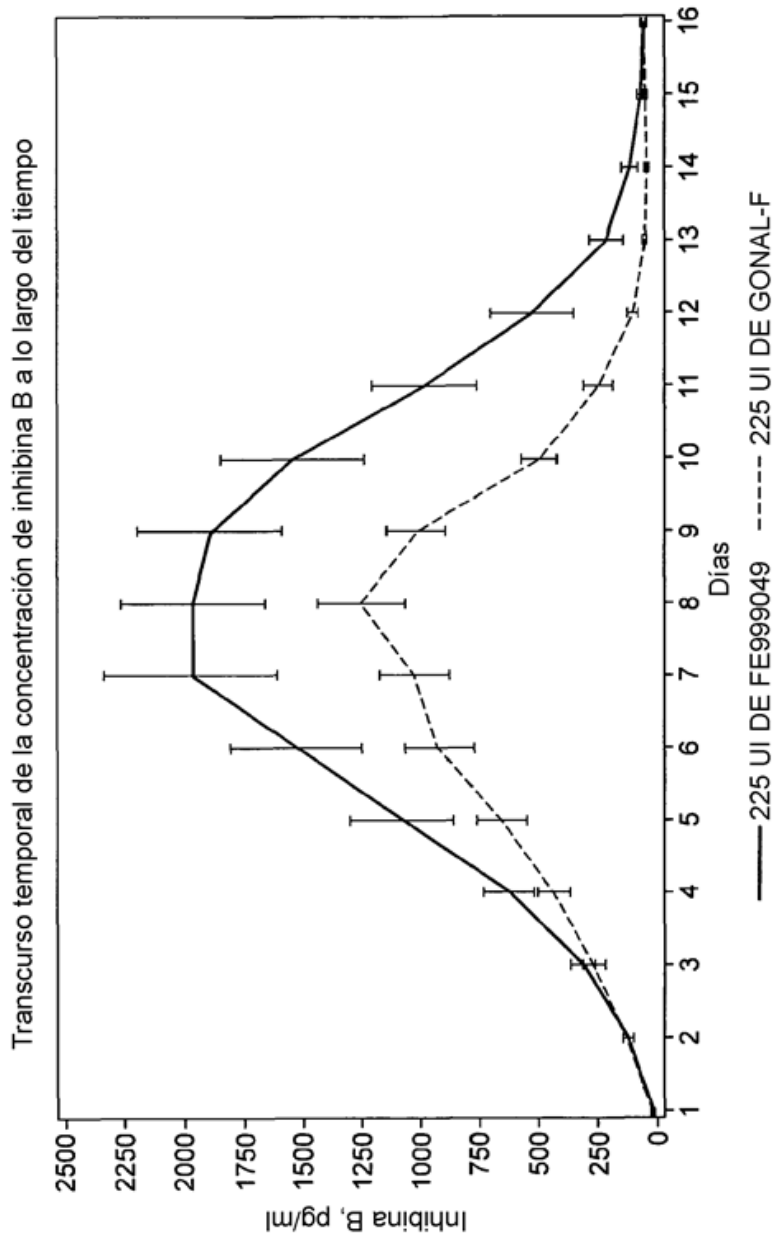


FIG. 6

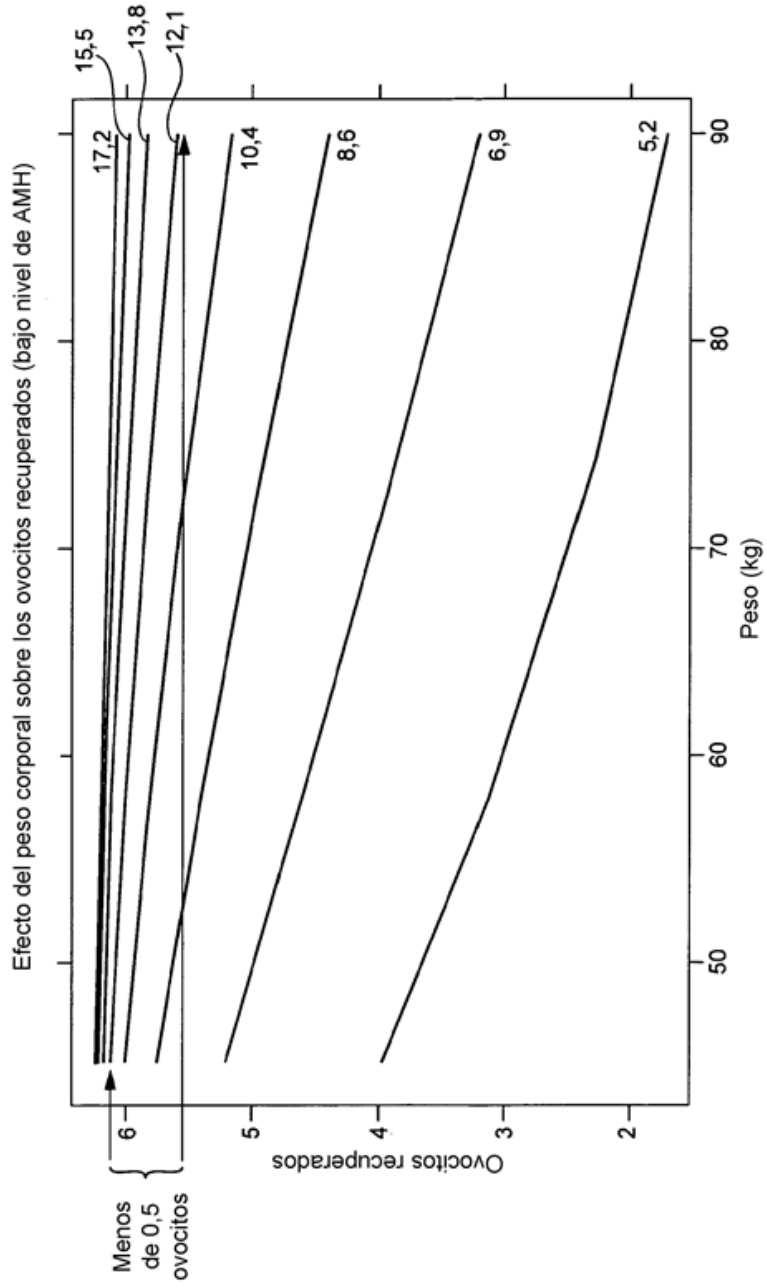


FIG. 7

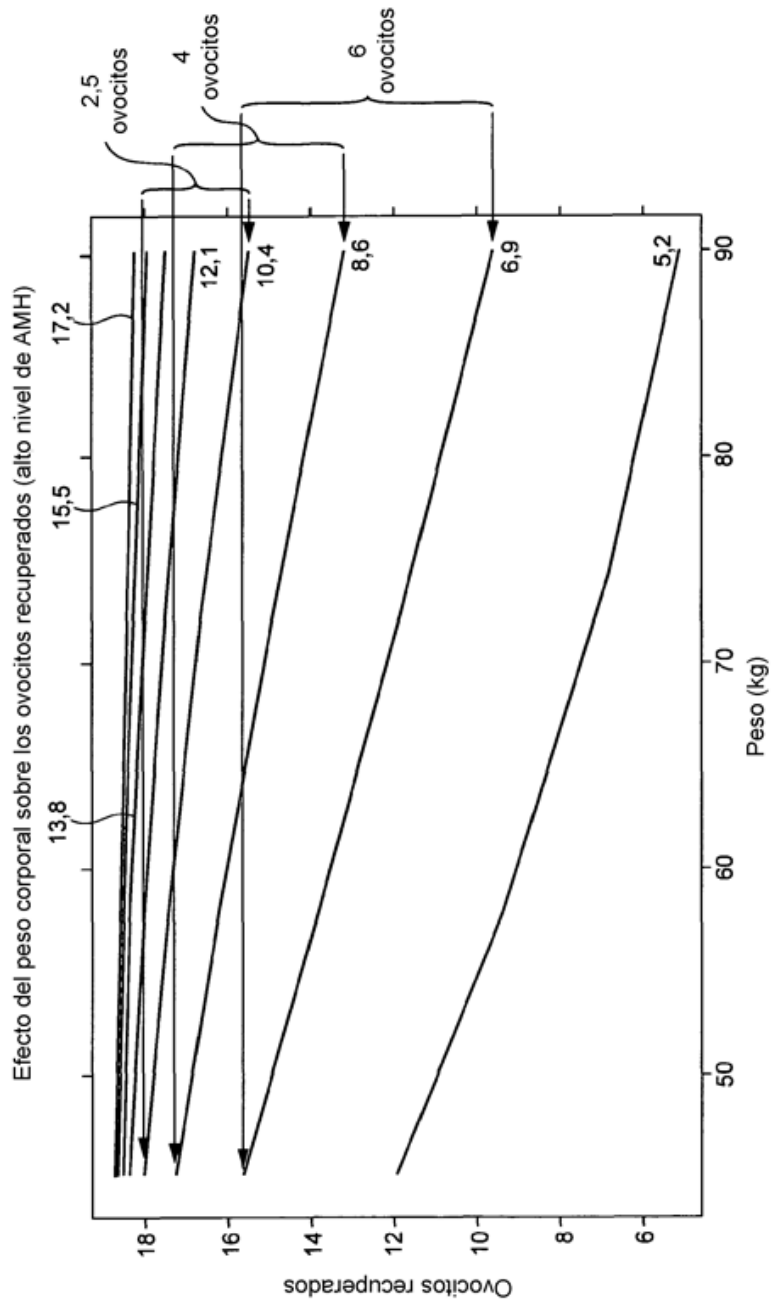


FIG. 8