

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 083**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 38/24 (2006.01)

C07K 14/59 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2011 E 16168841 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3075744**

54 Título: **Hormona estimulante del folículo humana recombinante mejorada**

30 Prioridad:

04.08.2010 WO PCT/EP2010/004769

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

02.06.2020

73 Titular/es:

**GLYCOTOPE GMBH (100.0%)
Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**GOLETZ, STEFFEN y
STÖCKL, LARS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 764 083 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

Hormona estimulante del folículo humana recombinante mejorada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de las gonadotropinas. En particular, se proporciona la hormona estimulante de folículo humana recombinante (rhFSH) mejorada. Esta rhFSH mejorada es útil en el tratamiento de la infertilidad, en particular en pacientes humanos.

Antecedentes de la invención

10 Las gonadotropinas son un grupo de hormonas de proteínas que regulan la función gonadal en el macho y la hembra y por lo tanto juegan un papel importante en la fertilidad humana. Estas son secretadas por las células gonadotropas de la glándula pituitaria de los vertebrados después de la estimulación por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Las gonadotropinas son glicoproteínas heterodiméricas incluyendo la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica (CG). Las gonadotropinas comparten idénticas subunidades alfa, pero comprenden diferentes subunidades beta que garantizan la especificidad de unión al receptor.

15 FSH comprende una subunidad alfa de 92 aminoácidos y una subunidad beta de 111 aminoácidos que confiere la unión específica al receptor de FSH. Ambas subunidades de la proteína natural son modificadas por glicosilación. La subunidad alfa es glicosilada de forma natural en Asn52 y Asn78 y la subunidad beta en Asn7 y Asn24. Ambas subunidades se producen en las células como proteínas precursoras y luego son procesadas y secretadas. FSH regula el desarrollo, crecimiento, maduración puberal, y procesos reproductivos del cuerpo. En particular, se estimula la maduración de las células germinales y por lo tanto está implicado en la espermatogénesis y la foliculogénesis.

20 La foliculogénesis es inducida por FSH, por ejemplo, mediante la unión de FSH a los receptores de FSH en la superficie de células de la granulosa. Los receptores de FSH son receptores acoplados a proteínas G que activan la proteína G acoplada en la unión de FSH. La proteína G a su vez activa la adenilil ciclasa, que resulta en la producción de cAMP, una segunda molécula mensajera. La creciente concentración de cAMP en la célula activa varios objetivos en dirección 3', en particular, proteína quinasas dependientes de cAMP, que luego conducen a la síntesis de progesterona y estradiol. La progesterona y estradiol se secretan por las células de la granulosa, que inducen la foliculogénesis. Tras la estimulación de las células de la granulosa por FSH, que también liberan inhibina-B que forma un bucle de realimentación negativa, inhibiendo la producción y secreción de FSH en la glándula pituitaria. La inhibina-B ha demostrado ser un buen marcador sustituto para la estimulación ovárica por FSH.

30 FSH se utiliza ampliamente en el tratamiento de la infertilidad, ya sea solo o en combinación con otros agentes, en particular LH. En la técnica, en general, la FSH purificada a partir de orina humana post-menopáusica (FSH urinaria) o FSH producida de forma recombinante por células de ovario de hámster chino (CHO) se ha utilizado para el tratamiento humano. Sin embargo, existe una heterogeneidad considerable asociada con preparaciones de FSH debido a las diferentes isoformas presentes. Las isoformas de FSH individuales presentan secuencias de aminoácidos idénticas pero difieren en el grado y la naturaleza de su glicosilación. Las isoformas particulares se caracterizan por la heterogeneidad de las estructuras de ramificación de carbohidratos y diferentes cantidades de incorporación de ácido siálico (una unidad de monosacárido terminal de carga negativa), ambos de los cuales influyen la bioactividad específica de la isoforma. Por lo tanto, el patrón de glicosilación de la FSH tiene una influencia significativa en su actividad biológica.

40 Sin embargo, la FSH urinaria de diferentes donantes y diferentes preparaciones puede variar significativamente en sus estructuras de carbohidratos, resultando en una alta variación de lote a lote. También hay preocupaciones de seguridad con respecto a la presencia de virus en los productos urinarios. Además, FSH obtenida a partir de células CHO exhibe un patrón de glicosilación específico para estas células de hámster que no es idéntico a los patrones de glicosilación humanos. Estas diferencias resultan en diferentes actividades biológicas y efectos adversos de la FSH obtenida y, por lo tanto, de las preparaciones farmacéuticas que se van a administrar al paciente.

En vista de esto, es un objeto de la presente invención proporcionar preparaciones de FSH mejoradas.

45 Además, es un objeto de la presente invención proporcionar preparaciones de FSH con nuevas características terapéuticas o farmacológicas.

Además, es un objeto de la presente invención proporcionar preparaciones de FSH que tienen un patrón de glicosilación mejorado.

Resumen de la invención

50 Los presentes inventores han encontrado que las preparaciones de FSH mejoradas obtenidas a partir de células humanas que preferiblemente han sido seleccionadas para una glicosilación optimizada son capaces de inducir la secreción de esteroides sexuales tales como estradiol y progesterona en concentraciones más bajas que las preparaciones de FSH obtenidas a partir de orina humana correspondiente o células CHO. Por lo tanto, las

preparaciones de FSH de acuerdo con la presente invención tienen características sorprendentes que son útiles en la terapia.

La presente invención proporciona, en un primer aspecto, una preparación de FSH recombinante, en donde la FSH recombinante en la preparación tiene un patrón de glicosilación que comprende las siguientes características:

- 5 (i) una cantidad relativa de glicanos que lleva N-acetilglucosamina bisectante (bisGlcNAc) de al menos 20% de la cantidad total de glicanos unido a FSH en la preparación; y
- (ii) una cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado de al menos 30% de la cantidad total de ácidos siálicos; y.
- (iii) una cantidad relativa de glicanos que llevan un grupo sulfato de al menos el 3% de la cantidad total de glicanos unidos a FSH en la preparación.

10 La preparación de FSH recombinante se puede obtener mediante la producción en células humanas o una línea celular humana, preferiblemente en la línea celular GT-5s (DSM ACC3078, depositado el 28 de julio de 2010). Se encontró que la FSH producida en una línea celular respectiva resulta en un perfil de glicosilación mejorado como se describe arriba y abajo.

15 También se proporciona una composición farmacéutica, que comprende la FSH recombinante de acuerdo con la presente invención.

Además, la presente invención se refiere a la preparación de FSH recombinante o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento de la infertilidad.

20 Además, la presente invención se refiere a la preparación de FSH recombinante o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para inducir y/o estimular la secreción de esteroides sexuales también independientes de cAMP.

Algunos experimentos han demostrado que los efectos de baja concentración de la FSH de acuerdo con la invención son en determinadas circunstancias independientes de la señalización de cAMP en las células diana. Por lo tanto, los experimentos sugieren que las preparaciones de FSH mejoradas de acuerdo con la presente invención pueden inducir la secreción de esteroides sexuales tales como la progesterona en concentraciones sin un aumento de la secreción de cAMP. Por lo tanto, se cree que ciertas realizaciones de las preparaciones de FSH mejoradas de acuerdo con la presente invención son capaces de inducir una ruta de transducción de señales que conduce a la secreción de esteroides sexuales, que es diferente de la ruta de transducción de señales conocida utilizando cAMP como segundo mensajero descrito para las preparaciones de FSH utilizadas comúnmente.

30 Además, la presente invención se refiere a la preparación de FSH recombinante o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para estimular o coestimular la maduración de células germinales por un proceso biológico que es independiente de la señalización de cAMP.

35 Además, la presente invención se refiere a la preparación de FSH recombinante o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para inducir y/o estimular la secreción de esteroides sexuales en las concentraciones de FSH en la que no se induce liberación de cAMP detectable por encima de la liberación de cAMP en ausencia de FSH.

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente invención serán evidentes para los expertos en el arte a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

40 Como se utiliza en este documento, las siguientes expresiones tienen por objeto en general tener preferiblemente los significados que se exponen a continuación, excepto en la medida en que el contexto en el cual se utilizan, indique lo contrario.

45 La expresión "comprenden", como se usa en este documento, además de su significado ordinario incluye y también específicamente se refiere a las expresiones "consisten esencialmente en" y "consiste en". Por lo tanto, la expresión "comprende" se refiere a realizaciones en donde el objeto que "comprende" específicamente elementos enumerados no comprenden otros elementos, así como realizaciones en donde el objeto que "comprende" elementos enumerados específicamente puede y/o, de hecho, no abarcar otros elementos.

50 El término "FSH" se refiere a la hormona estimulante del folículo, una gonadotropina. FSH es una glicoproteína compuesta de dos subunidades, denominadas subunidades alfa y beta. Preferiblemente, la FSH es FSH humana, en particular la FSH humana compuesta de una subunidad alfa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una subunidad beta que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Sin embargo, uno o más, tal como 1, 1 o 2, hasta 3, hasta 5, hasta 10 o hasta 20, sustitución de aminoácidos, adición y/o deleciones pueden estar presentes en

una o ambas subunidades. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa comparte una homología global o identidad de al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1. Además, la secuencia de aminoácidos de la subunidad beta comparte preferiblemente una homología global o identidad de al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2. Las subunidades de la FSH son preferiblemente dos cadenas polipeptídicas separadas, sin embargo, el término "FSH" como se utiliza en este documento también abarca realizaciones en donde las dos subunidades se unen covalentemente entre sí, por ejemplo, por agentes de reticulación o una cadena polipeptídica de unión, y realizaciones, en donde una o ambas subunidades se dividen a su vez en varias cadenas polipeptídicas. Preferiblemente, la FSH de acuerdo con la invención es capaz de unirse a y/o activar el receptor de FSH, preferiblemente el receptor de FSH humano. El término "FSH" como se usa en este documento, en particular, se refiere a todas las proteínas de FSH en una preparación. Por lo tanto, el término "FSH", en particular, se refiere a la totalidad de todas las proteínas de FSH en una composición o preparación de FSH.

Preferiblemente, dos subunidades de la proteína de FSH comprenden una o más estructuras de carbohidratos unidas a la cadena polipeptídica. Más preferiblemente, las estructuras de carbohidratos se unen a residuos de asparagina de las subunidades. En realizaciones particularmente preferidas, la subunidad alfa se compone de dos estructuras de carbohidratos unidas a Asn52 y Asn78 y/o la subunidad beta comprende dos estructuras de carbohidratos unidos a Asn7 y Asn24. Los residuos de aminoácidos que llevan las estructuras de carbohidratos se designan con respecto a las secuencias de aminoácidos humanos de las subunidades alfa y beta de acuerdo con SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente. La parte de azúcar de FSH humana se compone preferiblemente de fucosa, galactosa, manosa, galactosamina, glucosamina, y/o ácido siálico.

FSH como se utiliza de acuerdo con la presente invención preferiblemente es FSH recombinante, más preferiblemente FSH recombinante humana. El término "FSH recombinante" se refiere a FSH que no se produce de forma natural por un cuerpo humano o animal vivo y, a continuación, se obtiene partir de una muestra derivada de la misma, tal como orina, sangre u otro líquido corporal, heces o tejido del cuerpo humano o animal. Preferiblemente, la FSH recombinante se obtiene a partir de células que han sido diseñadas biotecnológicamente, en particular células que han sido transformadas o transfectadas con un ácido nucleico que codifica FSH o las subunidades alfa o beta de FSH. De acuerdo con las realizaciones preferidas, la FSH recombinante se obtiene a partir de células humanas que comprenden un ácido nucleico exógeno que codifica FSH. Los ácidos nucleicos exógenos respectivos se pueden introducir, por ejemplo, mediante el uso de uno o más vectores de expresión, que pueden ser introducidos en la célula huésped, por ejemplo, a través de la transfección. Los métodos respectivos para producir recombinantemente proteínas y FSH son bien conocidos en la técnica anterior y, por lo tanto, no necesitan descripción adicional.

La FSH de acuerdo con la invención preferiblemente es FSH, más preferiblemente FSH humana, que puede obtenerse por la producción en una célula humana, preferiblemente una línea celular humana. La línea celular humana preferiblemente se deriva de las células de la sangre humana, en particular, es una línea celular mieloide, preferiblemente una línea celular de leucemia mieloide. La línea celular preferiblemente es inmortalizada. En una realización preferida, la línea celular para la producción de la FSH de acuerdo con la invención es la línea celular GT-5s, depositadas el 28 de julio de 2010 bajo el número de acceso DSM ACC3078 de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (DE), o una línea celular derivada de la misma, o una línea celular homóloga. GT-5s es una línea celular de leucemia mieloide humana inmortalizada, que es capaz de proporcionar un patrón de glicosilación específico como se describe en este documento. De acuerdo con la presente invención, los términos "GT-5s" y "línea celular GT-5s" también incluyen células o líneas celulares derivadas de GT-5s. Una línea celular que se deriva de GT-5s, por ejemplo, se puede obtener por selección aleatoria o específicamente de un único clon o un grupo de células a partir de un cultivo de GT-5s, opcionalmente después del tratamiento de las células GT-5s con el fin de mejorar su tasa de mutación o alterando genéticamente una línea celular GT-5s. El clon seleccionado o grupo de células pueden ser además tratadas como se describe anteriormente y/u otras rondas de selección se puede realizar. Una línea celular que es homóloga a GT-5s, en particular, es una línea celular inmortalizada mieloide humana. Preferiblemente, una línea celular derivada de su homóloga a GT-5s es capaz de proporcionar FSH que tiene un patrón de glicosilación similar al obtenido a partir de GT-5s. Preferiblemente, FSH que es producida por una línea celular derivada de su homóloga a GT-5s tiene una o más de las características de glicosilación como se describe en este documento, en particular una cantidad relativa de glicanos que lleva N-acetilglucosamina bisectante (bisGlcNAc) de al menos 20% ; y/o una cantidad relativa de glicanos que lleva fucosa de al menos 30%; y/o una cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado de al menos 30%; y/o un patrón de glicosilación diverso. De acuerdo con una realización, la línea celular derivada de su homóloga a GT-5s es capaz de expresar FSH que tiene un patrón de glicosilación como se describe en este documento como preferido, en particular un patrón de glicosilación seleccionado de la Tabla 1. El patrón de glicosilación similar de FSH que es producido por la línea celular derivada de su homóloga a GT-5s difiere preferiblemente del patrón de glicosilación de FSH obtenida de GT-5s por 20% o menos, más preferiblemente 15% o menos, 10% o menos, o 5% o menos, en particular, en uno o más, preferiblemente todas las propiedades de glicosilación seleccionadas del grupo que consiste en la cantidad relativa de bisGlcNAc, la cantidad relativa de glicanos sialilados, la cantidad relativa de glicanos sulfatados, la cantidad relativa de ácidos siálicos 2,6-acoplados, la cantidad relativa de fucosa, la cantidad relativa de glicanos tetraantennarios, la cantidad relativa de las ramas de glicano que llevan galactosa, y el número Z. Además, la FSH de acuerdo con la invención preferiblemente es

FSH, más preferiblemente FSH humana, que tiene una o más características específicas de glicosilación como se revela en este documento, preferiblemente un patrón de glicosilación seleccionado de la Tabla 1. La línea celular GT-5s, así como líneas celulares derivadas de los mismos y líneas celulares homólogas a la misma son, en particular ventajosos ya que proporcionan una producción de proteínas muy estable y homogénea, en particular con respecto a la proteína de FSH. Tienen una muy buena consistencia de lote a lote, es decir, las proteínas producidas y su patrón de glicosilación son similares cuando se obtienen de diferentes series de producción o cuando se produce a diferentes escalas y/o con diferentes procedimientos de cultivo. En particular, el patrón de glicosilación diverso como se describe en este documento es altamente reproducible en diferentes series de producción que utilizan estas líneas celulares para la expresión de FSH.

La FSH de acuerdo con la presente invención está glicosilada, esto es, que es modificada por uno o más, preferiblemente cuatro, oligosacáridos unidos a las cadenas polipeptídicas. Estos oligosacáridos, también llamados glicanos o carbohidratos pueden ser, cadenas de sacáridos lineales o ramificadas y preferiblemente son cadenas de oligosacáridos N-ligados de tipo complejo. Dependiendo del número de ramas del oligosacárido se denomina mono-, bi-, tri- o tetraantenario (o incluso pentaantenario). Un oligosacárido monoantenario es no ramificado, mientras que un oligosacárido bi-, tri- u tetraantenario tiene uno, dos o tres ramas, respectivamente. Una glicoproteína con un mayor antenarior por lo tanto tiene más puntos finales de oligosacáridos y puede transportar más unidades de sacáridos funcionales terminales tales como, por ejemplo, ácidos siálicos. "Al menos triantenario" como se utiliza en este documento se refiere a oligosacáridos que tienen un antenarior de al menos 3, incluyendo oligosacáridos triantenario, tetraantenaria y pentaantenario. "Al menos tetraantenario" como se utiliza en este documento se refiere a oligosacáridos que tienen un antenarior de al menos 4, incluyendo oligosacáridos tetraantenario y pentaantenario. Con respecto a los N-glicanos de tipo complejo, un residuo de GlcNAc bisectante preferiblemente no se considera como una rama o antena y, por lo tanto, no se suma al antenarior de la FSH.

El patrón de glicosilación de FSH como se denomina en este documento, en particular, se refiere al patrón de glicosilación en general de todas las proteínas de FSH en una preparación de FSH de acuerdo con la presente invención. En particular, cualquiera de las estructuras de glicano comprendidas en la proteína de FSH y, por lo tanto, unidos a las cadenas polipeptídicas de FSH en la preparación de FSH se consideran y se reflejan en el patrón de glicosilación.

El término "ácido siálico", en particular, se refiere a cualquier derivado N- u O-sustituido de ácido neuramínico. Puede referirse a tanto el ácido 5-N-acetilneuramínico y ácido 5-N-glicolilneuramínico, pero preferiblemente sólo se refiere a ácido 5-N-acetilneuramínico. El ácido siálico, en particular el ácido 5-N-acetilneuramínico se une preferiblemente a una cadena de carbohidratos a través de un enlace 2,6 o 2,3. Preferiblemente, en las preparaciones de FSH descritas en este documento están presentes ácidos siálicos tanto 2,3-, así como 2,6 acoplados.

El grado de sialilación de la FSH normalmente se expresa como número Z. El número Z indica la carga negativa relativa de las estructuras de glicano de una glicoproteína. El número Z se calcula por la fórmula:

$$Z = A1\% * 1 + A2\% * 2 + A3\% * 3 + A4\% * 4$$

en donde A1% es el porcentaje de glicanos con una carga de -1, A2% es el porcentaje de glicanos con una carga de -2, A3% es el porcentaje de glicanos con una carga de -3, y A4% es el porcentaje de glicanos con una carga de -4. Estos porcentajes se calculan con respecto a todos los glicanos unidos a la FSH, incluyendo cargada, así como glicanos no cargados. La carga de los glicanos puede ser proporcionada por cualquiera de las unidades de monosacárido o sustituyentes cargadas comprendidas en el glicano, en particular, por los residuos de ácido siálico y/o grupos sulfato y/o grupos fosfato. Dado que la carga de los glicanos de FSH generalmente sólo se determina por sus residuos de ácido siálico y la FSH en general tiene cuatro estructuras de glicano, el número Z es una indicación de la cantidad de ácidos siálicos en la FSH o la acidez de la FSH. Sin embargo, cuando la FSH comprende también una cantidad significativa de glicanos sulfatados, el número Z es una indicación de las cantidades combinadas de los ácidos siálicos y grupos sulfato.

Una "cantidad relativa de glicanos" de acuerdo con la invención se refiere a un porcentaje específico o intervalo de porcentaje de los glicanos unidos a las glicoproteínas de la FSH de una preparación de FSH o en una composición que comprende FSH, respectivamente. En particular, la cantidad relativa de los glicanos se refiere a un porcentaje específico o intervalo de porcentaje de todos los glicanos comprendidos en las proteínas de FSH y, por lo tanto, unidos a las cadenas polipeptídicas de FSH en una preparación de FSH o en una composición que comprende FSH. 100% de los glicanos se refiere a todos los glicanos unidos a las glicoproteínas de FSH de la preparación de FSH o en una composición que comprende FSH, respectivamente. Por ejemplo, una cantidad relativa de glicanos que lleva GlcNAc bisectante de 60% se refiere a una preparación de FSH en donde 60% de todos los glicanos comprendidos en las proteínas de FSH y, por lo tanto, unidos a las cadenas polipeptídicas de FSH en dicha preparación de FSH comprenden un residuo de GlcNAc bisectante, mientras que 40 % de todos los glicanos comprendidos en las proteínas de FSH y, por lo tanto, unidas a las cadenas polipeptídicas de FSH en dicha preparación de FSH no comprenden un residuo de GlcNAc bisectante.

Los números dados en este documento, en particular, las cantidades relativas de una propiedad de glicosilación específica, preferiblemente son para ser entendidas como números aproximados. En particular, los números pueden ser

preferiblemente de hasta 10% superior y/o inferior, en particular hasta 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% superior y/o inferior.

5 Una "preparación de FSH" puede ser cualquier composición o sustancia que comprende o que consiste en FSH. Puede ser en forma sólida o líquida y puede comprender ingredientes adicionales, además de FSH. En particular, una preparación de FSH puede ser una solución que comprende FSH y un solvente apropiado tal como agua y/o alcohol, o un polvo obtenido, por ejemplo, después de la liofilización de una solución que contiene FSH. Los ejemplos apropiados de una preparación de FSH son composición obtenida después de la expresión de FSH en las células, en particular, después de la purificación de la FSH, o composiciones farmacéuticas que comprenden FSH. Una preparación de FSH puede contener, además de FSH, por ejemplo, solventes, diluyentes, excipientes, estabilizantes, conservantes, sales, adyuvantes y/o surfactantes. El término "preparación de FSH" se usa en este documento, en particular, en el sentido de una "composición que comprende FSH". Estos términos se utilizan preferiblemente como sinónimos en este documento.

10 Una "cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado" se refiere a un porcentaje específico o intervalo de porcentaje de la cantidad total de ácidos siálicos son ácidos siálicos 2,6-acoplados. Una cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado de 100% de este modo significa que todos los ácidos siálicos son ácidos siálicos 2,6-acoplados. Por ejemplo, una cantidad relativa de ácidos siálicos 2,6-acoplados de 60% se refiere a una preparación de FSH en donde 60% de todos los ácidos siálicos comprendidos en las proteínas de FSH y, por lo tanto, unidos a las cadenas de oligosacáridos de las proteínas de FSH en dicha preparación de FSH están unidos a través de un enlace 2,6 mientras que el 40% de todos los ácidos siálicos comprendidos en las proteínas de FSH y, por lo tanto, unidos a las cadenas de oligosacáridos de las proteínas de FSH en dicha preparación de FSH no están unidos a través de un enlace 2,6, pero por ejemplo a través de un enlace 2,3 o un enlace 2,8.

15 El término "patrón de glicosilación diverso", en particular, se refiere al patrón de glicosilación de las proteínas de FSH en una preparación o composición cuyo patrón de glicosilación comprende múltiples estructuras de glicano diferentes. Diferentes estructuras de glicano son estructuras de oligosacáridos que difieren en la presencia/ausencia, cantidad y/o posición de al menos una unidad de monosacárido y/o al menos una modificación química tal como, por ejemplo, residuos de sulfato, residuos de acetilo o similares. Una "diferente estructura de glicano" específica preferiblemente sólo se considera a este respecto si su cantidad relativa es al menos 0.02%, más preferiblemente al menos 0.03%, al menos 0.05%, al menos 0.07%, al menos 0.1%, al menos 0.15%, al menos 0.2%, al menos 0.25%, al menos 0.3% o al menos 0.5% de la cantidad total de las estructuras de glicano en el patrón de glicosilación. Un patrón de glicosilación diverso, en particular, es un patrón de glicosilación que comprende al menos 5 diferentes estructuras de glicanos.

20 Preferiblemente, el patrón de glicosilación diverso comprende al menos 7, más preferiblemente al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55 y más preferiblemente al menos 60 estructuras de glicanos diferentes. Un patrón de glicosilación diverso, en particular, también se refiere a un patrón de glicosilación de FSH en una preparación o composición cuyo patrón de glicosilación comprende además diferentes estructuras de glicano de FSH obtenida de células CHO en una preparación o composición respectiva. En particular, el patrón de glicosilación comprende al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, y más preferiblemente al menos 100% más diferentes estructuras de glicano que la FSH obtenida a partir de células CHO.

25 El término "ácido nucleico" incluye ácidos nucleicos monocatenario y bicatenarios y ácidos ribonucleicos, así como ácidos desoxirribonucleicos. Este puede comprender nucleótidos de origen natural, así como sintéticos y pueden ser naturales o modificados sintéticamente, por ejemplo, por metilación, terminados con 5' y/o 3'.

30 El término "vector" se utiliza en este documento en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermediario para un ácido nucleico que permite que dicho ácido nucleico, por ejemplo, para ser introducidos en células huésped eucariotas y/o procariotas y, en su caso, para ser integrado en un genoma de la célula huésped. Vectores de este tipo se replican preferiblemente y/o se expresan en las células huésped. Un vector comprende preferiblemente uno o más marcadores de selección para la selección de células huésped que comprenden el vector. Marcadores de selección apropiados son los genes de resistencia que proporcionan la célula huésped con una resistencia, por ejemplo, contra un antibiótico específico. Además, los marcadores de selección apropiados son, por ejemplo, los genes para las enzimas tales como DHFR o GS. Los vectores que permiten la expresión de proteínas recombinantes incluyendo FSH, así como casetes de expresión apropiados y elementos de expresión que permiten la expresión de una proteína recombinante con un alto rendimiento en una célula huésped son bien conocidos en la técnica anterior y también están disponibles comercialmente, y, por lo tanto, necesidad no se detalla la descripción en este documento.

35 Los términos "célula" y "células" y "línea celular" utilizados indistintamente, preferiblemente se refieren a una o más células de mamíferos, en particular células humanas. El término incluye la progenie de una célula o población celular. Los expertos en el arte reconocerán que "células" incluyen la progenie de una sola célula, y la progenie no puede ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o del complemento de ADN total) a la célula parental original debido a mutación y/o cambio natural, accidental, o deliberado. "Célula" se refiere preferiblemente a las células aisladas y/o células cultivadas que no están incorporados en un cuerpo humano o animal vivo.

40 El término "paciente" significa de acuerdo con la invención un ser humano, un primate no humano u otro animal, en particular un mamífero tal como una vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o un roedor tal como un ratón y rata.

En una realización particularmente preferida, el paciente es un ser humano. En el caso de un paciente humano, la FSH es preferiblemente FSH humana. El paciente puede ser macho o hembra, y preferiblemente es hembra.

El término "composición farmacéutica" se refiere particularmente a una composición apropiada para la administración a un humano o animal, esto es, una composición que contiene los componentes que son farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, una composición farmacéutica comprende un compuesto activo o una sal o profármaco del mismo junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéutico tal como solución reguladora, conservante y modificador de la tonicidad.

Las unidades internacionales (IU) de FSH se refiere a fourth International Standard for Human Urinary FSH and LH (Storring, P.L. & Gaines Das, R.E. (2001) Journal of Endocrinology 171, 119-129) y se determinan de acuerdo con el método de ganancia aumentada de peso ovárico (Steelman, S.L. & Pohley, F.M. (1953) Endocrinology 53, 604-616).

El término "tratamiento de infertilidad" de acuerdo con la invención, significa el tratamiento de una disfunción o enfermedad relacionada con la reproducción o la fertilidad de un sujeto humano o animal. En particular, tratamiento de la infertilidad incluye tecnologías de reproducción asistida, inducción de la ovulación, fertilización in vitro, inseminación intrauterina, así como la habilitación o la mejora de la maduración de las células germinales, tales como la foliculogénesis y espermatogénesis.

De acuerdo con la invención, el término "en donde no hay cantidades significativas de cAMP son liberados" o expresiones similares, respectivamente, en particular, se refieren a la liberación de cAMP por células o tejido en una cantidad que es menor que 25%, preferiblemente menos de 20%, más preferiblemente menos de 15%, menos de 10%, menos del 7.5%, menos de 5% o menos de 2.5% de la cantidad de liberación de cAMP obtenida por células o tejido después de la estimulación con FSH en una concentración que resulta en la liberación máxima de cAMP. Estas células o tejidos son susceptibles o sensibles a la estimulación por FSH, tales como células de la granulosa o células de Sertoli. Una cAMP liberada que es independiente de FSH, esto es, una liberación de cAMP, que también se produce en ausencia de FSH, no se debe considerar a este respecto. Preferiblemente, una "liberación de una cantidad significativa de cAMP" o una "liberación significativa de cAMP" es cualquier liberación de cAMP por encima de la liberación de cAMP en ausencia de FSH, en particular, cualquier liberación detectable de cAMP por encima de la incertidumbre en la medición. Un procedimiento estándar para la medición de la liberación de cAMP se describe en los ejemplos y se puede usar para determinar una liberación significativa o no significativa de cAMP. La "liberación de cAMP" se refiere a una liberación intracelular de cAMP y/o una liberación extracelular o la secreción de cAMP, preferiblemente sólo a una secreción de cAMP. cAMP se refiere a monofosfato de adenosina cíclico que actúa como una segunda molécula mensajera en la transducción de señal celular. cAMP se sintetiza en las células a partir de ATP por la adenilil ciclasa. Un proceso biológico o una ruta de transducción de la señal que es "independiente de la señalización de cAMP" preferiblemente no implica la activación de la adenilil ciclasa.

Los "esteroides sexuales", también conocidos como esteroides gonadales u hormonas sexuales, en particular se refieren a las hormonas esteroides que interactúan con los receptores de estrógenos o andrógenos vertebrados. El término "esteroide sexual" incluye los andrógenos tales como esteroides anabólicos, androstenediona, dehidroepiandrosterona, dihidrotestosterona y testosterona; estrógenos tales como estradiol, estriol y estrona; y progesterona. Preferiblemente, los esteroides sexuales se refieren a esteroides sexuales de origen natural, más preferiblemente a los esteroides sexuales humanos naturales. Los esteroides sexuales preferidos de acuerdo con la invención son estradiol y progesterona, en particular, progesterona.

La presente invención es de acuerdo con un aspecto basado en el hallazgo de que una preparación de FSH recombinante mejorada que tiene un patrón de glicosilación óptima es capaz de inducir la secreción de esteroides sexuales tales como la progesterona a bajas concentraciones de FSH en la que no se induce liberación significativa de cAMP. En particular, en este cierto aspecto, la FSH mejorada de acuerdo con la presente invención induce la secreción de esteroides sexuales a concentraciones mucho más bajas que la FSH urinaria de uso frecuente o FSH recombinante obtenida a partir de células CHO. De este modo, la FSH mejorada se puede administrar en dosis mucho más bajas, lo que reduce el riesgo de efectos adversos y, además, reduce los costes de producción. Además, si se administra a dosis comparables, en esta realización, la FSH mejorada ofrece una actividad más larga en el cuerpo del paciente en comparación con la FSH utilizada comúnmente, ya que también mucho tiempo después de la administración cuando sólo una concentración muy baja de la FSH permanece en la circulación, la FSH de acuerdo con esta realización de la presente invención todavía ejerce su actividad biológica y preferiblemente, estimula o coestimula la maduración de las células germinales y/o la liberación de los esteroides sexuales. Por otra parte, a altas concentraciones, la FSH mejorada de acuerdo con la presente invención y la FSH urinaria de uso frecuente o derivada de CHO muestra efectos comparables. Por lo tanto, no hay riesgo adicional de sobredosis en comparación con la FSH utilizada comúnmente.

Además, los presentes inventores han demostrado en monos cynomolgus que la FSH mejorada de acuerdo con la presente invención tiene un efecto farmacológico similar o incluso superior en comparación con la FSH urinaria de uso frecuente o derivada de CHO. Esto es en particular sorprendente ya que la FSH de acuerdo con la presente invención muestra en ratas y monos una menor concentración máxima en suero (Cmax) y la vida media en circulación de las preparaciones de FSH comunes obtenidas a partir de la orina o las células CHO. Ya que a pesar de la menor biodisponibilidad la FSH mejorada tiene un efecto farmacológico similar o superior, se puede concluir que la FSH mejorada de acuerdo con la presente invención tiene una actividad terapéutica específica mayor que la FSH urinaria o

derivada de CHO. De acuerdo con los datos clínicos obtenidos, en los seres humanos la FSH mejorada de acuerdo con la presente invención tiene una C_{max} significativamente más alta que las preparaciones de FSH comunes; sin embargo, la vida media en circulación es ligeramente inferior pero comparable para la FSH mejorada. Lo más sorprendente, las preparaciones de FSH mejoradas de acuerdo con la presente invención mostraron efectos terapéuticos en seres humanos, en particular, el crecimiento folicular, incluso después de la administración de solo una dosis única. En contraste, no hay efectos pueden ser observados después de la administración de una dosis única de las preparaciones de FSH de uso frecuente. Por lo tanto, se espera que con la FSH mejorada un tratamiento mucho más preciso de los pacientes es posible. En particular, es posible utilizar dosis exactamente sincronizadas y de tamaño para tratar y, especialmente, mejorar la fertilidad de la paciente y, potencialmente, un tratamiento continuo de larga duración no es necesario. De este modo, se reduce también el riesgo de embarazos múltiples.

En resumen, las preparaciones de FSH mejoradas de acuerdo con la presente invención son más eficaces. Por lo tanto, dosis más pequeñas se pueden administrar a la paciente, lo que provoca efectos menos adversos, es más conveniente para el paciente y es menos costoso. Además, un régimen de dosificación más específico y detallado es posible con la FSH mejorada. Además, la reducida vida media reduce los efectos secundarios no deseados y, además, proporciona una eliminación más rápida de la FSH del cuerpo humano después de la terminación de la terapia.

Sin limitarse a esta teoría, los presentes inventores suponen que la actividad terapéutica específica más alta de las preparaciones de FSH, de acuerdo con la presente invención se basa en el patrón de glicosilación mejorado. En particular, la alta cantidad de residuos de GlcNAc bisectante y/o la alta cantidad de ácidos siálicos 2,6-acoplados, así como la gran cantidad de glicanos sulfatados puede ser responsable de la alta actividad. Además, las preparaciones de FSH de acuerdo con la presente invención también muestran un patrón de glicosilación mucho más diverso y complejo, lo que significa que más diferentes estructuras de glicano están presentes en la preparación en comparación con preparaciones de FSH convencionales obtenidas, por ejemplo, a partir de células CHO. Se cree que la FSH derivada de CHO sólo es capaz de activar una sola vía en las células diana, mientras que la FSH mejorada de acuerdo con la presente invención, debido a su patrón de glicosilación único, aparentemente ejerce su actividad biológica a través de múltiples vías diferentes, que resulta en un aumento de la respuesta biológica. Como se muestra por los datos experimentales en este documento, algunas de estas rutas de señalización implican cAMP mientras que otras, nuevas rutas son cAMP independientes.

En vista de estos hallazgos, la presente invención proporciona, en un primer aspecto, una preparación de FSH, en donde la FSH en la preparación tiene un patrón de glicosilación que comprende las siguientes características:

(i) una cantidad relativa de glicanos que lleva N-acetilglucosamina bisectante (bisGlcNAc) de al menos 20% de la cantidad total de glicanos unidos a FSH en la preparación; y

(ii) una cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado de al menos 30% de la cantidad total de ácidos siálicos; y

(iii) una cantidad relativa de glicanos que llevan un grupo sulfato de al menos el 3% de la cantidad total de glicanos unidos a FSH en la preparación.

El patrón de glicosilación puede, además:

(iii) comprender una cantidad relativa de glicanos que lleva fucosa de al menos 30%; y/o

(iv) ser un patrón de glicosilación diverso.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una preparación de FSH, en donde la FSH en la preparación tiene un patrón de glicosilación que comprende una o más de las siguientes características:

(i) una cantidad relativa de glicanos que lleva N-acetilglucosamina bisectante (bisGlcNAc) de al menos 35%;

(ii) una cantidad relativa de glicanos que lleva fucosa de al menos 60%; y

(iii) una cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado de al menos 30%.

Preferiblemente, dicha FSH es una FSH recombinante y, por lo tanto, se obtiene por producción recombinante en una célula huésped, que preferiblemente es una célula huésped humana. Las células huésped humanas apropiadas que proporcionan un patrón de glicosilación respectivo se describen posteriormente.

Además, el patrón de glicosilación puede comprender además una cantidad relativa de al menos glicanos tetraantenario de al menos 15%, y/o una cantidad relativa de glicanos que lleva uno o más residuos de ácido siálico de al menos 80%, y/o una cantidad relativa de glicanos que lleva galactosa de al menos 95%, y/o una cantidad relativa de las ramas de glicano que llevan una unidad de galactosa terminal de al menos 60%. La unidad de galactosa terminal puede llevar opcionalmente además un residuo de ácido siálico. La FSH recombinante en la composición tiene preferiblemente un número Z de al menos 200.

La cantidad relativa de glicanos que lleva bisGlcNAc es preferiblemente al menos 25%, al menos 27%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 38% o al menos 40%. Más preferiblemente, está en el intervalo de aproximadamente 25% a

aproximadamente 60%, en particular en el intervalo de aproximadamente 35% a aproximadamente 60% o en el intervalo de aproximadamente 38% a aproximadamente 50% o en el intervalo de desde aproximadamente 40% a aproximadamente 45%. De acuerdo con una realización, se trata de 42%. La cantidad relativa de glicanos que lleva uno o más residuos de ácido siálico es preferiblemente al menos 83%, al menos 85% o al menos 88%, y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 85% a aproximadamente 98% o en el intervalo de aproximadamente 88% a aproximadamente 95%, más preferiblemente de aproximadamente 90%. El número Z es preferiblemente al menos 210, más preferiblemente al menos 215, al menos 220, al menos 230 o al menos 240. Un número Z superior, por ejemplo, se puede obtener mediante el enriquecimiento de la preparación de FSH de proteínas de FSH ácidas y/o cargadas negativamente. Preferiblemente, la cantidad relativa de al menos glicanos tetraantenarios es al menos 16%, al menos 17%, al menos 18% o al menos 19%, más preferiblemente al menos 20% o al menos 21%. La cantidad relativa de glicanos al menos triantenarios, en particular glicanos tri y tetraantenarios, es preferiblemente al menos 25%, al menos 30%, al menos 35% o al menos 40%, más preferiblemente al menos 45%, al menos 50% o al menos 55%. Preferiblemente, la cantidad relativa de glicanos que lleva fucosa es al menos 35%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60% o al menos 70%, más preferiblemente al menos 75% o al menos 78%. Puede estar en el intervalo de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, en particular en el intervalo de aproximadamente 75% a aproximadamente 85%. Preferiblemente, la cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado es al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 53%, al menos 55%, al menos 60% o al menos 65%, en particular en el intervalo de aproximadamente 40% a aproximadamente 99%, preferiblemente de aproximadamente 40% a aproximadamente 80%, aproximadamente 50% a aproximadamente 60% o aproximadamente 53% a aproximadamente 70%. Preferiblemente, la relación de ácido siálico 2,3-acoplado a ácido siálico 2,6-acoplado está en el intervalo de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 7: 3, más preferiblemente de aproximadamente 1: 5 a aproximadamente 3:2 o de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:1, más preferiblemente de aproximadamente 2: 3 a aproximadamente 1:1. En realizaciones preferidas, la cantidad relativa de ácidos siálicos 2,6-acoplados supera a la de los ácidos siálicos 2,3-acoplados. La cantidad relativa de glicanos que lleva galactosa es preferiblemente al menos 97% y más preferiblemente es aproximadamente 98%. Preferiblemente, la cantidad relativa de las ramas de glicano que transportan una unidad de galactosa opcionalmente modificada por un residuo de ácido siálico es al menos 65%, más preferiblemente al menos 70% o al menos 73%. Es preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 60% a aproximadamente 95%, y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 70% a aproximadamente 80%. Preferiblemente, la cantidad relativa de los glicanos que llevan un grupo sulfato (glicanos sulfatados) es al menos 5%, más preferiblemente al menos 7%, al menos 10% o al menos 12%. De acuerdo con una realización, la cantidad relativa de los glicanos que llevan un grupo sulfato no exceda 50%, preferiblemente 40%, 35%, 30%, 25% o 20%.

En realizaciones preferidas, la FSH en la preparación tiene un patrón de glicosilación diverso en donde la FSH en la preparación comprende al menos 45 o preferiblemente al menos 50 estructuras de glicanos diferentes, en donde cada una de las diferentes estructuras de glicano tiene una cantidad relativa de al menos 0.05% de la cantidad total de las estructuras de glicano de la FSH en la preparación. De acuerdo con una realización, la FSH en la preparación comprende al menos 35 o preferiblemente al menos 40 diferentes estructuras de glicano, en donde cada una de las diferentes estructuras de glicano tiene una cantidad relativa de al menos 0.1% de la cantidad total de las estructuras de glicano de la FSH en la preparación; y/o la FSH en la preparación comprende al menos 20 o, preferiblemente, al menos 25 diferentes estructuras de glicano, en donde cada una de las diferentes estructuras de glicano tiene una cantidad relativa de al menos 0.5% de la cantidad total de las estructuras de glicano de la FSH en el preparación. En una realización adicional, la FSH en la preparación comprende al menos 40%, preferiblemente al menos 50% más diferentes estructuras de glicano que la FSH obtenida a partir de células CHO en una preparación correspondiente, en donde cada una de las diferentes estructuras de glicano tiene una cantidad relativa de al menos 0.05%, 0.1% o 0.5% de la cantidad total de las estructuras de glicano de la FSH en la preparación respectiva.

En realizaciones preferidas, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la invención no comprende ácidos N-glicolílicos neuramínico (NeuGc) o cantidades detectables de NeuGc. Además, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la invención preferiblemente tampoco comprende epítomos Galili (estructuras Gal α 1,3-Gal) o cantidades detectables del epítomo Galili.

La presente invención en particular proporciona una FSH con un patrón de glicosilación humano. Debido a estas propiedades de glicosilación, estructuras inmunogénicas no humanas foráneas que inducen efectos secundarios están ausentes lo que significa que los efectos secundarios no deseados o desventajas conocidos que son causados por ciertas estructuras de azúcar foráneas tales como los ácidos siálicos inmunogénicos no humanos (NeuGc) o el epítomo Galili (estructuras Gal-Gal), ambas conocidos por los sistemas de producción de roedores u otras estructuras del tipo estructuras de alta manosa inmunogénicas tales como se conoce por ejemplo a partir de sistemas de levadura se evitan.

En ciertas realizaciones, el patrón de glicosilación de la FSH recombinante en la preparación de acuerdo con la presente invención comprende uno o más, preferiblemente todas las siguientes características:

- (i) una cantidad relativa de glicanos que lleva N-acetilglucosamina bisectante (bisGlcNAc) en el intervalo de aproximadamente 25% a aproximadamente 50%;
- (ii) una cantidad relativa de glicanos que lleva fucosa de al menos 35%;

ES 2 764 083 T3

- (iii) una cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado de al menos 53%;
- (iv) una cantidad relativa de glicanos que lleva uno o más residuos de ácido siálico de al menos 88%; y
- (v) una cantidad relativa de al menos glicanos tetraantenarios de al menos 16%.

5 En ciertas realizaciones preferidas, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la invención tiene uno de los patrones de glicosilación que figuran en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1: Parámetros específicos de glicosilación

Realización	B	2,6-S	sulfato	S> 0	Z	tetra
1	≥ 20	≥ 53	≥ 3			
2	≥ 20	≥ 53	≥ 3	≥ 80	≥ 200	≥ 15
3	≥ 20	≥ 53	≥ 3	≥ 85		
4	≥ 20	≥ 53	≥ 3		≥ 220	
5	≥ 20	≥ 53	≥ 3			≥ 17
6	≥ 20	≥ 53	≥ 3	≥ 85	≥ 220	≥ 17
7	20-50	≥ 53	≥ 3			
8	≥ 20	53-80	≥ 3			
9	≥ 20	≥ 53	3-30			
10	≥ 20	≥ 53	≥ 3	≥ 80	200-260	≥ 15
11	≥ 20	≥ 53	≥ 3	≥ 80	≥ 200	15-30
12	20-50	53-80	3-30	80-100	200-260	15-30
13	≥ 25	≥ 55	≥ 3			
14	≥ 30	≥ 55	≥ 3			
15	≥ 25	≥ 60	≥ 3			
16	≥ 25	≥ 55	≥ 10			
17	≥ 30	≥ 60	≥ 10			
18	≥ 25	≥ 55	≥ 3	≥ 80	≥ 200	≥ 15
19	≥ 25	≥ 55	≥ 3	≥ 85	≥ 220	≥ 17
20	≥ 30	≥ 60	≥ 10	≥ 85	≥ 220	≥ 17

se muestran las cantidades relativas de glicanos que tienen la siguiente propiedad: B: GlcNAc bisectante; 2,6-S: ácido siálico 2,6-acoplada; sulfato: glicanos sulfatados; S> 0: al menos un ácido siálico; Z: número Z; tetra: al menos glicanos tetraantenario y/o bajo condiciones libres de suero.

10 En realizaciones 1 a 12 que figuran en la tabla 1, preferiblemente, la cantidad relativa de GlcNAc bisectante es al menos 25% en lugar de al menos 20%; y/o la cantidad relativa de ácidos siálicos 2,6-acoplados preferiblemente es al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, en lugar de al menos 53%; y/o la cantidad relativa de glicanos sulfatados es preferiblemente al menos 10%. Los patrones de glicosilación que figuran en la tabla 1, son preferiblemente los patrones de glicosilación humanos y/o no comprenden NeuGc y el epítipo Galii.

15 Además, la preparación de FSH recombinante que se puede obtener por la producción en una célula huésped humana o una línea celular humana. Preferiblemente, la FSH recombinante se puede obtener de una línea celular mieloide humana, preferiblemente una línea celular de leucemia mieloide humana inmortalizada, en particular la línea celular GT-5s o una línea celular derivada de la misma o una línea celular homóloga a GT-5. Se encontró que una FSH producida en dicha línea celular presenta un patrón de glicosilación como se describe anteriormente y en particular presenta los

efectos terapéuticos y farmacológicos ventajosos descritos en este documento. Así, la presente invención también proporciona un método para producir la preparación de FSH recombinante mediante expresión recombinante de la FSH en una línea celular apropiada, en particular, una línea celular como se ha descrito anteriormente, preferiblemente la línea celular GT-5s, una línea celular derivada de GT-5s o una línea celular homóloga al GT-5s. La FSH recombinante producida respectivamente puede ser aislada y opcionalmente se purifica.

Por lo tanto, la preparación de FSH recombinante preferiblemente se puede obtener por un proceso que comprende las etapas de:

(i) cultivar una célula huésped humana, preferiblemente derivada de la línea celular GT-5s o una línea celular homóloga, que comprende ácidos nucleicos que codifican para las subunidades alfa y beta de FSH en condiciones apropiadas para la expresión de la FSH; y

(ii) aislar la FSH.

Las células huésped humanas utilizadas para la expresión preferiblemente son las células mieloides, en particular células de leucemia mieloide inmortalizadas, y preferiblemente son o se derivan de la línea celular GT-5s o es una línea celular homóloga de la misma. Las células huésped humanas son cultivadas de manera que expresen FSH. Las condiciones de cultivo apropiadas son conocidas para la persona experta.

El aislamiento de FSH comprende preferiblemente las etapas adicionales de:

(a) obtener el sobrenadante del cultivo, donde la FSH es secretada por las células humanas, o lisis de las células humanas donde la FSH no es secreta;

(b) aislar la FSH a partir del sobrenadante de cultivo o lisado celular utilizando etapas cromatográficas tales como cromatografía de fase reversa, cromatografía de exclusión por tamaño y/o cromatografía de interacción hidrófoba; y

(c) obtener opcionalmente una fracción de ácido de la FSH mediante la eliminación de las isoformas básicas de FSH, preferiblemente mediante el uso de cromatografía de intercambio aniónico que incluye una etapa de lavado que elimina isoformas básicas de FSH, tales como una etapa de lavado a aproximadamente pH 5.0 o a aproximadamente pH 4.5 o aproximadamente pH 4.0.

Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica para la subunidad alfa de FSH y el ácido nucleico que codifica para la subunidad beta de FSH están comprendidas en casetes de expresión comprendidas en un vector de expresión apropiado que permite la expresión en una célula huésped humana. El ácido nucleico que codifica para la subunidad alfa de FSH y el ácido nucleico que codifica para la subunidad beta de FSH puede estar comprendido en el mismo vector, pero preferiblemente está comprendido en vectores separados. Además, también se pueden expresar a partir de un casete de expresión utilizando elementos apropiados, tales como un elemento IRES. Preferiblemente, la FSH es secretada por las células humanas. En realizaciones preferidas, el cultivo de las células humanas se lleva a cabo en un fermentador y/o bajo condiciones libres de suero.

Se describe un proceso de purificación apropiado para la FSH recombinante, por ejemplo, en la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No. US 61/263,931, la Solicitud de la Patente Europea No. EP 09 014 585.5 y la Solicitud de la Patente PCT No. WO 2011/063943.

La preparación de FSH recombinante que se puede obtener mediante la producción en células huésped humanas o una línea celular humana exhibe las características descritas en este documento con respecto a la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención. En particular, su patrón de glicosilación comprende una o más de las características descritas anteriormente, preferiblemente al menos un patrón de glicosilación como se describe en la Tabla 1 y/o en las reivindicaciones 1 a 8.

En realizaciones preferidas de los aspectos de la presente invención, la FSH recombinante de acuerdo con la presente invención es FSH recombinante humana (rhFSH), preferiblemente que se puede obtener mediante la producción en una línea celular humana, tal como la línea celular GT-5s, que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican las subunidades y elementos de FSH humana para la expresión de dichos uno o más ácidos nucleicos en la célula huésped. Preferiblemente, la subunidad alfa de la rhFSH tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología o preferiblemente identidad con la SEQ ID NO: 1 en toda su longitud de al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98%. En realizaciones preferidas, la subunidad alfa de la rhFSH comprende los residuos de asparagina en las posiciones 52 y 78 y está glicosilada en los aminoácidos Asn52 y Asn78. La subunidad beta de la rhFSH preferiblemente tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología o preferiblemente identidad con la SEQ ID NO: 2 en toda su longitud de al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98%. En realizaciones preferidas, la subunidad beta de la rhFSH comprende los residuos de asparagina en las posiciones 7 y 24 y está glicosilada en los aminoácidos Asn7 y Asn24.

De acuerdo con una realización, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención es capaz de estimular la liberación de la progesterona en células de la granulosa

(a) a concentraciones en las que se liberan cantidades significativas de cAMP; y/o

(b) mediante la inducción de una ruta de transducción de señal que es independiente de la señalización de cAMP.

De acuerdo con una realización, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención es capaz de estimular o coestimular la maduración de células germinales por un proceso biológico que es independiente de la señalización de cAMP. Sorprendentemente, se encontró en experimentos que el patrón de glicosilación se ha descrito anteriormente da como resultado un perfil farmacológico novedoso respectivo de la FSH recombinante, que exhibe las ventajas farmacológicas y terapéuticas descritas en este documento.

La preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención pueden tener una o más de las características descritas posteriormente como se puede determinar en un ensayo de células de la granulosa (como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 2). Como se demuestra por los ejemplos, la FSH recombinante que tiene el patrón de glicosilación descrito anteriormente y, en particular, la FSH recombinante que se puede obtener mediante la producción en la línea celular de GT-5s exhiben las características descritas posteriormente que dan lugar a las ventajas farmacológicas y terapéuticas descritas en este documento.

La preparación de FSH recombinante es de acuerdo con una realización capaz de estimular la liberación de la progesterona en células de la granulosa a concentraciones que están por debajo de la concentración mínima necesaria para la inducción de la liberación de cAMP por las células de la granulosa. La liberación de la progesterona, estradiol y/o cAMP se menciona a continuación se refiere a una liberación *in vitro* en aproximadamente $1 \cdot 10^4$ a aproximadamente $1 \cdot 10^6$ de células de granulosa/mL, preferiblemente en aproximadamente $5 \cdot 10^4$ a aproximadamente $1 \cdot 10^5$ de células de granulosa/mL, en particular en condiciones como las descritas en el ejemplo 2, a continuación.

Preferiblemente, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención es capaz de liberar al menos 100 ng/mL, al menos 150 ng/mL, al menos 200 ng/mL, preferiblemente al menos 250 ng/mL, al menos 300 ng/mL o al menos 400 ng/mL de progesterona a una concentración que no induce una liberación de cAMP o que induce una liberación de cAMP de menos de 20 pmol/mL, menos de 15 pmol/mL, menos de 10 pmol/mL, menos de 5 pmol/mL.

Además, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención es preferiblemente capaz de liberar al menos 100 ng/mL, al menos 200 ng/mL, preferiblemente al menos 300 ng/mL o al menos 400 ng/mL de progesterona a una concentración de FSH que es inferior a la concentración necesaria con la FSH urinaria humana o FSH recombinante producida en células CHO (Gonal F). Por lo tanto, es preferiblemente capaz de liberar al menos 100 ng/mL, al menos 200 ng/mL, preferiblemente al menos 300 ng/mL o al menos 400 ng/mL de progesterona a una concentración en donde la FSH urinaria humana o FSH recombinante producida en células CHO (Gonal F) no dan lugar a la correspondiente, liberación de progesterona respectivamente igualmente alta. Como se demuestra por los ejemplos, la FSH recombinante de acuerdo con la presente invención induce respectivamente estimula la producción de progesterona con más fuerza que la FSH urinaria humana o FSH recombinante producida en células CHO (Gonal F).

Además, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención es preferiblemente capaz de liberar al menos 50 nmol/L, al menos 75 nmol/L, al menos 100 nmol/L, al menos 125 nmol/L o al menos 150 nmol/L de estradiol a una concentración de FSH que no induce una liberación de cAMP o que induce una liberación de cAMP de menos de 20 pmol/mL, a menos de 15 pmol/mL, menos de 10 pmol/mL, menos de 5 pmol/mL.

Además, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención es preferiblemente capaz de liberar al menos 50 nmol/L, al menos 75 nmol/L, al menos 100 nmol/L, al menos 125 nmol/L, al menos 150 nmol/L, al menos 200 nmol/L, al menos 250 nmol/L, al menos 300 nmol/L o al menos 350 nmol/L de estradiol a una concentración de FSH que es inferior a la concentración necesaria con la FSH urinaria humana o FSH recombinante producida en células CHO (Gonal F). Por lo tanto, es preferiblemente capaz de liberar al menos 50 nmol/L, al menos 75 nmol/L, al menos 100 nmol/L, al menos 125 nmol/L, al menos 150 nmol/L, al menos 200 nmol/L, al menos 250 nmol/L, 300 nmol/L o al menos 350 nmol/L de estradiol a una concentración en donde la FSH urinaria humana o FSH recombinante producida en células CHO (Gonal F) no da lugar a una correspondiente alta liberación respectivamente igual, de estradiol. Como se demuestra por los ejemplos, las preparaciones de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención inducen respectivamente la estimulación de la producción de estradiol con más fuerza que la FSH urinaria humana o FSH recombinante producida en células CHO (Gonal F).

Las características respectivas descritas en este documento, sobre la liberación de cAMP y la expresión de los esteroides sexuales pueden ser analizadas y determinadas por el uso de un ensayo de células de la granulosa, como, por ejemplo, se describe en el ejemplo 2.

La preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención está presente preferiblemente en una composición farmacéutica. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento de la infertilidad como se define en este documento. La composición farmacéutica puede incluir otros agentes farmacéuticamente activos, en particular agentes adicionales útiles en el tratamiento de infertilidad tales como otras gonadotropinas, en particular LH y/o CG, preferiblemente LH o CG recombinante y/o humana. Alternativamente, la composición farmacéutica que comprende la FSH recombinante puede ser diseñado para su uso en combinación con tales otros agentes farmacéuticamente activos.

Además, la presente invención proporciona la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento de la infertilidad, así como un método para el tratamiento de la infertilidad que comprende la administración de la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención a la paciente.

Como se discutió anteriormente, en ciertas realizaciones, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención es capaz de estimular o coestimular la liberación de esteroides sexuales tales como la progesterona, en particular, la liberación de la progesterona en células de la granulosa, ya a concentraciones donde ninguna cantidad significativa de cAMP se libera. En particular, la FSH recombinante de acuerdo con la presente invención puede ser capaz de estimular la liberación de esteroides sexuales tales como la progesterona en células de la granulosa a concentraciones que están por debajo de la concentración mínima necesaria para la inducción de la liberación de cAMP por las células de la granulosa.

Además, en ciertas realizaciones, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención es capaz de estimular la liberación de la progesterona, en particular, la liberación de la progesterona en células de la granulosa, mediante la inducción de una ruta de transducción de señal que es independiente de la señalización de cAMP. Preferiblemente, el tratamiento de la infertilidad incluye la inducción de una ruta de transducción de señal que es independiente de la señalización de cAMP por la FSH recombinante de acuerdo con la presente invención, que resulta en la estimulación de la liberación de progesterona. Sin embargo, otras rutas de transducción de señales, incluyendo la señalización de cAMP, además, pueden activarse por la FSH recombinante. En otras realizaciones, el tratamiento de la infertilidad no implica la inducción de una liberación significativa de cAMP por la FSH recombinante de acuerdo con la presente invención.

En realizaciones adicionales, tal como se describe anteriormente, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención es capaz de estimular o coestimular la maduración de células germinales por un proceso biológico que es independiente de la señalización de cAMP.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a la preparación de FSH recombinante o la composición farmacéutica descrita anteriormente para inducir y/o estimular la secreción de esteroides sexuales también independientes de cAMP. Además, la presente invención también se refiere a la preparación de FSH recombinante o la composición farmacéutica descrita anteriormente para estimular o coestimular la maduración de células germinales por un proceso biológico que es independiente de la señalización de cAMP. Adicionalmente, la presente invención también se refiere a la preparación de FSH recombinante o la composición farmacéutica descrita anteriormente para inducir y/o estimular la secreción de esteroides sexuales en las concentraciones de FSH en la que no se induce liberación de cAMP significativa. Además, la presente invención también se refiere a la preparación de FSH recombinante o la composición farmacéutica descrita anteriormente para inducir la secreción de esteroides sexuales a concentraciones mucho menores que la FSH urinaria de uso frecuente o FSH recombinante obtenida a partir de células CHO. Las ventajas farmacológicas y terapéuticas de los usos respectivos, en particular, para el tratamiento de la infertilidad se discutieron en detalle anteriormente.

En particular, el tratamiento de la infertilidad puede incluir la estimulación o coestimulación de la maduración de las células germinales por un proceso biológico que es independiente de la señalización de cAMP. Sin embargo, el tratamiento de la infertilidad puede comprender adicionalmente la estimulación de la maduración de las células germinales por uno o más de otros procesos biológicos que implican la señalización de cAMP. En otras realizaciones, el tratamiento de la infertilidad no implica la estimulación de la maduración de las células germinales por tales otros procesos biológicos.

La maduración de las células germinales incluye preferiblemente crecimiento folicular y/o la espermatogénesis. Además, el proceso biológico por el cual la FSH estimula la maduración de las células germinales puede incluir la secreción de esteroides sexuales, en particular, progesterona, preferiblemente por las células de la granulosa. Preferiblemente, el proceso biológico que es independiente de la señalización de cAMP se refiere a la secreción de esteroides sexuales, en particular, progesterona, preferiblemente por células de la granulosa, inducidos por una ruta de transducción de señal que no implica cAMP como molécula mensajera.

En realizaciones preferidas, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la invención es capaz de provocar un efecto biológico incluso después de la administración de una dosis única. En particular, la preparación de FSH de acuerdo con la invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es capaz de inducir el crecimiento folicular y/o maduración ovular en un paciente, en particular un paciente humano, después de la administración de solo una dosis única de la preparación de FSH o la composición farmacéutica. Preferiblemente, el efecto biológico alcanzado después de la administración de una sola dosis única es más alta, en particular, el crecimiento folicular y/o maduración ovular, es más pronunciada y/o se consigue en una proporción mayor de los pacientes tratados en comparación con preparaciones de FSH obtenidas a partir de orina humana y/o expresado en células CHO. Dicha dosis única, en particular, comprende al menos 10 IU de FSH, preferiblemente al menos 15 IU de FSH, al menos 20 IU de FSH o al menos 25 IU de FSH, y/o 1000 IU de FSH o menos, preferiblemente 750 IU de FSH o menos, 500 IU de FSH o menos, 300 IU de FSH o menos, 200 IU de FSH o menos, 150 IU de FSH o menos, 100 IU de FSH o menos, o 50 IU de FSH o menos. Preferiblemente, dicha dosis única comprende aproximadamente 10 IU a aproximadamente 500 IU de FSH, más

preferiblemente de aproximadamente 20 IU a aproximadamente 300 IU de FSH, por ejemplo, aproximadamente 25 IU de FSH, aproximadamente 75 IU de FSH o aproximadamente 100 IU de FSH.

5 En realizaciones adicionales, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la invención tiene una menor vida media en circulación de preparaciones de FSH obtenidas a partir de orina humana y/o expresadas en células CHO. En particular, tiene una menor vida media en circulación en uno o más de los seres humanos, monos cynomolgus, ratas y/o ratones. Preferiblemente, la vida media en circulación es al menos 5% más baja, más preferiblemente al menos 10%, al menos 15% o al menos 20% menor que la de las preparaciones de FSH obtenidas a partir de orina humana y/o expresadas en células CHO. En ciertas realizaciones, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la invención tiene una biodisponibilidad más baja que las preparaciones de FSH obtenidas a partir de orina humana y/o expresada en células CHO, en particular, en uno o más seres humanos, monos cynomolgus, ratas y/o ratones. Preferiblemente, la biodisponibilidad es al menos 5% más baja, más preferiblemente al menos 10%, al menos 15% o al menos 20% inferior que la de las preparaciones de FSH obtenidas a partir de orina humana y/o expresadas en células CHO. La biodisponibilidad en este sentido se refiere preferiblemente a la zona bajo el valor de la curva (AUC) obtenido en estudios farmacocinéticos en donde la concentración de FSH en suero se determina a diferentes tiempos puntuales después de la administración de una cantidad definida de FSH. La vida media en circulación y la biodisponibilidad preferiblemente se determinan después de la administración de la FSH por inyección subcutánea, en particular después de la administración de una dosis única, en donde la dosis única comprende preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 IU de FSH, más preferiblemente de aproximadamente 25 IU a aproximadamente 500 IU de FSH o aproximadamente 50 IU a aproximadamente 300 IU de FSH, en particular aproximadamente 100 IU de FSH. En particular, la circulación de la vida media y la biodisponibilidad se determinan como se describe en el Ejemplo 6, a continuación.

En realizaciones preferidas, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la invención tiene una eficacia terapéutica que es similar o incluso superior a la de las preparaciones de FSH obtenidas a partir de orina humana y/o expresadas en células CHO, en particular, en una o más de humanos, monos cynomolgus, ratas y/o ratones. El término "eficacia terapéutica" se refiere preferiblemente a la capacidad de estimular la liberación de estradiol y/o inhibina-B cuando se administra a un sujeto. La eficacia terapéutica preferiblemente se determina midiendo la concentración de estradiol y/o inhibina-B en la sangre o suero de uno o más sujetos después de la administración de la FSH por inyección subcutánea, en particular después de la administración de una dosis única, en donde la dosis única comprende preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 IU de FSH, preferiblemente de aproximadamente 25 IU a aproximadamente 500 IU de FSH o aproximadamente 50 IU a aproximadamente 300 IU de FSH, en particular aproximadamente 100 IU de FSH. En particular, la eficacia terapéutica se determina como se describe en el Ejemplo 5, a continuación. Eficacias terapéuticas similares, en particular, se refieren a estimulaciones de estradiol y/o liberación de inhibina-B por las respectivas preparaciones de FSH que resultan en concentraciones séricas de estradiol y/o inhibina-B que se diferencian entre sí por no más de 25%, preferiblemente no más de 20%, no más de 15% o no más de 10%.

35 La preparación de FSH obtenida de la orina humana en particular, se obtiene a partir de la orina de mujeres postmenopáusicas. La preparación de FSH se expresa en células CHO, por ejemplo, se expresa en la línea celular CHO CHOdhfr- [ATCC N° CRL- 9096]. La preparación de FSH obtenida a partir de la orina humana y la preparación de FSH se expresa en células CHO preferiblemente están disponibles comercialmente y aprobó preparaciones farmacéuticas, en particular Bravelle y Gonal-f, respectivamente. Al comparar los efectos de diferentes preparaciones de FSH, en particular, su vida media en circulación, biodisponibilidad y eficacia terapéutica, las preparaciones de FSH se analizaron mediante la administración a grupos de sujetos similares con el mismo régimen de dosificación utilizando la misma ruta de administración y el uso de otras condiciones similares o iguales.

En ciertas realizaciones, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención se administra al paciente en una dosis que resulta en una concentración de FSH en la circulación del paciente de menos de 5 IU/L. En ciertas realizaciones, la dosis que se va a administrar a los pacientes resulta en una concentración de FSH en la circulación del paciente, que es menos de aproximadamente 4 IU/L, en particular, menos de aproximadamente 3 IU/L, menos de aproximadamente 2 IU/L, menos de aproximadamente 1 IU/L o menos de aproximadamente 0.5 IU/L. La concentración de la FSH en la circulación del paciente, por ejemplo, está en el intervalo de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 IU/L, en particular aproximadamente 0.05 a aproximadamente 2 IU/L, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1.5 IU/L o aproximadamente 0.2 a aproximadamente 1 IU/L. En particular, la FSH se administra al paciente en una dosis que no induce una liberación significativa de cAMP. Como se demuestra en los ejemplos, las preparaciones de FSH recombinante de acuerdo con la invención en determinadas realizaciones provocan una eficacia terapéutica en estas concentraciones. Sin embargo, las preparaciones de FSH recombinante de acuerdo con la invención también se pueden administrar en una dosis que da como resultado mayores concentraciones de FSH en la circulación del paciente.

En realizaciones preferidas, el tratamiento de la infertilidad incluye tecnologías de reproducción asistida, inducción de ovulación, fertilización *in-vitro*, por ejemplo, fertilización *in vitro* con inyección intracitoplasmática de espermatozoides, la transferencia intratubárica de gametos, inseminación intrauterina, tratamiento del trastorno anovulatorio en mujeres, tratamiento de trastorno de deficiencia de la hormona severo para la maduración del óvulo en la mujer, tratamiento de las deficiencias de la producción de esperma en los hombres, y/o de la habilitación o mejora de la maduración de las células germinales, tal como foliculogénesis y espermatogénesis, en particular, maduración folicular en mujeres, por

ejemplo, durante los protocolos de estimulación de la fertilización *in vitro* y/o para el tratamiento del trastorno anovulatorio.

Preferiblemente, la preparación de FSH recombinante de acuerdo con la presente invención es para la administración parenteral al paciente. En particular, la FSH recombinante que se va a administrar por inyección o infusión, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. En ciertas realizaciones de la presente invención, la FSH recombinante está presente en una composición farmacéutica. Los regimientos de dosificación apropiadas pueden ser determinadas por el experto en el arte y se pueden derivar de los conocimientos generales en el campo.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede ser en forma de una sola dosis única o de una dosis única múltiple. Preferiblemente, la composición farmacéutica es una solución estéril que comprende la FSH recombinante de acuerdo con la presente invención, que comprende además uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en solventes tales como agua, sustancias reguladoras, estabilizantes, conservantes, excipientes, surfactantes y sales. Una sola dosis única comprende preferiblemente de aproximadamente 10 IU a aproximadamente 750 IU de FSH, más preferiblemente de aproximadamente 25 IU a aproximadamente 500 IU de FSH, de aproximadamente 50 IU a aproximadamente 400 IU de FSH, o de aproximadamente 100 IU a aproximadamente 300 IU de FSH. Una dosis única múltiple comprende suficiente FSH para proporcionar múltiples dosis única, en particular al menos 5, al menos 10, al menos 20 o al menos 50 dosis únicas. La composición farmacéutica puede ser, por ejemplo, en la forma de una pluma de inyección.

Figuras

La figura 1 muestra la liberación de cAMP de células de la granulosa aisladas estimuladas con diferentes concentraciones de la FSH recombinante humana mejorada (FSH (invención); preparación 1: cuadrados abiertos, la preparación 2: triángulos cerrados) o FSH obtenida a partir de células CHO (Gonal F; rombos cerrados).

La figura 2 muestra la síntesis de estradiol de células de la granulosa aisladas estimuladas con diferentes concentraciones de la FSH recombinante humana mejorada (FSH (invención); preparación 1: cuadrados abiertos, preparación 2: triángulos cerrados) o FSH obtenida a partir de células CHO (Gonal F; rombos cerrados).

La figura 3 muestra la síntesis de progesterona de las células de la granulosa aisladas estimuladas con diferentes concentraciones de la FSH recombinante humana mejorada (FSH (invención); preparación 1: cuadrados abiertos, preparación 2: triángulos cerrados) o FSH obtenida a partir de células CHO (Gonal F; rombos cerrados).

La figura 4 muestra la liberación de cAMP de células de la granulosa aisladas estimuladas con diferentes concentraciones de la FSH recombinante humana mejorada (FSH (invención); (cuadrados abiertos) o FSH urinaria (Fostimon; rombos cerrados).

La figura 5 muestra la síntesis de estradiol a partir de células de la granulosa aisladas estimuladas con diferentes concentraciones de la FSH recombinante humana mejorada (FSH (invención); (cuadrados abiertos) o FSH urinaria (Fostimon; rombos cerrados).

La figura 6 muestra la síntesis de progesterona de células de la granulosa aisladas estimuladas con diferentes concentraciones de la FSH recombinante humana mejorada (FSH (invención); (cuadrados abiertos) o FSH urinaria (Fostimon; rombos cerrados).

La figura 7 muestra los resultados del ensayo de Steelman-Pohley utilizando la FSH recombinante humana mejorada en comparación con la FSH urinaria estándar y FSH recombinante estándar obtenida a partir de células CHO. El aumento de peso ovárico en ratas hembra inmaduras después de la administración diaria durante tres días se representa frente a la concentración de FSH utilizada.

La figura 8 muestra concentraciones séricas de estradiol (E2) e inhibina-B observadas en monos cynomolgus después de inyección s.c. sola (A) y repetida (B) de FSH (invención), la FSH urinaria Bravelle o la FSH recombinante Gonal-f expresada en células CHO. Cada barra representa la media y desviación estándar de 4 animales.

La figura 9 muestra las concentraciones en suero de FSH en monos cynomolgus hembras después de una sola inyección i.v. o inyección s.c.. Cada símbolo representa el valor medio de un grupo de 4 animales.

La figura 10 muestra dibujos esquemáticos de las estructuras de glicanos de tipo complejo que pueden unirse a los sitios de glicosilación de FSH. Se muestran estructuras (a) biantenaria, (b) triantenaria y (c) tetraantenaria. Uno o más de los residuos de ácido siálico y galactosa también pueden estar ausentes en estas estructuras y las estructuras pueden comprender, además, por ejemplo, un residuo de GlcNAc bisectante, un residuo de fucosa y/o grupos sulfato. Sia: ácido siálico; Gal: galactosa, también denominado en este documento como la galactosa terminal; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Man: manosa.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de FSH (invención)

FSH es producida por cultivo de células GT-5s transfectadas de forma estable con dos construcciones de expresión que albergan la cadena alfa y beta de FSH humana (número de acceso cadena alfa NT_007299.13; número de acceso cadena beta NT_009237.18). El plásmido para la expresión de la cadena alfa de FSH está llevando el gen de una versión mutada de la dihidrofolato reductasa murina (dhfr) con mayor resistencia al inhibidor de la enzima metotrexato que la forma nativa y el segundo plásmido para la expresión de la cadena alfa de FSH está llevando el gen de resistencia a puromicina.

La transfección de la línea celular de FSH expresión (invención) se realizó por nucleofección utilizando los dos plásmidos de expresión descritos anteriormente. Para la selección y amplificación de clones de células productoras de anticuerpos estables puromicina y metotrexato se añadieron a concentraciones crecientes. Los conjuntos de células amplificados fueron sembrados en una matriz semisólida para la clonación de células individuales mediante la tecnología de clonación PixFL o clonación de células individuales mediante dilución limitada. Los clones se seleccionaron para alta secreción de moléculas de FSH intactas.

FSH es producida por la fermentación del clon GT-5s que produce FSH final en proceso de lotes, lotes de alimentación o de perfusión en condiciones libres de suero. La fermentación se realiza normalmente durante 2-3 semanas.

Después de la fermentación se filtra el sobrenadante a través de filtros de 2 µm para eliminar las células y los residuos celulares antes de una etapa de filtración estéril utilizando filtros de 0.2 µm. El proceso de purificación utiliza una cromatografía de fase reversa (RPC) como etapa de captura seguido por una etapa de concentración y una posterior cromatografía de exclusión molecular (SEC). Opcionalmente, se aplica entonces el eluato a una cromatografía de intercambio aniónico (AEC) para eliminar los contenidos de FSH menos ácidos. Esto se realiza mediante el lavado de la FSH unida con solución reguladora de lavado a pH 5.0 ("enriquecimiento a pH 5.0") o pH 4.5 ("enriquecimiento a pH 4.5") para eluir las isoformas de FSH menos ácidas antes de la elución de la fracción de FSH deseada. Como una etapa de acabado final se utiliza una cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para ganar FSH a alta pureza.

Ejemplo 2: ensayo de células de la granulosa

Con el fin de realizar una célula de la granulosa se aíslan células primarias de ensayo a partir del fluido folicular de pacientes de IVF durante la recogida de los oocitos. Después de una centrifugación en gradiente de Ficoll que elimina otros tipos de células como, por ejemplo, glóbulos rojos las células de la granulosa se siembran en formato de placa de 24 a 96 pozos, durante 5-7 días en medio de cultivo que contiene androstenediona o testosterona. Después de ese período, las células (de 2 a 4*10⁴ células por pozo) se estimularon con FSH que oscila entre 1 pg/mL a 2 µg/mL en las etapas mostradas en el diagrama (400 µL de medio por pozo). Después de tres a cuatro horas de incubación mitad del sobrenadante se recoge para realizar el ensayo cAMP. Otras 24 h más tarde las células se lisaron mediante congelación y descongelación en el sobrenadante restante. El lisado se aplica en los ensayos de progesterona y estradiol.

Comparación de la FSH (invención) y Gonal F

En la primera serie de experimentos FSH (invención) se compara con Gonal F (Merck Serono SA). Gonal F es FSH produce de forma recombinante en células CHO. Los resultados se muestran en las Figs. 1 a 3. Mientras que el segundo mensajero cAMP se produce a concentraciones de FSH comparables de productos Gonal F y FSH (invención) en cantidades comparables, la progesterona y estradiol esteroides se liberan a mucho concentraciones de FSH más bajas en el caso de los productos de la FSH (invención) en comparación a la FSH producida de forma recombinante en células CHO (Gonal F).

Comparación de FSH (invención) y Fostimon

En otra serie de experimentos, la FSH (invención) se comparó contra Fostimon (IBSA Institut biochimique SA), el producto de FSH aislada de la orina humana. Los resultados se muestran en las Figs. 4 a 6. Si bien el nivel de cAMP se eleva de manera similar a los rangos de dosis comparables de FSH para ambos productos, los esteroides sexuales se producen en una concentración significativamente menor de FSH (invención) en comparación con Fostimon.

Nota: Puesto que los ensayos se realizan utilizando diferentes donantes, las diferencias en el perfil de estimulación puede tener en cuenta a los donantes utilizados en cada ensayo.

Ejemplo 3: ensayo de Steelman-Pohley

La actividad de la FSH también se determinó mediante el ensayo de Steelman-Pohley. El ensayo se realizó de acuerdo con la farmacopea. En particular, el aumento de peso ovárico en ratas hembra inmaduras se midió después de la administración de tres concentraciones diferentes de FSH cada una dadas al día durante tres días. La potencia se calcula utilizando la evaluación de líneas paralelas. Los resultados se muestran en la fig. 7.

Tabla 2: Actividad calculada de la FSH (invención) después de la comparación con FSH urinaria

Muestra	actividad calculada
---------	---------------------

FSH (invención) sin enriquecimiento	6,271 IU/mg
FSH (invención) con enriquecimiento a pH 4.5	7,663 IU/mg

Actividad del estándar urinario: 7,135 IU/mg

Como se demuestra por el ensayo de Steelman-Pohley, las actividades *in vivo* de la FSH (invención) y de la orina y la FSH recombinante estándar son similares en ratas.

5 Ejemplo 4: Perfil de glicosilación

10 Los perfiles de glicosilación de las diferentes preparaciones de FSH se determinaron mediante análisis estructural de la glicosilación. El perfil de glicosilación genera información sobre la estructura de glicano compleja de los sitios de glicosilación. Para el perfil de glicosilación los N-glicanos intactos son liberados de la proteína de núcleo empleando PNGasa F. La digestión se lleva a cabo en un gel o bloque de gel para el procesamiento sin ambigüedades. N-glicanos libres están etiquetados con el marcador fluorescente 2-aminobenzamida. La muestra purificada de N-glicanos se separa por medio de cromatografía de interacción hidrófila (HILIC) con detección fluorométrica. Este análisis dio los siguientes resultados:

Tabla 3: Cantidades relativas de las diferentes propiedades de glicosilación

Muestra	F	S	G	B
FSH (invención)	80%	90%	98%	42%
Fostimon	48%	83%	91%	28%
Puregon ¹	29%	91%	91%	0%

F: fucosa; S: ácido siálico; G: galactosa; B: N-acetilgalactosamina bisectante
¹: valores de la literatura (Hard, K. et al (1990) European Journal of Biochemistry 193, 263-271)

15 Se muestran las cantidades relativas de N-glicanos en la FSH que llevan las unidades indicadas. Puregon es otra FSH recombinante humana producida en células CHO.

Además, se analizó la relación de ácidos siálicos 2,3-acoplados y 2,6-acoplados en los glicanos de la FSH, mediante la comparación de la cantidad de ácido siálico liberado por sialidasa A (disociando ácidos siálicos 2,3 y 2, 6-acoplados) y sialidasa S (disociando solamente ácidos siálicos 2,3-acoplados).

20 Tabla 4: Cantidades relativas de la unión de ácido siálico

Muestra	ácido siálico 2,3- ligado	ácido siálico 2,6-ligado
FSH (invención)	43%	57%
Bravelle	75%	25%
Gonal F/Puregon	100%	0%

25 En FSH (invención), los residuos de ácido siálico están acoplados a los glicanos por enlaces 2,3-, así como 2,6 en una relación de aproximadamente 1: 1, que comprende incluso más ácidos siálicos 2,6-acoplados que ácidos siálicos 2,3-acoplados, mientras que en la FSH urinaria Bravelle (Ferring Pharmaceuticals Inc.) la relación es aproximadamente 3: 1 a favor de ácido siálico 2,3 unido. Debido a su producción recombinante en células CHO, Puregon (Organon/EssexPharma) y Gonal F (Merck Serono) no tenemos ninguna N-acetilgalactosaminas bisectantes y sólo comprende ácidos siálicos 2,3-acoplado.

Las unidades de galactosa terminales antenarias, y el número Z se calcularon a partir de las mediciones anteriores y mediante la determinación de la distribución de carga de los glicanos después de la liberación de la FSH.

30 Tabla 5: Anteriorio de la glicosilación de la FSH diferente

Muestra	Bi	Tri	Tetra
---------	----	-----	-------

FSH (invención)	42%	35%	22%
Fostimon	39%	45%	16%
GonalF ¹	~65 %	~25 %	~10 %
Puregon ²	53 %	26 %	12 %
Bi: N-glicanos biantenario; Tri: N-glicanos triantenario; Tetra: N-glicanos tetraantenario			
¹ : valores de la literatura (Gervais, A. et al. (2003) Glycobiology 13(3), 179-189)			
² : valores de la literatura (Hard, K. et al. (1990) European Journal of Biochemistry 193, 263-271)			

Se muestran las cantidades relativas de N-glicanos bi-, tri- y tetraantenario en la FSH.

Tabla 6: Cantidad relativa de unidades de galactosa terminales

muestra	galactosa terminal
FSH (invención)	75%
Fostimon	43%

- 5 Se muestran las cantidades relativas de las ramas de N-glicano en la FSH que tienen una unidad de galactosa en su extremo.

Tabla 7: número Z de diferentes FSH

Muestra	Número Z
FSH (invención) sin enriquecimiento	220
FSH (invención) con enriquecimiento de isoformas ácidas	245
Gonal F (rFSH)	218
Puregon (rFSH)	204
Fostimon (uFSH)	212
Bravelle (uFSH)	244

- 10 Se muestra el número Z, esto es, la acidez relativa, de las preparaciones de FSH. Un número Z más alto indica una preparación de FSH más ácida.

En conclusión, la FSH de acuerdo con la presente invención (FSH (invención)) tiene un alto grado de N-acetilglucosamina bisectante, una alta antenaria y un alto grado de sialilación, en particular después de enriquecimiento de las isoformas ácidas, y un alto grado de sulfatación. Se supone que debido a uno o más de estos tres parámetros de glicosilación, la FSH (invención) tiene una actividad superior en comparación con las preparaciones de FSH recombinantes o urinarias comunes.

Además, la FSH (invención) también es muy fucosilado y tiene una relación de sialilación de 2,3 a 2,6 de aproximadamente 1: 1 o incluso una mayor cantidad de sialilación de 2,6.

Además, las estructuras de glicano de las preparaciones de FSH también fueron analizadas por espectroscopia de masas de los glicanos liberados. Los siguientes resultados fueron obtenidos:

Tabla 8: Cantidades relativas de las diferentes propiedades de glicosilación

Muestra	F	S0	S1	S2	S3	S4	S> 0	G0	G1	G2	G3	G4	G> 0	B
---------	---	----	----	----	----	----	------	----	----	----	----	----	------	---

Gonal F	55	1	16	45	28	9	98	0	1	55	30	14	100	0
Bravelle	43	1	11	45	34	9	99	0	7	39	39	14	99	14
FSH (inv.)	43	1	18	35	31	15	99	0	7	45	30	20	102	28

se muestran las cantidades relativas de los glicanos que tienen la siguiente propiedad: F: fucosa; S0: sin ácido siálico; S1: un ácido siálico; S2: dos ácidos siálicos; S3: tres ácidos siálicos; S4: cuatro ácidos siálicos; S> 0: al menos un ácido siálico; G0: no galactosa; G1: una galactosa; G2: dos galactosas; G3: tres galactosas; G4: cuatro galactosas; G> 0: al menos una galactosa; B: GlcNAc bisectante

Tabla 9: Anterior de la glicosilación de la FSH diferente

Muestra	Bi	Tri	Tetra
FSH (invención)	48%	31%	21%
Bravelle	45%	43%	12%
Gonal-f	56%	30%	14%

Bi: N-glicanos biantenarico; Tri: N-glicanos triantenarico; Tetra: N-glicanos tetraantenarico

5 Tabla 10: Cantidad relativa de glicanos sulfatados

Muestra	Sulfatación
FSH (invención)	15%
Bravelle	2%
Gonal F	0%

Se muestran las cantidades relativas de N-glicanos en la FSH que llevan un grupo sulfato.

Ejemplo 5: efectos farmacológicos

10 El perfil farmacológico de la FSH (invención) se investigó en diferentes estudios farmacológicos y toxicológicos in vivo en ratas y monos hembra y un bioensayo in vivo. Como marcadores moleculares, se utilizaron estradiol e inhibina-B. Estos marcadores son liberados por los ovarios a la estimulación con FSH. Estradiol es responsable del crecimiento folicular y la maduración, mientras que la inhibina-B es parte del mecanismo de retroalimentación negativa natural. Además, se había demostrado previamente que la inhibina-B es un buen marcador sustituto para la estimulación ovárica por la FSH.

15 5.1 tratamiento con FSH en ratas maduras

Tras el tratamiento de las ratas hembra maduras con una dosis única s.c. de 100 IU de FSH (invención)/kg de peso corporal, los niveles en suero de inhibina-B aumentaron 2-3 días después de la administración y disminuyó de nuevo a los niveles basales. La dosificación repetida de las ratas de acuerdo con su ciclo estral con 100 IU de FSH (invención) dio lugar a un marcado aumento de la progesterona en suero y la inhibina-B que refleja múltiples ovulaciones seguido de la producción de hormonas en las células lútea. Se observaron hallazgos similares en el estudio de determinación del intervalo de dosis donde se administraron dosis repetidas 7-d de 1200 IU de FSH (invención)/kg. No se pudo observar ninguna diferencia de la actividad farmacodinámica de la FSH (invención) en comparación con los productos referencia que contienen la FSH (Gonal-f, Bravelle) investigados en los mismos estudios.

25 En un estudio de 28 días de toxicidad con dosis repetidas realizado en ratas hembra se observó un aumento relacionado con la dosis de los ovarios y un aumento en el número de folículos de Graaf para todos los grupos de dosis (30, 100, 300 IU/kg de peso corporal). Se observó correlación de estos resultados con elevados niveles de inhibina-B en comparación con el control durante el período de tratamiento. Los niveles de inhibina-B de los animales tratados se incrementaron de una manera relacionada con la dosis a partir del nivel de dosis baja de 30 IU de FSH (invención)/kg de peso corporal/día. Todos los resultados fueron completamente reversibles.

5.2 Tratamiento de FSH en los monos maduros

El perfil farmacológico después de dosis únicas y repetidas de FSH (invención) se evaluó en monos cynomolgus. El mono cynomolgus se considera el modelo animal más relevante de acuerdo con las estrechas similitudes con humanos. El estudio consistió en una administración única de dosis de FSH a animales hembras con madurez sexual, que exhiben un ciclo menstrual regular. Los animales fueron asignados al azar a los grupos de ensayo basados en la fase de su ciclo estral. La administración del elemento de ensayo para los animales comenzó 1 a 3 días después del inicio de la menstruación. El estudio incluyó 4 grupos, cada uno compuesto de 4 animales que fueron tratados por una sola inyección s.c. en bolo de 100 IU/kg de peso corporal de FSH (invención), la FSH urinaria Bravelle o la FSH recombinante Gonal-f expresadas en células CHO. La extracción de sangre para el análisis de los niveles de estradiol e inhibina-B se realizó de todos los animales antes de la dosis, y en los tiempos puntuales indicados después de la administración. Los tiempos puntuales después de la administración se seleccionaron para reflejar las diferentes fases del ciclo estral. Los resultados se muestran en la fig. 8A.

Para todas las sustancias de FSH ensayadas, los niveles de estradiol e inhibina-B de los animales tratados aumentó durante 5 días después de la administración única de las sustancias de ensayo y volvieron a disminuir a los niveles basales. Se observó un aumento normal de la mitad del ciclo de estradiol para casi todos los animales en los días de ensayo 14 a 22. La FSH (invención) mostró el mayor aumento en el nivel de estradiol. Este experimento demuestra al menos una eficacia farmacológica comparable para FSH (invención) en los niveles de AUC inferiores (véase el Ejemplo 6) que indica una mayor actividad en la estimulación del receptor.

Además, se realizó un estudio similar en donde los monos recibieron dosis repetidas de FSH. El estudio de dosis repetidas incluyó 3 grupos, cada uno compuesto de 4 animales que fueron tratados por inyecciones diarias repetidas s.c. en bolo de 100 IU/kg de peso corporal de FSH (invención), Bravelle o Gonal-f durante 7 días consecutivos. La toma de muestras de sangre fue como se describe para el estudio de dosis única. Los niveles de estradiol e inhibina-B de los animales tratados repetidamente s.c. con 100 IU de FSH (invención)/kg de peso corporal, 100 IU Bravelle/kg de peso corporal o 100 IU Gonal-f/kg de peso corporal aumentado durante todo el período de tratamiento de 7 días (véase Fig. 8B). Después del final del tratamiento los niveles de la hormona disminuyeron lentamente y alcanzaron niveles normales después de 5-7 días. Las concentraciones máximas de estradiol e inhibina-B observadas tras la administración repetida de la FSH (invención) fueron mucho más altas en comparación con las concentraciones observadas después de una dosis única, y también en comparación con los niveles del ciclo estral normal. Los efectos farmacodinámicos observados después de la administración s.c. repetida de FSH (invención) fueron como se esperaba para esta clase de productos y fueron comparables a los efectos observados para los productos de referencia en el mismo estudio.

Inducción de crecimiento del folículo

Un estudio de toxicidad subcrónica de 4 semanas con el análisis incluido de los parámetros farmacodinámicos se llevó a cabo en monos cynomolgus. 4 grupos, cada uno compuesto de 4 monos cynomolgus, hembra, sexualmente maduros fueron tratados con FSH (invención) mediante inyecciones subcutáneas repetidas una vez al día durante 28 días. Los niveles de dosis fueron de 30, 100 y 300 IU/kg de peso corporal/día para grupos bajo, intermedio y alto de dosis, respectivamente. Adicionalmente de este estudio principal, 2 animales hembras por grupo fueron programadas para un período de recuperación de 6 semanas para el control y para el grupo de dosis alta. Las muestras de sangre para los análisis de estradiol e inhibina-B fueron retiradas antes y al final del período de tratamiento (antes de la dosis, días 1 y 28), 6 horas p.a. en el día 17 y al final del período de recuperación (día 70).

Tratamiento repetido con 30, 100 o 300 IU de FSH (invención)/kg de peso corporal/día durante 4 semanas resultó en un aumento de los pesos de ovario absolutos y relativos y en un aumento en el número de folículos de Graafian en el sacrificio terminal. Adicionalmente, unos pocos animales de todos los grupos de dosis revelaron una ligera disminución en el número de cuerpos lúteos. La correlación de este hallazgo, niveles séricos aumentados de estradiol e inhibina-B se observaron en todos los grupos de dosis.

5.3 Análisis de efectos adversos

Para analizar el riesgo de cualquier efecto adverso inesperado de FSH (invención), los principales parámetros de seguridad farmacológica se incluyeron en unos estudios de toxicidad fundamentales de 4 semanas en ratas y monos cynomolgus (ECG, frecuencia cardíaca, presión arterial, frecuencia respiratoria). Estos estudios no proporcionan ninguna evidencia de una acción general de la FSH (invención) sobre los grandes sistemas, y, por lo tanto, la FSH (invención) pueden ser considerados como seguros y no muestra efectos secundarios adversos.

Ejemplo 6: Farmacocinética

El objetivo del estudio fue investigar la biodisponibilidad y farmacología de FSH (invención) en comparación con Bravelle y Gonal-f por administración subcutánea o intravenosa de monos cynomolgus. El estudio se realizó con la madurez sexual, hembras que presentan un ciclo menstrual regular. Los animales fueron asignados al azar a los grupos de ensayo basados en la fase de su ciclo estral. La administración del elemento de ensayo para los animales comenzó 1 a 3 días después del inicio de la menstruación. El estudio incluyó 4 grupos, cada uno que comprende 4 animales que se trataron ya sea por una sola inyección en bolo i.v. de 100 IU/kg de peso corporal de FSH (invención) o una sola inyección s.c. en bolo de 100 IU/kg de peso corporal de FSH (invención), Bravelle® o Gonal-f®. Las muestras de

sangre para el análisis de los niveles de FSH se realizó de todos los animales en diferentes tiempos puntuales después de la administración que reflejan diferentes fases del ciclo estral.

Ninguno de los animales murió prematuramente durante el curso del estudio o mostró signos clínicos de toxicidad sistémica. No se observó influencia relacionada con los artículos de ensayo o referencia o intolerancia local.

- 5 Un nivel C_{max} de 186.13 mIU de FSH/mL se observó 8 horas p.a. después del tratamiento de s.c. único con 100 IU de FSH (invencción)/kg de peso corporal. La vida media de eliminación sérica media calculada de FSH (invencción) fue 16.85 horas. Los niveles en suero se presentan en la Fig. 9. Los valores medios de los parámetros toxicocinéticos en suero de mono después de una única exposición se dan en la Tabla 11.

- 10 Tabla 11: Parámetros toxicocinéticos calculados después de una sola inyección s.c. en bolo de FSH a monos cynomolgus hembra.

Análisis no compartimental de la FSH tras una exposición única										
C_{max} [mIU/mL]	#	t_{max} [h]	#	$t_{1/2}$ [h]	K_{e1} [1/h]	$AUC_{0-t_{ultimo}}$ [mIU/mL*h]	$AUC_{0-\infty}$ [mIU/mL*h]	Cl [mL/ min/kg]	F para FSH (inv.) [%]	Exposición relativa## (gr. 1=1.0)
1-2 días de ensayo										
Grupo 1: 100 IU de FSH (invencción)/kg de peso corporal, s.c.										
186.13		14.00		16.85	0.041	6363.50	7017.07	0.243	72.77	1.0
Grupo 2: 100 IU de FSH (invencción)/kg de peso corporal, i.v.										
2:181.33		0.29		8.68	0.084	8744.45	11068.16	0.163	-	1.37
Grupo 3: 100 IU Bravelle®/kg de peso corporal, s.c.										
241.73		15.00		20.97	0.035	11931.93	12532.51	0.145	n.a.	1.88
Grupo 4: 100 IU Gonalf®/kg de peso corporal, s.c.										
456.48		12.00		18.33	0.038	16109.68	16671.93	0.102	n.a.	2.53

#: Valores obtenidos a partir del análisis de suero de FSH

n.a.: No aplicable

F: Biodisponibilidad relativa de FSH (invencción) $[(AUC_{0-t_{ultimo}} \text{ s.c.} \times \text{dosis i.v.}) / (AUC_{0-t_{ultimo}} \text{ i.v.} \times \text{dosis s.c.})] \times 100\%$.

- 15 ##: Comparación de los valores $AUC_{0-t_{ultimo}}$, grupo 1 = 1.00

Una biodisponibilidad relativa (F) de 72.77% se calculó para FSH (invencción) tras la administración subcutánea en comparación con FSH (invencción) administrada por vía intravenosa. Las siguientes proporciones de exposición de FSH se observaron tras la exposición única: FSH (invencción) (s.c.) < FSH (invencción) (i.v.) < Bravelle < Gonalf.

- 20 También se obtuvieron datos similares de estudios de dosis múltiples en monos cynomolgus y de estudios en ratas y ratones inmunológicamente deficientes:

- 25 El estudio de dosis repetidas en monos cynomolgus se realizó similar al estudio de dosis única. El estudio incluyó 3 grupos, cada uno compuesto de 4 animales que fueron tratados por inyecciones diarias repetidas s.c. en bolo de 100 IU/kg de peso corporal de FSH (invencción), Bravelle o Gonalf, durante 7 días consecutivos. La dosis fue seleccionada en referencia a estudios farmacocinéticos y toxicológicos en monos que utilizaron dosis de 10 - 1000 IU/kg de peso corporal de Gonalf. Ninguno de los animales murió prematuramente durante el curso del estudio o mostró signos clínicos de toxicidad sistémica. No se observó influencia relacionada con el artículo de referencia o ensayo o intolerancia local. Los resultados mostraron que valores de C_{max} y AUC de FSH (invencción) en monos en comparación con los productos de referencia que contienen FSH (Gonalf, Bravelle) se reducen, lo que resulta en una exposición al fármaco más baja en FSH (invencción) de animales tratados. Sin embargo, los datos de farmacología obtenidos en los mismos estudios han demostrado que no hay diferencia entre los productos de FSH en relación a su capacidad para estimular la producción estradiol e inhibina-B como efectores del receptor de FSH (véase el Ejemplo 5).
- 30

5 Ratonas hembra deficientes genéticamente se administraron con 5 µg de FSH por inyección s.c. y se controló la concentración de FSH en la sangre. Los perfiles farmacocinéticos de FSH (invención), así como Gonal-f y Bravelle son en gran parte comparables con respecto a los valores de C_{max} y $AUC_{0-t \text{ último}}$. Se observaron niveles de C_{max} de $5.1 \pm 1.9\%$ de ID, $6.7 \pm 0.4\%$ de ID y $5.5 \pm 0.4\%$ de ID después de la inyección subcutánea única de FSH (invención), Bravelle y Gonal-f, respectivamente. Se observaron valores $AUC_{0-t \text{ último}}$ de $71.6 \pm 25.4\%$ de ID, $99.1 \pm 12.9\%$ de ID y $79.7 \pm 9.7\%$ ID de FSH (invención), Bravelle y Gonal-f, respectivamente. En general, el aclaramiento de la sangre y la exposición al fármaco relativo es comparable para todas las sustancias investigadas; estadísticamente no se midieron las diferencias pertinentes. Sobre la investigación de la biodistribución de la FSH administrada, se observó una acumulación de FSH en los ovarios y el útero (además de una alta acumulación en los riñones debido a su papel en la eliminación de la FSH del cuerpo).

15 Ratas hembra maduras se administraron con dosis únicas o múltiples de 100 IU/kg de peso corporal de FSH (invención), Bravelle o Gonal-f por inyección s.c. y se controló la concentración sérica de FSH. Los resultados mostraron que los valores de AUC y vida media en suero de FSH (invención) en ratas en comparación con los productos de referencia que contienen FSH (Gonal-f, Bravelle) se reducen, lo que resulta en una menor exposición a la droga de la FSH (invención) animales tratados. Sin embargo, los datos de farmacología obtenidos en los mismos estudios han demostrado que no hay diferencia entre los productos de FSH en relación a su capacidad para estimular la producción de estradiol e inhibina-B como efectores del receptor de FSH (véase el Ejemplo 5).

Ejemplo 7 Farmacocinética y farmacodinamia en humanos

20 En un estudio clínico, FSH (invención) se administró a los voluntarios y se determinaron los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos. Mujeres voluntarios sanos recibieron 25 IU, 75 IU o 150 IU de FSH (invención) en una dosis subcutánea única y se controló la concentración de FSH en la circulación. Adicionalmente, también se analizaron el número y tamaño de los folículos, antes y después de la medicación.

25 Como resultado preliminar, se observó casi una duplicación de la concentración máxima en suero de FSH (invención) (C_{max}) en comparación con los datos publicados de la FSH urinaria y recombinante medidos por diferentes laboratorios. La vida media en circulación ($t_{1/2}$) después de la administración subcutánea es comparable para FSH (invención) ($\sim 33 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$), FSH derivada de células CHO recombinantes (Gonal-f: $37 \text{ h} \pm 28 \text{ h}$ (le Cottonnec et al. (1994) Fertility and Sterility 61, 679-686) y la FSH urinaria (MetrodinHP: $45 \text{ h} \pm 21 \text{ h}$ (le Cottonnec et al (1993) Human Reproduction 8, 1604-1611)). Los datos farmacodinámicos mostraron que el crecimiento del folículo puede ser visto para algunos pacientes ya con una dosis única de 25 IU de FSH (invención). Esto no se pudo observar en el caso de los comparadores Bravelle y Gonal-f. En el caso de 75 y 150 IU de FSH (invención) todos los sujetos mostraron folículos agrandados con un paciente que tiene un folículo duplicado en tamaño.

Listado de secuencias

<110> GlycoTope GmbH

<120> Hormona estimulante del folículo humana recombinante mejorada

35 <130> 52 927 K

<150> PCT/EP2010/004769

<151> 2010-08-04

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

40 <210> 1

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 764 083 T3

Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro
1 5 10 15

Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys
20 25 30

Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu
35 40 45

Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser
50 55 60

Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr
65 70 75 80

Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
85 90

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 764 083 T3

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu
 1 5 10 15

Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys
 20 25 30

Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln
 35 40 45

Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro
 50 55 60

Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr
 65 70 75 80

Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val
 85 90 95

Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu
 100 105 110

REIVINDICACIONES

1. Una preparación de FSH recombinante, en donde la FSH recombinante en la preparación tiene un patrón de glicosilación que comprende las siguientes características:
- 5 (i) una cantidad relativa de glicanos que lleva N-acetilglucosamina bisectantes (bisGlcNAc) de al menos 20% de la cantidad total de glicanos unidos a FSH en la preparación; y
- (ii) una cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado de al menos 30% de la cantidad total de ácidos siálicos; y
- (iii) una cantidad relativa de glicanos que llevan un grupo sulfato de al menos el 3% de la cantidad total de glicanos unidos a FSH en la preparación.
- 10 2. La preparación de FSH recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el patrón de glicosilación comprende además una cantidad relativa de glicanos que lleva fucosa de al menos 30% de la cantidad total de glicanos unidos a FSH en la preparación.
3. La preparación de FSH recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el patrón de glicosilación es un patrón de glicosilación diverso, en donde la FSH en la preparación comprende al menos 35 diferentes estructuras de glicano, en donde cada una de estas diferentes estructuras de glicano tiene una cantidad relativa de al menos 0.1% de la cantidad total de las estructuras de glicano de la FSH en la preparación.
- 15 4. La preparación de FSH recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que puede obtenerse por la producción en la línea celular humana GT-5s o una línea celular derivada de la misma o un homólogo de la línea celular de la misma.
- 20 5. La preparación de FSH recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la FSH recombinante en la preparación tiene un patrón de glicosilación que comprende las siguientes características:
- (i) una cantidad relativa de glicanos que lleva N-acetilglucosamina bisectante (bisGlcNAc) de al menos 25%, preferiblemente al menos 30%, de la cantidad total de glicanos unidos a FSH en la preparación; y
- (ii) una cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado de al menos 40%, preferiblemente al menos 50% o al menos 53%, de la cantidad total de ácidos siálicos.
- 25 6. La preparación de FSH recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una o más de las siguientes características
- (a) el patrón de glicosilación comprende una cantidad relativa de glicanos que lleva uno o más residuos de ácido siálico de al menos 85%;
- (b) el patrón de glicosilación comprende una cantidad relativa de al menos glicanos tetraantenarios de al menos 18%;
- 30 (c) un número Z de al menos 200;
- (d) esta es FSH recombinante humana;
- (e) esta es producida por una línea celular humana o células humanas; y/o
- (f) la FSH en la preparación comprende una subunidad alfa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una subunidad beta que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 35 7. La preparación de FSH recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el patrón de glicosilación comprende una o más de las siguientes características:
- (i) una cantidad relativa de glicanos que lleva N-acetilglucosamina bisectante (bisGlcNAc) en el intervalo de 25% a 50%;
- (ii) una cantidad relativa de al menos glicanos tetraantenario de al menos 16%;
- (iii) una cantidad relativa de glicanos que lleva fucosa de al menos 35%;
- 40 (iv) una cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado de al menos 53%;
- (v) una cantidad relativa de glicanos que lleva uno o más residuos de ácido siálico de al menos 88%;
- (vi) un número Z de al menos 220;
- (vii) una cantidad relativa de glicanos que lleva galactosa de al menos 95%;
- 45 (viii) una cantidad relativa de las ramas de glicano que llevan una unidad de galactosa terminal opcionalmente modificado por un residuo de ácido siálico de al menos 60%;

- (ix) una cantidad relativa de los glicanos que llevan un grupo sulfato de al menos 5%, preferiblemente al menos 7%;
- (x) está comprende al menos 45 estructuras de glicano diferentes, en donde cada una de las diferentes estructuras de glicano tiene una cantidad relativa de al menos 0.05% de la cantidad total de las estructuras de glicano de la FSH en la preparación;
- 5 (xi) está comprende al menos 35 estructuras de glicanos diferentes, en donde cada una de las diferentes estructuras de glicano tiene una cantidad relativa de al menos 0.1% de la cantidad total de las estructuras de glicano de la FSH en la preparación;
- (xiii) esta comprende al menos 20 estructuras de glicanos diferentes, en donde cada una de las diferentes estructuras de glicano tiene una cantidad relativa de al menos 0.5% de la cantidad total de las estructuras de glicano de la FSH en la preparación; y/o
- 10 (xiv) está comprende al menos 40% más diferentes estructuras de glicano que la FSH obtenida a partir de células CHO en una preparación correspondiente, en donde cada una de las diferentes estructuras de glicano tiene una cantidad relativa de al menos 0.05% de la cantidad total de las estructuras de glicano de la FSH en la preparación respectiva.
- 15 8. La preparación de FSH recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el patrón de glicosilación comprende las siguientes características:
- (i) una cantidad relativa de glicanos que lleva N-acetilglucosamina bisectante (bisGlcNAc) en el intervalo de 25% a 50%;
- (ii) una cantidad relativa de al menos glicanos tetraantenario de al menos 16%;
- (iii) una cantidad relativa de glicanos que lleva fucosa de al menos 35%;
- (iv) una cantidad relativa de ácido siálico 2,6-acoplado en el intervalo de 53% a 99%; y
- 20 (v) una cantidad relativa de glicanos que lleva uno o más residuos de ácido siálico de al menos 88%.
9. La preparación de FSH recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha FSH
- (i) es capaz de estimular la liberación de la progesterona en células de la granulosa
- (a) a concentraciones donde ninguna liberación de cAMP por encima de la liberación de cAMP en ausencia de FSH es detectable;
- 25 y/o
- (b) mediante la inducción de una ruta de transducción de señal que es independiente de la señalización de cAMP; y/o
- (ii) es capaz de estimular o coestimular la maduración de células germinales por un proceso biológico que es independiente de la señalización de cAMP; y/o
- 30 (iii) tiene una o más de las siguientes características como se puede determinar en un ensayo de células de la granulosa
- (a) es capaz de estimular la liberación de la progesterona en células de la granulosa a concentraciones que están por debajo de la concentración mínima necesaria para la inducción de la liberación de cAMP por las células de la granulosa;
- (b) es capaz de estimular la liberación de al menos 200ng/mL de progesterona en $5 \cdot 10^4$ a $1 \cdot 10^5$ células de granulosa /mL a las concentraciones de FSH que no inducen una liberación de cAMP o que inducen una liberación de cAMP de
- 35 menos de 10 pmol/mL;
- (c) es capaz de estimular la liberación de al menos 100 ng/mL de progesterona en $5 \cdot 10^4$ a $1 \cdot 10^5$ de células de granulosa /mL a una concentración que es inferior a la concentración necesaria por la FSH urinaria humana o FSH recombinante producida en las células CHO (Gonal F); y/o
- (d) es capaz de estimular la liberación de al menos 100 ng/mL de progesterona en $5 \cdot 10^4$ a $1 \cdot 10^5$ de células de granulosa/mL a una concentración en donde la FSH urinaria humana o FSH recombinante producida en células CHO (Gonal F) no dan lugar a una liberación correspondiente de la progesterona; y/o
- 40 (iv) es capaz de inducir el crecimiento del folículo en un ser humano hembra después de la administración de una dosis única, en donde la dosis única comprende preferiblemente 25 a 500 IU de FSH y preferiblemente es apropiada para la administración parenteral, en particular, por inyección subcutánea.
- 45 10. Una composición farmacéutica que comprende la preparación de FSH recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, estando en forma de una dosis unitaria única que comprende de 50 IU a 400 IU de FSH.
12. La preparación de FSH recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 para su uso en el tratamiento de la infertilidad.
- 5 13. La preparación o composición farmacéutica de FSH recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la dosis que se va a administrar a los pacientes resulta en una concentración de FSH en la circulación del paciente en el intervalo de 0.05 a 2 IU/L, preferiblemente de 0.1 a 1 IU/L.
14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 para uso en medicina, en donde el uso médico comprende
- 10 (i) inducir y/o estimular la secreción de esteroides sexuales también independientes de cAMP; o
- (ii) estimular o coestimular la maduración de células germinales por un proceso biológico que es independiente de la señalización de cAMP; o
- (iii) inducir y/o estimular la secreción de esteroides sexuales en las concentraciones de FSH en las cuales no se induce liberación detectable de cAMP por encima de la liberación de cAMP en ausencia de FSH.
- 15 15. La preparación de FSH recombinante o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 para uso en el tratamiento de la infertilidad, en donde el tratamiento de infertilidad incluye técnicas de reproducción asistida, inducción de la ovulación, fertilización in vitro, por ejemplo fertilización in vitro con inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia intratubárica de gametos, inseminación intrauterina, tratamiento de trastorno anovulatorio en mujeres, tratamiento del trastorno de deficiencia de la hormona luteinizante para la maduración del óvulo en la mujer, tratamiento de deficiencias de la producción de espermatozoides en los hombres, y/o habilitación o mejora de la maduración de las células germinales, tales como foliculogénesis y espermatogénesis, en particular, maduración folicular en mujeres, por ejemplo, durante los protocolos de estimulación fertilización in vitro y/o para el tratamiento del trastorno anovulatorio.
- 20 16. La preparación de FSH recombinante o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde la preparación de FSH recombinante o la composición farmacéutica tiene una o más de las siguientes características:
- 25 (i) esta es capaz de inducir el crecimiento folicular y/o maduración ovular después de la administración de solo una dosis única; y/o
- 30 (ii) esta tiene una menor vida media en circulación en uno o más de los seres humanos, monos cynomolgus, ratas y/o ratones que las preparaciones de FSH obtenidas a partir de orina humana y/o expresadas en células CHO; y/o
- (iii) esta tiene una menor biodisponibilidad en uno o más de los seres humanos, monos cynomolgus, ratas y/o ratones que las preparaciones de FSH obtenidas a partir de orina humana y/o expresadas en células CHO; y/o
- (iv) esta tiene una eficacia terapéutica en uno o más de los seres humanos, monos cynomolgus, ratas y/o ratones que es similar o mayor que la de las preparaciones de FSH obtenidas a partir de orina humana y/o expresadas en células CHO.
- 35

Figura 1

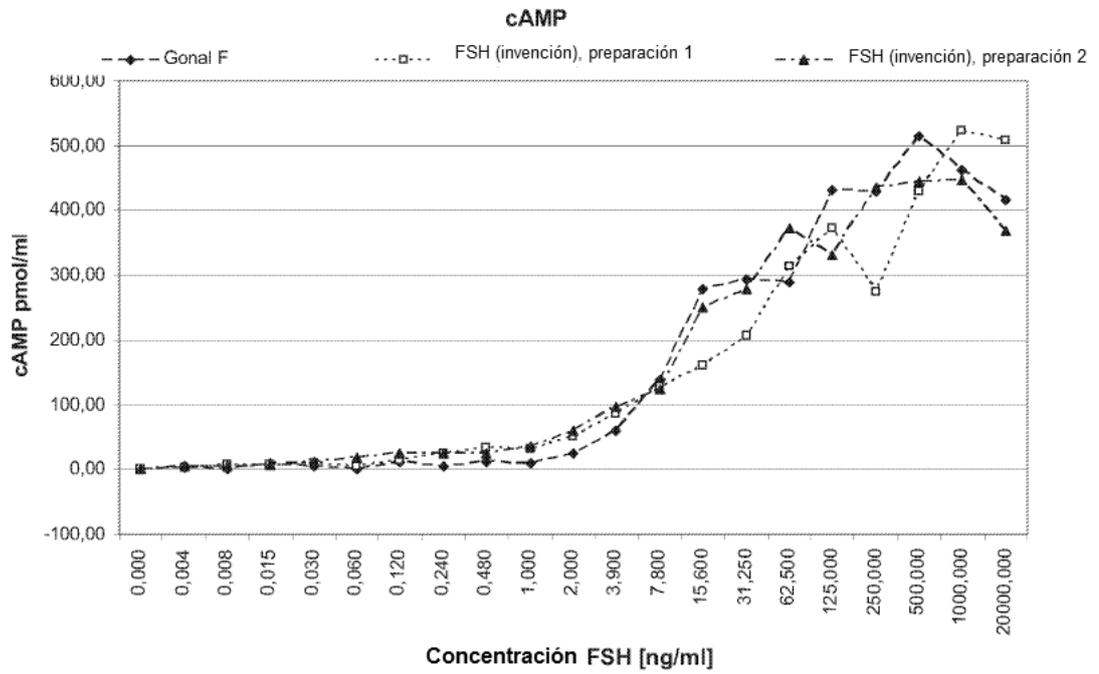


Figura 2

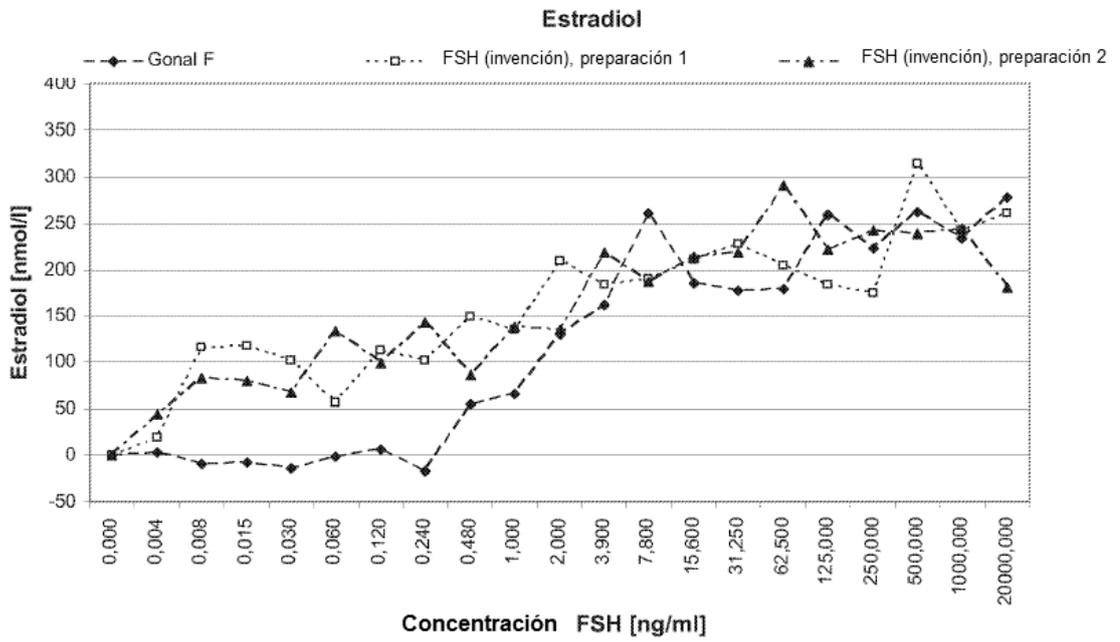


Figura 3

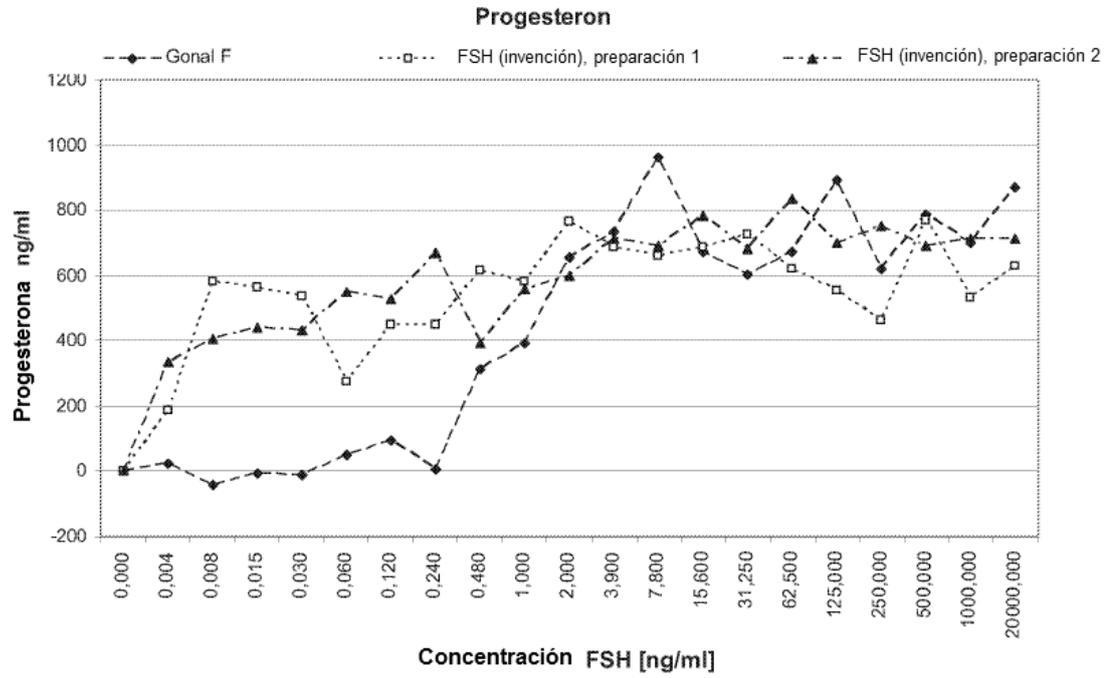


Figura 4

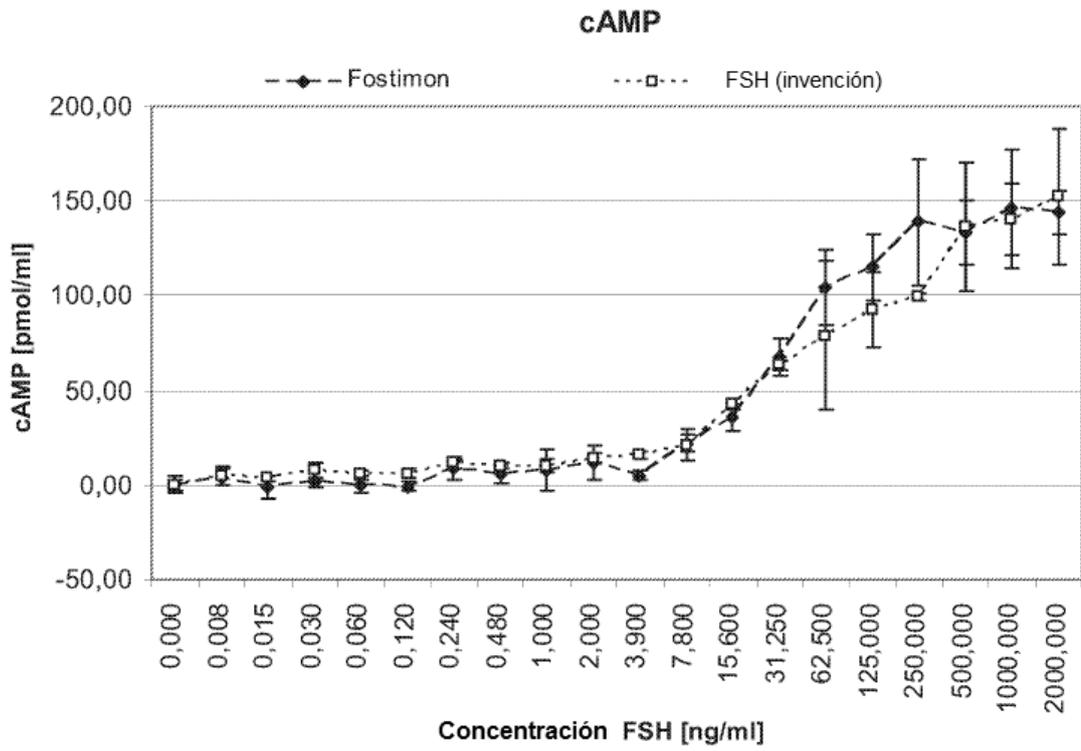


Figura 5

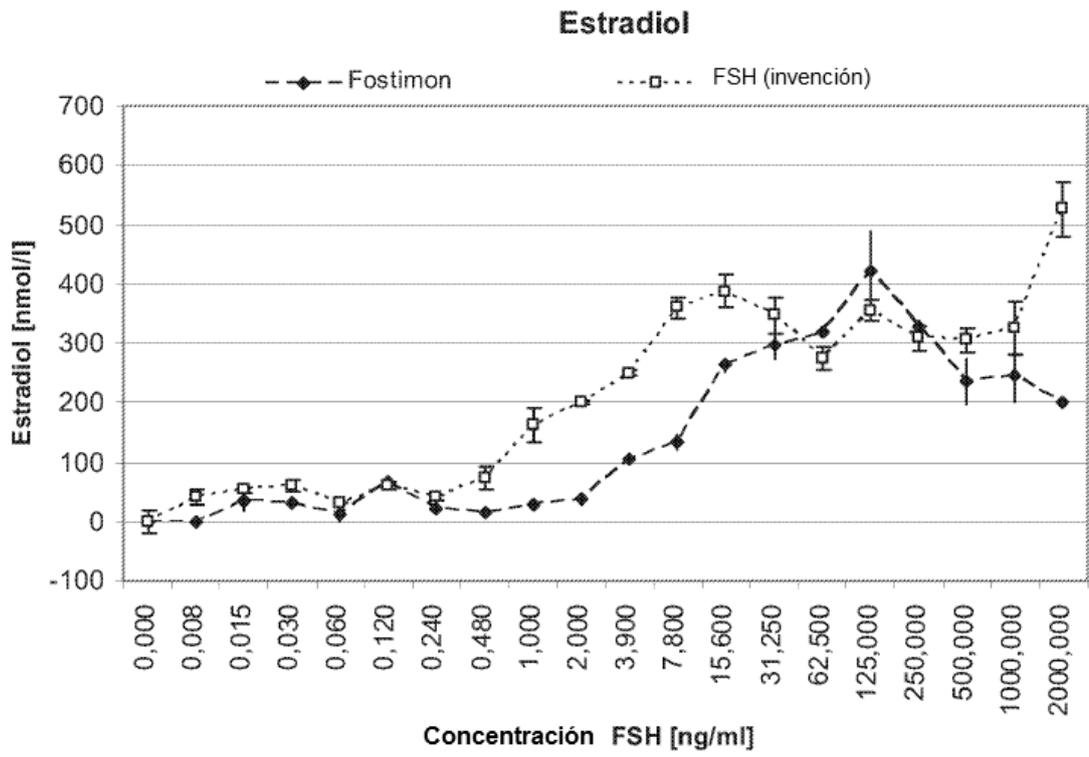


Figura 6

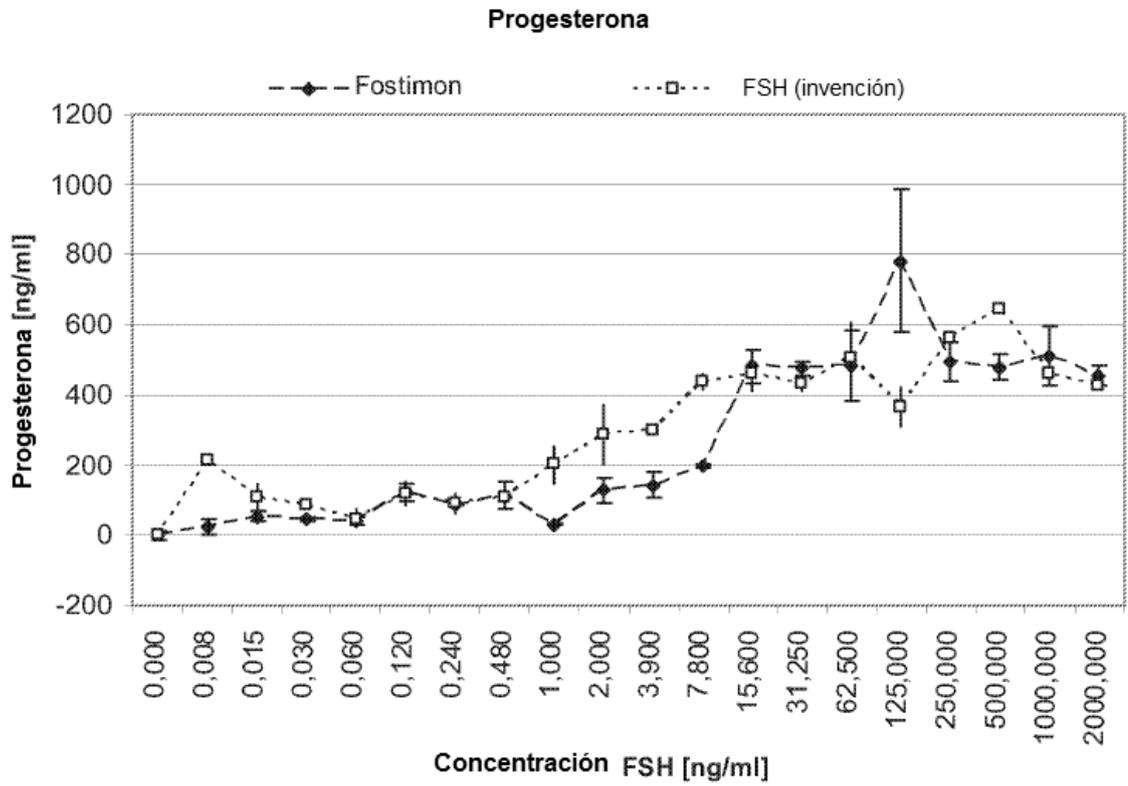


Figura 7

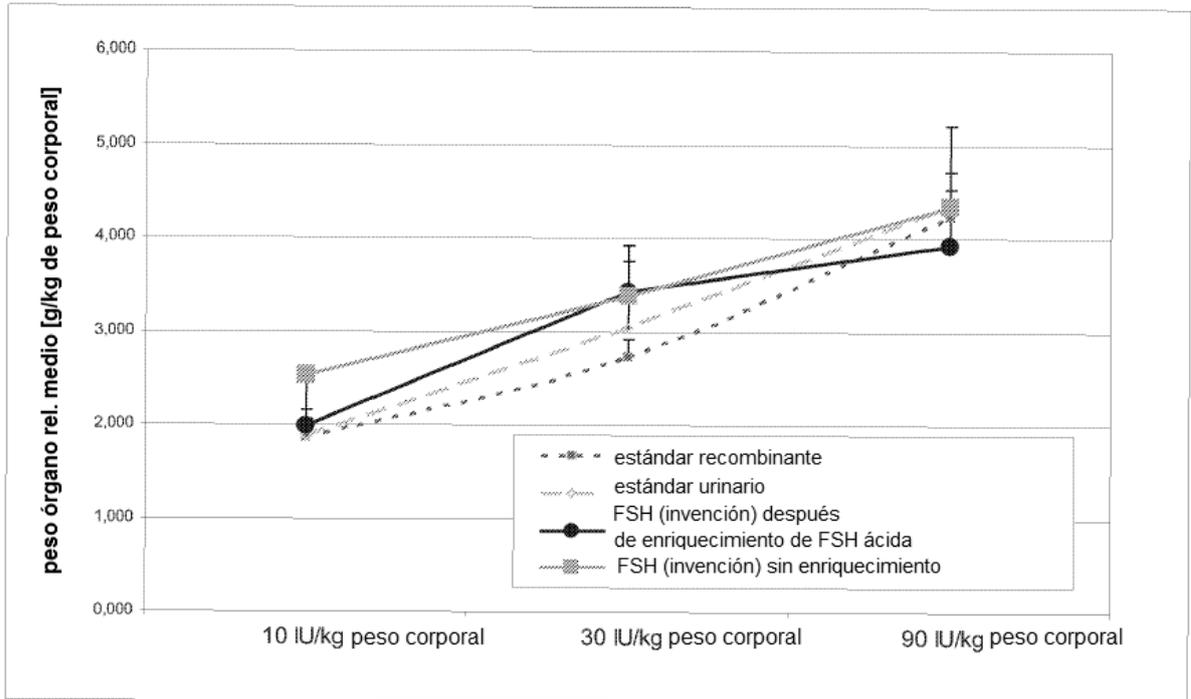


Figura 8

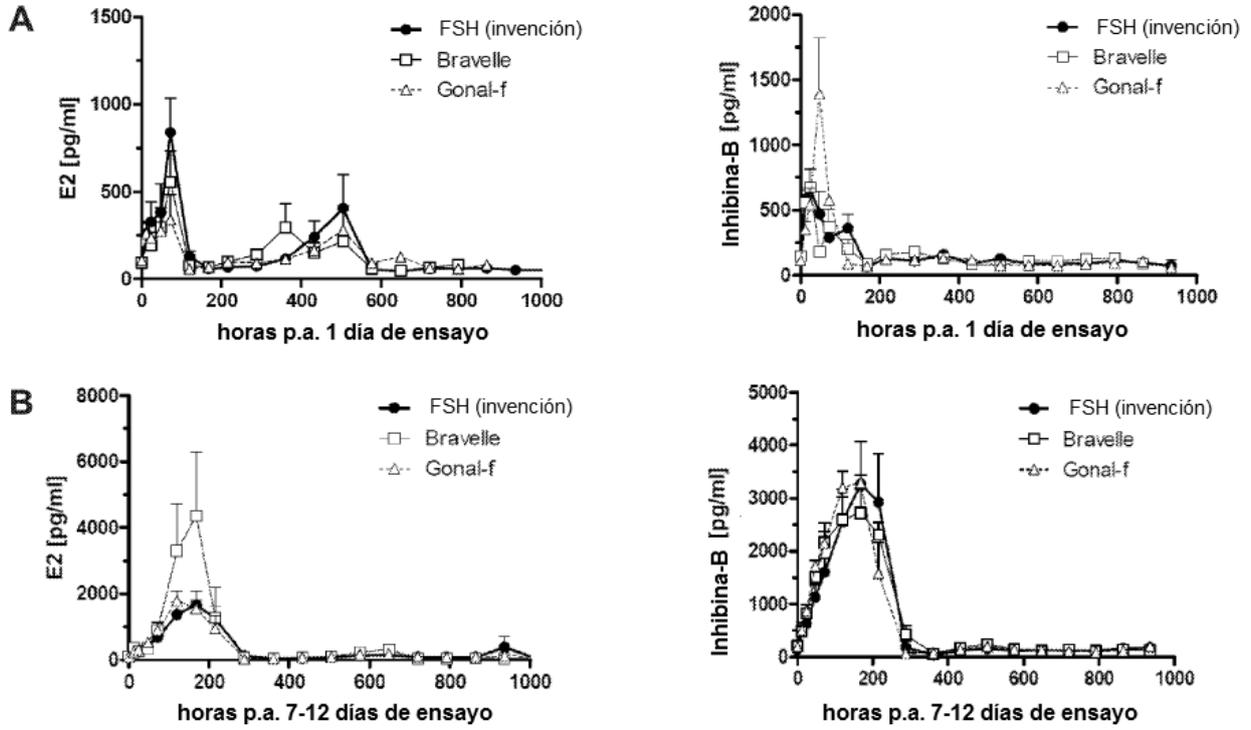


Figura 9

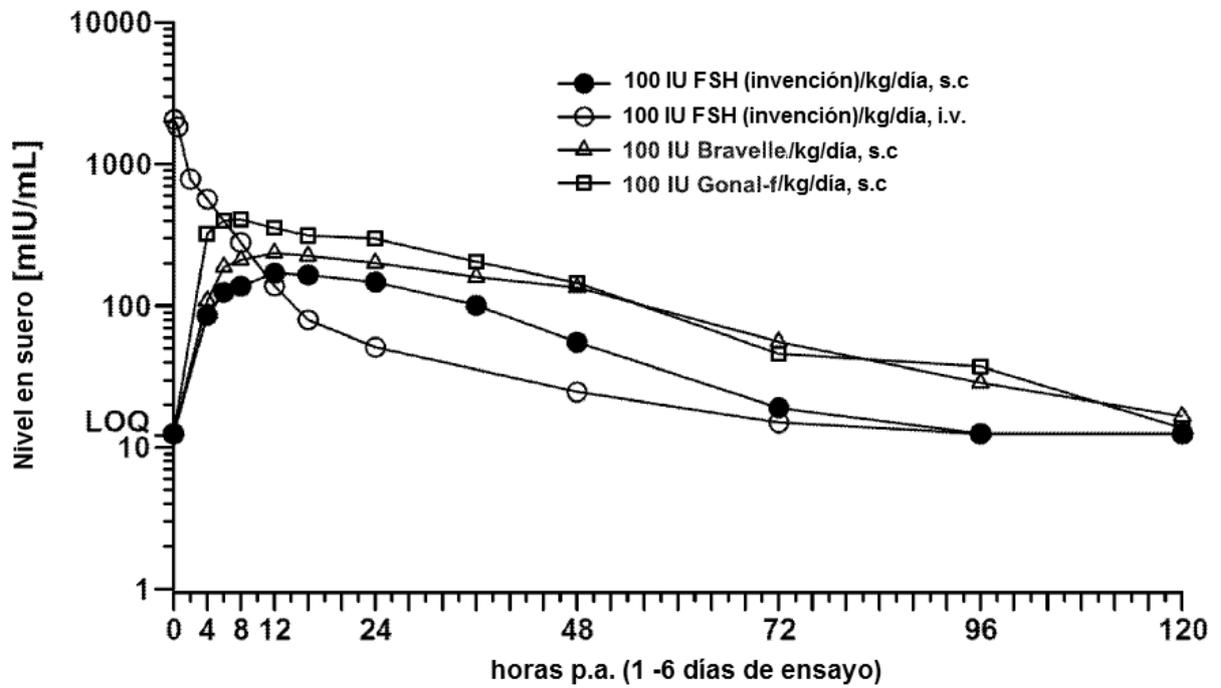


Figura 10

